



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA
SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MOLECOLARI
INDIRIZZO: SCIENZE FARMACEUTICHE
CICLO XX

**ACIDI NUCLEICI COME TARGET
TERAPEUTICI NELLO SVILUPPO DI
COMPOSTI ANTIVIRALI O
ANTIPROLIFERATIVI**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Maurizio Casarin

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Barbara Gatto

Dottoranda: Giulia Giaretta

31 gennaio 2008

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	5
1. <u>INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO</u>	9
2. <u>PORTE I: “SCREENING DI NUOVI POTENZIALI INIBITORI TAT-TAR”</u>	
2.1 INTRODUZIONE	15
2.1.1 AIDS E VIRUS DELL’ HIV	15
2.1.2 CICLO VITALE DEL VIRUS	19
2.1.3 APPROCCI TERAPEUTICI CONTRO L’HIV	20
2.1.4 NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE: IL PROCESSO DI TRANSATTIVAZIONE	22
2.1.5 INIBIZIONE DEL LEGAME TAT-TAR	28
2.1.5.1 Requisiti per l’interazione con il TAR	30
2.1.5.2 Piccole molecole in grado di inibire il complesso Tat-TAR	32
2.1.6. SCREENING DI PICCOLE MOLECOLE COME POTENZIALI INIBITORI DEL PROCESSO DI TRANSATTIVAZIONE	41
2.1.6.1 2-Fenilchinoloni	41
2.1.6.2 Derivati 6-amminochinolonici	45

2.1.6.3 Derivati acridonici	46
2.1.6.4 Derivati antrachinonici	49
2.2 RISULTATI	53
2.2.1 NUOVI DERIVATI CHINOLONICI ANTI-HIV: RICONOSCIMENTO DI ACIDI NUCLEICI VIRALI E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ	53
2.2.1.1 STUDIO DELLA PRIMA SERIE DI 2-FENILCHINOLONI	53
2.2.1.1.1 Proprietà chimico-fisiche	53
2.2.1.1.2 <i>Electrophoresis Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	58
2.2.1.1.3 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA	63
2.2.1.1.4 Studio dell'interazione dei chinoloni con gli acidi nucleici tramite dialisi all'equilibrio	74
2.2.1.1.4.1 Studio dell'interazione dei chinoloni in esame con TAR <i>wild-type</i> e forme mutate di TAR	75
2.2.1.1.4.2 Studio dell'interazioni dei chinoloni in esame con altri tipi di acidi nucleici	78
2.2.1.1.5 Saggi di citotossicità	80
2.2.1.1.6 Valutazione dell'attività antivirale	81
2.2.1.1.7 Determinazione sperimentale del coefficiente di ripartizione e valutazione dell' <i>uptake</i> cellulare	83
2.2.1.2 STUDIO DELLA II SERIE DI 2-FENILCHINOLONI	86
2.2.1.2.1 Proprietà chimico-fisiche dei chinoloni esaminati	86
2.2.1.2.2 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA	90
2.2.1.2.3 Saggi di citotossicità	95
2.2.1.2.4 Determinazione sperimentale del coefficiente di ripartizione e valutazione dell' <i>uptake</i> cellulare	96

2.2.1.2.5 Valutazione dell'attività antivirale	98
2.2.2 SCREENING DI NUOVI POTENZIALI INIBITORI TAT-TAR	100
2.2.2.1 ANALISI DI ALCUNI 6-AMMINOCHINOLONI	100
2.2.2.1.1 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA	100
2.2.2.2 ANALISI DI UNA SERIE DI ACRIDONI	101
2.2.2.2.1 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA	101
2.2.2.3 ANALISI DI ALCUNI PEPTIDIL-ANTRACHINONI MONO E DI-SOSTITUITI	103
2.2.2.3.1 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA	103
2.2.2.3.2 Studio dell'interazione con il TAR tramite saggi di <i>melting</i>	105
2.3 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	109
3. <u>PARTE II</u>: “NUOVI DERIVATI ANTRACHINONICI SEQUENZA SELETTIVI: STUDIO DELL'INTERAZIONE CON IL DNA”	
3.1 INTRODUZIONE	125
3.1.1 IL TUMORE	125
3.1.2 GLI ANTRACHINONI COME ANTITUMORALI	126
3.1.3 IMPORTANZA DELLE INTERAZIONI DNA-PROTEINA	129
3.1.4 DERIVATI ANTRACHINONICI SEQUENZA SELETTIVI	131
3.2 RISULTATI	136

3.2.1 PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE DEGLI ANTRACHINONI ESAMINATI	136
3.2.2 STUDIO DEL LEGAME AL DNA	137
3.2.2.1 Saggi di <i>unwinding</i>	137
3.2.2.2 Studio del legame al DNA sequenza-specifico: saggi di <i>melting</i> tramite <i>Contact-Quenching</i>	141
3.2.2.3 Studio dell'interazione del composto 1002 con il DNA tramite dicroismo circolare	153
3.2.3 STUDIO DELL'INTERFERENZA NEI CONFRONTI DI ENZIMI CHE AGISCONO SUL DNA	156
3.2.3.1 Saggi di inibizione dell'enzima Topoisomerasi II	156
3.2.3.1.1 Saggi di inibizione dell'attività di decatenazione dell'enzima Topoisomerasi II	156
3.2.3.1.2 Saggi di inibizione dell'attività di rilassamento dell'enzima Topoisomerasi II	158
3.2.4 SAGGI DI CITOTOSSICITÀ	159
3.2.5 DETERMINAZIONE SPERIMENTALE DEL COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE	161
3.3 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	163

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 MATERIALI	167
4.1.1 MATERIALI PER GEL ELETTROFORESI	167
4.1.2 REAGENTI GENERALI	168
4.1.3 SOLUZIONI TAMPONE	168
4.1.4 COMPOSTI	169

4.1.4.1 Chinoloni	169
4.1.4.2 Acridoni	170
4.1.4.3 Derivati antrachinonici	170
4.1.5 ACIDI NUCLEICI	171
4.1.5.1 TAR-RNA	171
4.1.5.2 dsDNA e ssDNA	174
4.1.5.3 tRNA	175
4.1.6 PEPTIDI	176
4.1.7 CELLULE	177
4.1.8 Virus	177
4.1.9 ENZIMI	177
4.2 METODI	178
4.2.1 PREPARAZIONI DELLE SOLUZIONI DI FARMACI	178
4.2.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI ACIDI NUCLEICI	178
4.2.3 ANALISI DELLE CARATTERISTICHE SPETTROFOTOMETRICHE E FLUORIMETRICHE	180
4.2.4 DETERMINAZIONE SPERIMENTALE DEL COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE	180
4.2.5 DIALISI ALL'EQUILIBRIO	181
4.2.6 STUDIO DELL'INTERFERENZA DEI COMPOSTI SUL COMPLESSO TAT-TAR TRAMITE FQA	182
4.2.7 STUDI DI MELTING DEL TAR TRAMITE CONTACT-QUENCHING	183
4.2.8 STUDI DI DICROISMO CIRCOLARE	184
4.2.9 SAGGI ELETTROFORETICI	184

4.2.9.1 Saggi EMSA (<i>Electrophoresis Mobility Shift Assay</i>)	184
4.2.9.2 Saggi di <i>unwinding</i>	185
4.2.10 SAGGI ENZIMATICI	186
4.2.10.1 Saggi di inibizione dell'attività di decatenazione della topoisomerasi II	186
4.2.10.2 Saggi di inibizione dell'attività di rilassamento della topoisomerasi II	186
4.2.11 SAGGI DI CITOTOSSICITÀ	187
4.2.12 VALUTAZIONE DELL' <i>UPTAKE</i> CELLULARE	187
4.2.13 SAGGI ANTIVIRALI	188
4. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	191

RIASSUNTO

Gli acidi nucleici rappresentano un ottimo target per lo sviluppo di nuovi farmaci, la cui azione può essere ricondotta all'inibizione delle funzioni nucleari, sia tramite un'interazione diretta con il DNA o l'RNA, con la formazione di complessi stabili di vario tipo, sia per interferenza con elementi enzimatici e non, fondamentali per i processi di replicazione e trascrizione dell'acido nucleico stesso.

In questo lavoro di tesi ci siamo occupati dello studio di potenziali composti antivirali o antitumorali, i cui bersagli terapeutici sono rappresentati da acidi nucleici, rispettivamente virali o cellulari, da soli o in complesso con proteine.

La prima linea di ricerca ha riguardato lo studio di composti in grado di interferire con il processo virale di trans-attivazione, un'interessante target per lo sviluppo di nuove terapie anti-HIV, che prevede l'interazione della proteina virale Tat (*transactivator of transcription*) con la sequenza iniziale del trascritto virale TAR (*trans-activation responsive element*). In particolare, sono state studiate due serie di 2-fenilchinoloni, sintetizzati dal gruppo della Prof.ssa Cecchetti e della Prof.ssa Tabarrini dell'Università di Perugia, disegnati sulla base di studi razionali, per interferire con il complesso Tat-TAR di HIV-1.

La prima serie di chinoloni esaminati, dopo una prima caratterizzazione spettrofotometrica e fluorimetrica, è stata testata per la capacità di interferire con il complesso Tat-TAR tramite saggi EMSA (*Electrophoresis Mobility Shift Assay*), che hanno permesso di identificare i composti maggiormente attivi. I risultati dei saggi EMSA, sono stati utilizzati per validare un saggio nuovo, veloce e riproducibile (*Fluorescence Quenching Assay*, FQA) per analizzare l'attività di potenziali inibitori. Tale saggio si basa sul fenomeno di trasferimento di fluorescenza, FRET (*Fluorescence Energy Resonance Transfer*), tra la molecola donatrice, rappresentata dal peptide fluoresceinato, ed il gruppo accettore, il *quencher* dabcyI legato all'RNA. Il *quenching* della fluorescenza avviene quando l'acido nucleico e il peptide formano il complesso e diminuisce in seguito alla distruzione del complesso da parte dei composti.

Quindi, per i chinoloni dimostratesi più attivi, è stata valutata la specificità nei confronti del bersaglio TAR-RNA, di suoi mutanti alle strutture *stem*, *loop* e *bulge*, nonché

l'affinità per sequenze di RNA non correlate a TAR (tRNA) e per DNA a singola e a doppia catena, tramite una metodica di dialisi all'equilibrio. Infine sono stati effettuati studi cellulari per investigare sia la tossicità dei composti, che la loro capacità di entrare nelle cellule, tramite determinazione sperimentale del logP e la misura diretta dell'*uptake* da parte delle cellule.

I composti della prima serie emersi come maggiormente attivi, hanno indirizzato la sintesi di una seconda serie di 2-fenilchinoloni, della quale è stata testata la capacità di interferire con il complesso Tat-TAR con il nuovo saggio di *Fluorescence Quenching*, effettuato in diverse condizioni sperimentali. L'analisi dell'effetto della sostituzione in posizioni chiave dell'anello chinolonico ha permesso di elaborare un primo piccolo studio "relazione struttura-attività" (SAR) per selezionare le proprietà molecolari cruciali ad ottenere composti antivirali potenti e selettivi. Anche per questa nuova serie di chinoloni è stata inoltre testata la citotossicità e la capacità di entrare nelle cellule, permettendoci così anche di evidenziare le modifiche strutturali che portano ad un miglioramento della farmacocinetica.

Il saggio di *Fluorescence Quenching*, messo a punto per l'analisi dei chinoloni rappresenta un protocollo di analisi HTS (*High Throughput Screening*) per analizzare velocemente librerie di piccole molecole in grado di competere con il complesso Tat-TAR ed è stato quindi utilizzato per iniziare uno *screening* su nuove classi di composti. In particolare è stata valutata l'attività anti Tat-TAR di alcuni 6-amminochinoloni analoghi del composto di riferimento WM5, una piccola serie di acridoni ed alcuni antrachinoni mono e di-sostituiti con motivi strutturali tali da ricondurli a potenziali inibitori. Questo primo screening ha permesso così di identificare alcuni interessanti composti particolarmente attivi, che meritano di essere ulteriormente indagati in studi futuri. Inoltre grazie a tale analisi è stato possibile ottenere ulteriori indicazioni struttura/attività, nonché acquisire nuove nozioni riguardo le modalità di interazione dai composti con l'RNA-TAR, data la scarsità di informazioni ancora disponibile a riguardo.

Nella seconda linea di ricerca, ci siamo invece occupati di verificare la consistenza di alcuni studi teorici computazionali effettuati dal Prof. Gresh dell'Università di Parigi, che indicano una elevata specificità di legame di una nuova serie di peptidil-antrachinoni verso sequenze palindromiche del DNA di particolare interesse

farmacologico, tra cui spicca la sequenza d(GGCGCC)₂, frequente in alcuni oncogeni e presente a livello delle LTR del provirus HIV. La particolarità di questi nuovi derivati antrachinonici risiede nelle catene laterali, che sono state pensate per esplicare un legame selettivo con le sequenze bersaglio.

Dopo una prima caratterizzazione spettrofotometrica e fluorimetrica dei composti in esame, è stata indagata l'attività intercalante sfruttando la mobilità elettroforetica delle varie forme topologiche del DNA, tramite saggi di *unwinding*. Quindi, si è rivolta l'attenzione a saggi più sensibili e capaci di mettere in luce l'affinità per specifiche sequenze di acido nucleico; a tale scopo è stato messo a punto un saggio di *melting* tramite *Contact Quenching*, che permette di confrontare le preferenze di interazione per le specifiche sequenze. Si è sfruttato a tal fine, anche in questo caso, il fenomeno del trasferimento di fluorescenza utilizzando il fluoroforo fluoresceina ed il *quencher* dabcyI legati rispettivamente all'estremità 5' del filamento *forward* e all'estremità 3' del filamento *reverse* di tre coppie di differenti oligonucleotidi.

A questo punto, una volta validate le predizioni teoriche riguardanti la specificità di sequenza, è stato testato l'effetto dei composti su un enzima che agisce sul DNA, la Topoisomerasi II, bersaglio di molti antitumorali, valutando due diversi tipi di attività enzimatica: la decatenazione ed il rilassamento plasmidico. Infine stata esaminata la citotossicità e stimata la potenzialità dei composti di attraversare le membrane cellulari tramite calcolo sperimentale del coefficiente di ripartizione.

I risultati ottenuti da questi ultimi studi, accanto agli incoraggianti dati di selettività di sequenza, riscontrata per alcuni composti, possono fornire utili indicazioni per indirizzare la sintesi di nuovi derivati maggiormente attivi come antiproliferativi, pur mantenendo la specificità di legame verso sequenze oncogeniche.

ABSTRACT

Nucleic acids represent a good target for the development of new drugs, whose mechanism of action can be related to the inhibition of nuclear functions, both through a direct interaction with DNA or RNA, or by interference with enzymatic or not enzymatic elements fundamental for the replication and transcription of the nucleic acids.

In this thesis we analyzed the activity of potential antiviral or antitumoral drugs, whose therapeutic targets are represented by viral or cellular nucleic acids, alone or in complex with proteins.

An attractive target for the development of new antiviral agents against HIV-1 is the interaction between Tat and TAR. Tat (transactivator of transcription), is a small HIV protein rich in arginines essential for viral gene expression, replication and pathogenesis. Tat requires specific interactions with TAR (trans-activation responsive region), a short RNA structure located at the 5' ends of all nascent HIV-1 transcripts. Small molecules able to interfere with TAR and to compete for Tat binding would possess antiviral activity due to inhibition of viral transcription and expression, resulting in non-assembly of mature functional virions.

The goal of our first research is the study of compounds able to interfere with the viral phase of trans-activation. To this aim we have analyzed two series of 2-phenylquinolones (series WRNA), synthesized by the group of Prof. Cecchetti and Prof. Tabarrini of the University of Perugia. These new compounds are designed rationally with the aim of binding the TAR bulge thus interfering with Tat-TAR complex formation.

To evaluate the interference toward the Tat/TAR complex of the novel quinolones, we have developed a Fluorescence Quenching assay (FQA). The FQA protocol envisages the use of a nucleic acid labelled with a quencher moiety (Q) and of a peptide labelled with a fluorescence dye (F). In particular we have used a RNA-TAR labelled with the quencher dabcyI and the sequence of the core of Tat labelled with the donor fluorescein at its N-terminal. The fluorescence is high when the macromolecule is free in solution, but emission dramatically decreases when the fluorophore is in close proximity to the

quencher molecule (i.e. when the Tat-TAR complex is formed), thus allowing to quantify the extent of complex formation. With this FQ assay we have been able to study the inhibition of Tat/TAR complex formation, i.e. to discriminate the WRNA quinolones with an inhibitory activity comparable or better than the positive control WM5, from the compounds that are weaker competitors of peptide/RNA complex. The results obtained for the first serie of phenylquinolones were consistent with those obtained by gel shift analysis (EMSA): this classic electrophoresis assay confirmed the ability of some new compounds to disrupt the complex in vitro.

We have then evaluated the binding affinities of the compounds toward TAR either wild type or mutant; mutants were designed to discriminate the relative contribution to binding by the different substructures of the nucleic acid (stem, loop, bulge); an RNA sequences not related to TAR (tRNA) and DNA, both single and double strand were also analyzed. The binding affinity of the first series quinolones toward nucleic acids was evaluated by equilibrium dialysis measurements.

Finally we have estimated the antiviral activity of these basic compounds, their cytotoxicity by MTT assay and their cell penetration by uptake studies with different cell lines and protocols.

The compounds of the first series that emerged as mostly active led to the synthesis of a second series of 2-phenylquinolones. The effect of the designed substitutions on quinolone rings on activity, tested by FQ assay, cytotoxicity and cell penetration has allowed us to delineate a more precise structure-activity relationship (SAR), useful to direct further synthesis of active compounds.

The Fluorescence Quenching assay used for testing the interfering with Tat-TAR complex represent a protocol for HTS (High Throughput Screening) analysis to efficiently test library of potential inhibitors. Therefore we have tested other classes of compounds beside the WRNA series. In particular we have evaluated the activity of some of 6-aminoquinolone derivatives, a small serie of acridone derivatives and some anthraquinones with one or two peptide chains at position 2 and/or 6.

With this first screening we have been able to identify very active compounds, and have gotten further indications related to the interaction from the molecules with the RNA-TAR and the implication for Tat inhibition.

The second project aimed at cellular DNA sequences hence at possible anticancer goals, we have analyzed the sequence specificity of DNA binding of a new series of peptidyl-anthraquinones synthesized according to the modelling studies of Prof. Gresh of the University of Paris; these theoretical studies suggested that tailor made drug peptide conjugates can be properly designed to target specific base pairs arrangements.

Therefore we describe here the DNA binding characteristic and cellular activity of a series of compounds in which the planar anthraquinone chromophore fused to the side chains of ametantrone or to other bioisosteric linkers has been conjugated to simple peptidyl chains. Peculiarity of these peptide derivatives of ametantrone stands in the selective binding to important palindromic sequences, as the sequence d(CCCGGG)₂, located in several oncogenes and in HIV-1 LTR.

To evaluate the intercalating power of the novel compounds, we have used the unwinding assays. Then, the attention is turned to a assay more sensitive to study the sequence specificity: by the use of appropriate FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) probes devised according to modelling studies we have demonstrated the sequence-specific properties of the novel designed compounds and thus validate the theoretical predictions.

To this point, once validate the theoretical predictions about the specificity of sequence, we have estimated the effect of the new molecules on Topoisomerase II, an enzyme target of many antineoplastic agents, that acts on the DNA. Particularly we have tested two different types of enzymatic activity: the decatenation and the relaxation of the plasmid DNA.

Finally we have examined the cytotoxicity and the potentiality of the drugs to cross the cellular membranes through experimental calculation of the partition coefficient.

The results obtained by these last studies, with the encouraging data of selectivity of sequence of some compounds, give useful indications to address the synthesis of new active derivatives with high specificity toward oncogenic sequences.

1. INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

Gli acidi nucleici rappresentano un ottimo target per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici sia nel campo degli antivirali che in quello degli antitumorali; tali agenti permettono infatti di ottenere un'inibizione delle funzioni nucleari, sia tramite un'interazione diretta con il DNA o l'RNA, con la formazione di complessi stabili di vario tipo, sia per interferenza con elementi enzimatici e non, fondamentali per i processi di replicazione e trascrizione dell'acido nucleico stesso.

In particolare, gli acidi nucleici virali possono essere considerati interessanti bersagli farmacologici soprattutto per la loro esclusività nel genoma virale: spesso infatti il target è costituito da sequenze strutturate di RNA tipiche del virus, aprendo la strada allo sviluppo di molecole altamente selettive.

Per quanto riguarda invece lo sviluppo di agenti antineoplastici, già molti farmaci utilizzati in terapia hanno come bersaglio il genoma cellulare, in considerazione del fatto che, in seguito alla proliferazione rapida, il DNA si trova più esposto e quindi più facilmente attaccabile nelle cellule malate che in quelle sane. Il problema della chemioterapia risiede però nel basso indice terapeutico di molti farmaci, che vanno ad interferire con l'attività non solo delle cellule malate ma anche di quelle sane, causando i ben noti effetti collaterali; in tale ambito la tendenza della ricerca è quindi diretta ad individuare farmaci chemioterapici ad azione sempre più mirata e selettiva nei confronti delle cellule tumorali.

Lo scopo di questo lavoro di dottorato è quello di analizzare composti aventi come bersagli acidi nucleici virali o cellulari, con l'obiettivo finale di identificare i motivi strutturali fondamentali per l'attività nei confronti dei specifici bersagli in esame e guidare quindi lo sviluppo di nuovi potenziali agenti terapeutici, rispettivamente ad azione antivirale o antitumorale.

Questa tesi descriverà i risultati ottenuti in due progetti di ricerca correlati: il primo riguarda lo sviluppo di nuovi agenti antivirali anti-HIV aventi come bersaglio terapeutico l'interazione Tat-TAR, evento primario del processo di trans-attivazione; il

secondo progetto riguarda la verifica della selettività di sequenza di nuovi composti ad azione antitumorale diretti verso specifiche sequenze oncogeniche.

Un importante risultato del lavoro svolto è stato di mettere a punto protocolli nuovi basati sul fenomeno del trasferimento di fluorescenza (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) che, andando a sostituire i metodi di indagine fino ad ora impiegati nel nostro laboratorio, quali saggi EMSA e saggi di *melting* tramite spettrofotometrica UV-VIS, permettono un'analisi veloce e versatile (*High Throughput Screening*) dei composti in esame, potenzialmente applicabile a svariate classi di composti che si intendano testare.

Per quanto riguarda lo studio di nuovi agenti antivirali, verranno descritti i nuovi saggi *in vitro* e saggi cellulari applicati a due serie di 2-fenilchinoloni, razionalmente disegnati per interagire con la struttura del TAR. In particolar modo, verrà valutata l'interferenza della prima serie di composti nei riguardi del complesso tra il trascritto TAR e il suo bersaglio cellulare Tat e la loro affinità nei confronti del bersaglio TAR-RNA e di suoi mutanti, tramite una metodica di dialisi all'equilibrio; si definirà inoltre l'affinità per sequenze di RNA non correlate a TAR (tRNA), nonché nei confronti di DNA a singola e a doppia catena. Infine, tramite studi cellulari, verrà valutata l'attività antivirale in sistemi cellulari infettati con HIV-1 e la citotossicità nei riguardi dell'organismo ospite, nonché la capacità dei composti di entrare nelle cellule.

I risultati ottenuti dallo studio di questa prima serie serviranno da guida per il disegno e sintesi di una seconda serie di 2-fenilchinoloni, caratterizzata da modifiche strutturali sia al nucleo chinolonico che a livello delle catene laterali. Di questa seconda serie di composti verrà testata la capacità di interferire con il complesso Tat-TAR e il comportamento nei confronti delle cellule, allo scopo di definire in modo razionale le basi molecolari dell'inibizione di tale interazione da parte dei chinoloni e ottenere utili informazioni per delineare un primo studio relazione struttura/attività.

Successivamente la ricerca di inibitori Tat-TAR verrà estesa anche ad altre classi di molecole, quali 6-amminochinoloni, acridoni, antrachinoni mono e di-sostituiti, effettuando uno *screening* su composti che presentassero motivi strutturali tali da ricondurli a potenziali inibitori. Questa analisi ha lo scopo sia di identificare nuovi composti attivi, che di acquisire nuove nozioni riguardo le modalità di interazione dai

composti con l'RNA-TAR, data la scarsità di informazioni ancora disponibile a riguardo.

Per quanto riguarda la seconda parte del lavoro, si passerà ad analizzare alcuni antrachinoni opportunamente disegnati per interagire con sequenze specifiche di DNA, allo scopo di ottenere un *targeting* selettivo verso sequenze oncogeniche; tale selettività rappresenterebbe un'importante vantaggio nella terapia del cancro grazie ad una diminuzione della tossicità e degli effetti indesiderati.

In particolar modo ci si occuperà di verificare la consistenza di alcuni studi teorici computazionali effettuati dal Prof. Gresh dell'Università di Parigi, che indicano una elevata specificità di legame di una serie di peptidil-antrachinoni verso sequenze palindromiche del DNA di particolare interesse farmacologico, frequenti in alcuni oncogeni. In particolar modo verrà esaminata l'affinità per le specifiche sequenze di acido nucleico, indicate dagli studi del Prof. Gresh. Di tutti i composti verrà poi analizzata l'attività intercalante al DNA, la capacità di interferire con l'enzima topoisomerasi II e la citotossicità. Lo scopo è quello sia di validare le predizioni teoriche, che di ottenere una serie preliminare per studi di relazione struttura-attività, dato che accanto ai composti di primo interesse verranno testati anche alcuni composti con sostituzioni bioisosteriche a livello del *linker*.

L'obiettivo finale di questi studi è quindi quello di identificare nuovi agenti antiproliferativi caratterizzati da una buona selettività ed ottenere linee guida per il disegno di eventuali nuovi derivati.

2. PARTE I

“SCREENING DI NUOVI POTENZIALI INIBITORI TAT-TAR”

2.1 INTRODUZIONE

2.1.1 AIDS E VIRUS DELL' HIV

Nel 1981 il CDC (*Center for Disease Control*) descrisse per la prima volta quella che sarebbe diventata una delle patologie più discusse e studiate di questo ultimo trentennio: la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), caratterizzata dalla comparsa di uno stato infiammatorio cronico che si risolve in un deficit funzionale e quantitativo del sistema immunitario. La caratteristica principale di questa sindrome è un graduale deterioramento del sistema immunitario. In particolare, sono colpite le cellule immunitarie CD4+ che giocano un ruolo cruciale nella risposta immunitaria, in quanto sono proprio i linfociti CD4+ che segnalano alle altre cellule immunitarie di porre in atto le proprie funzioni specifiche. Si inizia a parlare di AIDS quando i livelli di CD4+ scendono al di sotto delle 200 cellule per millilitro di sangue ed in tali condizioni i soggetti diventano particolarmente vulnerabili ad infezioni opportunistiche e tumori tipici dell'AIDS, lo stadio finale della patologia. I pazienti presentano spesso infezioni del tratto intestinale, polmoni, cervello, occhi e altri organi, così come una debilitante diminuzione del peso, diarrea, condizioni neurologiche critiche e tumori quali il sarcoma di Kaposi e alcuni tipi di linfomi.

Il virus responsabile della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) è il retrovirus HIV (1, 2), isolato ed identificato nel 1983-84 dal gruppo di Montagnier all'Istituto Pasteur e contemporaneamente dal gruppo di Gallo all'NCI (*National Cancer Institute*), che furono anche in grado di stabilire le modalità di trasmissione del virus (sangue, rapporti sessuali non protetti, passaggio da madre e figlio) e riuscirono ad allestire un test anticorpale per verificare la presenza dell'infezione (3).

Ad oggi l'infezione da HIV e l'AIDS hanno assunto dimensioni mondiali e rappresentano una delle maggiori cause di morte esistenti al mondo, soprattutto nelle zone meno sviluppate. Dal 1981 ad oggi si stima che più 40 milioni di persone abbiano contratto il virus. L' "*United Nations Program on HIV/AIDS*" (UNAIDS) e il "*World Health Organization*" (WHO) dichiarano che nel 2005 sono morte circa 3.1 milioni di persone e un numero compreso tra 2.8 e 3.6 milioni di persone hanno contratto il virus.

Il paese maggiormente colpito è l’Africa sub-sahariana con 26.6 milioni di ammalati, ma ne sono afflitti allo stesso modo anche i paesi più industrializzati.

La diminuzione dell’incidenza di nuovi casi è cominciata attorno al 1995 grazie alla disponibilità di nuovi farmaci, programmi di salute pubblica e campagne di prevenzione. Nonostante ciò, sono ancora numerosissimi ogni anno i nuovi casi d’infezione ma, soprattutto, non esiste a tutt’oggi alcuna terapia in grado di guarire i pazienti sieropositivi, né tantomeno i casi conclamati.

L’ HIV appartiene alla famiglia dei retrovirus, in particolare al genere lentivirus, virus a RNA in grado, grazie all’enzima virale trascrittasi inversa, di trascrivere l’RNA virale in DNA che viene successivamente integrato nel genoma dell’ospite.

Esistono due ceppi di virus HIV: HIV-1 ed HIV-2. HIV-1 è la forma predominante isolata in pazienti con AIDS o a rischio di AIDS, mentre la forma HIV-2 è di tipo endemico nelle popolazioni dell’Africa occidentale ed è strettamente correlato ai virus di un altro tipo di immunodeficienza acquisita, chiamata SIV (*Simian Immunodeficiency Viruses*). HIV2 ha caratteristiche simili a HIV1 ed è in grado di infettare l’uomo sebbene abbia periodi di incubazione più lunghi e spesso sia meno patogeno (4).

Il virione maturo ha un diametro di circa 110nm e presenta un capsido con forma icosaedrica ed un envelope esterno, acquisito durante la fase di maturazione, ricoperto dalle glicoproteine gp120 e gp41. Il materiale genetico del virione è costituito da due copie di RNA, le quali sono legate a due proteine basiche, denominate p7 e p9. Tale complesso è contenuto in una sezione centrale della particella virale denominata “core”, assieme ai tre enzimi virali indispensabili per la replicazione virale: la trascrittasi inversa, le proteasi e l’integrasi. Tale “core” centrale presenta una struttura cilindrico-conica ed è costituito dalla proteina p24, mentre all’esterno si trova la matrice costituita dalla proteina p17 (figura 2.1).

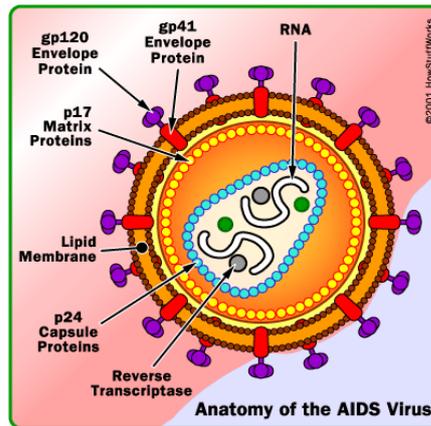


Fig. 2.1 Rappresentazione schematica dell'organizzazione del virus HIV-1; sono rappresentate le proteine del core p17, p24, p7, gli enzimi Integrasi, Retrotrascrittasi e Proteasi, le proteine di superficie dell'envelope (gp120) e le proteine transmembrana dell'envelope (gp41).

Il virus HIV presenta un genoma approssimativamente lungo 9.4 Kb, con un'organizzazione insolitamente complessa (5). Tre sono i geni comuni a tutti i retrovirus fondamentali per la replicazione virale: *gag* che codifica per le proteine strutturali, *pol* per la trascrittasi inversa, l'integrasi e le proteasi ed *env* codificante le glicoproteine del capsido. Questi geni sono disposti in sequenza *gag-pol-env* dall'estremità 5' a quella 3' e sono preceduti e seguiti da "Long Terminal Repeats" (LTR) contenenti elementi promotori e stimolatori necessari per un'efficiente trascrizione del genoma virale (figura 2.2).

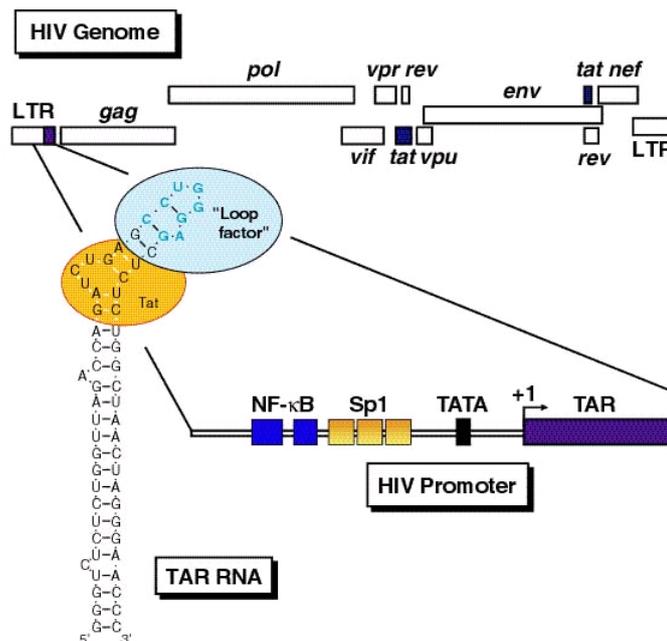


Fig. 2.2 Rappresentazione schematica del genoma dell'HIV-1

Oltre alle poliproteine *gag*, *pol*, *env*, l'HIV-1 esprime almeno altri sei geni che codificano per proteine responsabili della regolazione dell'espressione genica del virus e giocano un ruolo importante nella morfogenesi e nel rilascio delle particelle virali infettive (6) (tabella 2.1).

Geni HIV	Proteine codificate e relativo ruolo nel ciclo virale
gag	<u>Proteine del core virale</u> p24: proteina capsidica più importante p17: proteina della matrice p9: lega l' RNA virale p7: lega l' RNA virale
env	<u>Glicoproteine dell'envelope virale</u> gp120: proteina più importante dell' <i>envelope</i> , responsabile del legame del virione alla superficie delle cellule CD4+ gp41: media la fusione dell'envelope virale alla membrana cellulare
pol	<u>Trascrittasi inversa</u> : converte il singolo filamento di RNA virale in doppio filamento di DNA <u>Integrasi</u> : integra il DNA virale nel genoma della cellula ospite <u>Proteasi</u> : taglia la poliproteine precursori del <i>core</i> in proteine attive
tat	<u>Proteina Tat</u> : ruolo regolatorio, funzione di transattivazione in grado di intensificare l'espressione dei geni virali
rev	<u>Proteina Rev</u> : regolazione dell'espressione di geni con azione strutturale ed enzimatica; essenziale per la trascrizione dei geni <i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>env</i>
vif	<u>Proteina Vif</u> : ruolo importante nella fase di maturazione virale e nella fase infettiva
vpu	<u>Proteina Vpu</u> : interviene nella maturazione e liberazione del virus
nef	<u>Proteina Nef</u> : proteina regolatoria, esplica un'azione inibitrice della trascrizione legandosi alla regione RN dei LTR
vpr	<u>Proteina Vpr</u> : si sospetta sia coinvolta nella riattivazione del virus in corso di infezione latente

Tab. 2.1 Geni di HIV. Elenco dei geni del virus con il rispettivo ruolo biologico

Agli estremi dei geni sopra descritti, si trovano due sequenze di controllo della regolazione trascrizionale, chiamate “*Long Terminal Repeats*” (LTR). Le LTR sono costituite da numerose regioni ripetute e includono due sequenze *enhancer*, tre sequenze di legame per fattori di trascrizione come SP1 e NF- κ B, la sequenza regolatrice TATA e la sequenza di transattivazione TAR, dove si va a legare la proteina Tat (7).

2.1.2 CICLO VITALE DEL VIRUS

Il ciclo virale ha inizio con l'interazione di una proteina della membrana esterna del capsid virale (*gp120*), con CD4, uno specifico recettore di superficie delle cellule T-helper dell'organismo ospite (8, 9). Questo processo rende possibile l'entrata del virione nel citoplasma della cellula, dove la trascrittasi inversa, un enzima fornito dal virus, inizia la sintesi del DNA provirale a doppia elica a partire dalla singola catena di RNA che costituisce il genoma virale. Il DNA lineare così formato migra dal citoplasma al nucleo dove un altro enzima virale, l'integrasi, lo lega covalentemente al cromosoma della cellula ospite producendo in questo modo il provirus dell'HIV (10). Il provirus è quindi replicato come parte del genoma dell'ospite e viene trasmesso a tutte le cellule nate dalla divisione cellulare della prima cellula infettata. A questo punto la RNA polimerasi cellulare trascrive anche il provirus dando così vita sia al genoma che a mRNA virali. L'mRNA subisce in seguito alcune modificazioni post-trascrizionali e la traduzione in proteine virali da parte dell'apparato proteico cellulare.

Nel processo di assemblaggio della particella virale, due copie di RNA genomico a singola catena vengono incorporate nel virione. Durante il rilascio del virus attraverso la membrana plasmatica cellulare interviene infine la proteasi, enzima capace di idrolizzare le poliproteine presenti sulla superficie del virus per produrne la forma matura necessaria per l'infezione di altre cellule (11).

Il ciclo vitale del virus appena descritto è rappresentato schematicamente in figura 2.3.

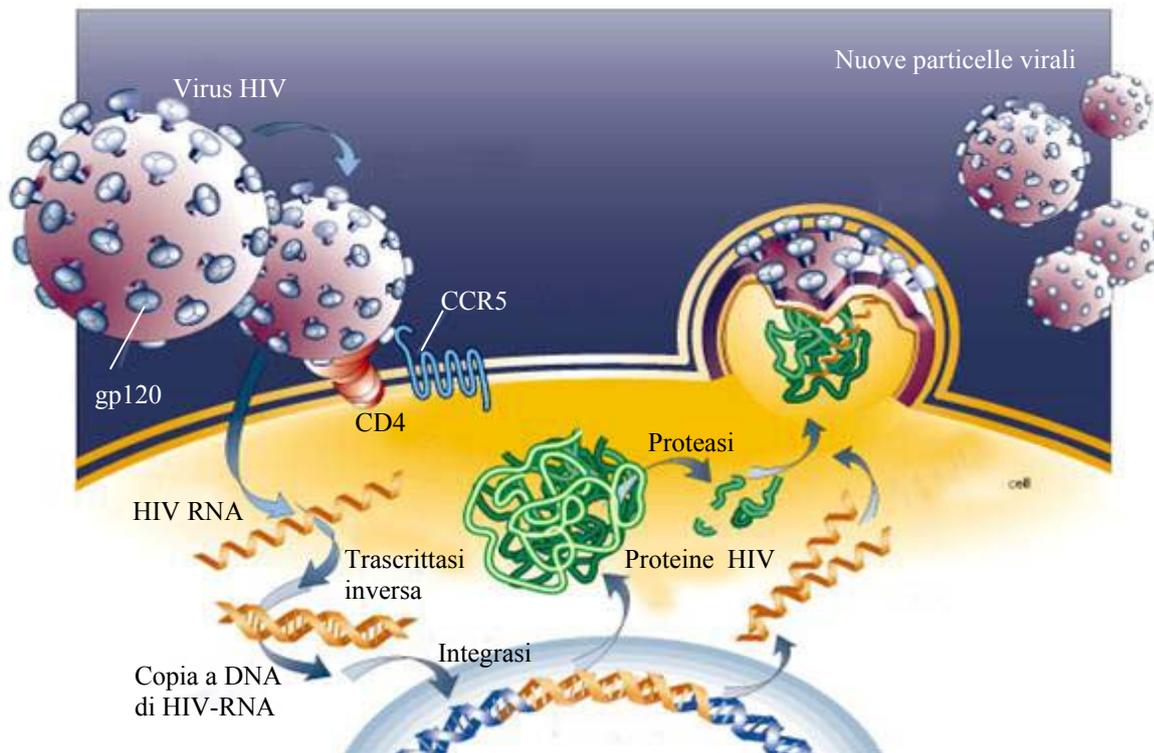


Fig. 2.3 Rappresentazione del ciclo virale dell'HIV-1 schematizzata e proiettata in una cellula T-helper infettata.

2.1.3 APPROCCI TERAPEUTICI CONTRO L'HIV

Un buon numero di elementi del ciclo vitale dell'HIV rappresentano validi *target* di interesse farmacologico mirato e in tal senso sono stati numerosi gli approcci terapeutici fino ad ora tentati (12).

Le principali categorie di farmaci contro il virus possono essere classificate nel seguente modo:

Inibitori nucleosidici (NRTIs) della trascrittasi inversa.

Si tratta di farmaci che impediscono l'azione dell'enzima trascrittasi inversa, la cui funzione è quella di retrotrascrivere l'RNA virale in un doppio filamento di DNA lineare, che può essere successivamente inserito nel DNA ospite. Quando la trascrittasi inversa viene bloccata non si ha la conversione del filamento del DNA in RNA e le particelle virali vengono distrutte. Il primo analogo nucleosidico introdotto in terapia fu l'Azidotimidina (AZT), approvato nel 1987 dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento dell'AIDS (13).

Inibitori non nucleosidici (NNRTIs) della trascrittasi inversa

Introdotti nel 1986 utilizzano un diverso meccanismo rispetto ai NRTIs per bloccare la trascrittasi inversa; infatti data la loro natura non nucleosidica, piuttosto che integrarsi nel DNA trascritto, legano direttamente la trascrittasi inversa ad un sito allosterico bloccandone in questo modo l'attività (14). Contrariamente ai NRTIs sono attivi nella forma in cui sono somministrati e quindi non necessitano di fosforilazione per essere attivi. Ne sono disponibili diversi e il più utilizzato è la Nevirapina. Lavorano in maniera ottimale se usati in combinazione con i NRTIs, poiché insieme sono in grado di diminuire la resistenza farmacologica in tutti quei casi in cui il virus risulta mutato, apportando quindi migliori effetti terapeutici.

Inibitori delle proteasi

Le proteasi sono fondamentali per la formazione di un nuovo virione. Una volta che il DNA provirale è integrato nel DNA della cellula ospite, questa è in grado di trascrivere e tradurre una proteina che deve essere tagliata per permettere la maturazione della particella virale. Questo taglio avviene grazie alle proteasi, che sono quindi responsabili della maturazione del virione. Farmaci in grado di inibirle non solo producono particelle virali non infettive, ma preservano la cellula da formazione di nuovi virioni. Molto più potenti delle categorie sopra elencate, gli inibitori peptidomimetici delle proteasi producono una drammatica diminuzione dei livelli di HIV nel sangue. Il Saquinavir è stato il primo inibitore della proteasi approvato nel 1995 (15).

Inibitori della fusione

Questa è una categoria recente di farmaci capace di bloccare il primo step dell'infezione virale: l'entrata del virus nella cellula ospite. L'ingresso di HIV comprende tre passaggi: 1) il legame con il recettore cellulare CD4; 2) il legame con il recettore per le chemochine; 3) la fusione della membrana. Il primo inibitore di fusione approvato dalla FDA americana nel 2003 è chiamato Enfuvirtide. Questo farmaco è un peptide di 38 aminoacidi che si lega alla porzione gp41 dell'HIV e in questo modo inibisce la fusione del virus con la membrana cellulare.

2.1.4 NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE: IL PROCESSO DI TRANSATTIVAZIONE

A tutt'oggi i problemi maggiori riscontrati nel trovare una cura definitiva all'AIDS sono la velocissima capacità del virus di mutare e di acquisire resistenza ai nuovi farmaci, creando nuove vie per aggirare il blocco causato dagli inibitori. È per questo che le strategie per inibire la diffusione dell'infezione si basano su nuovi specifici approcci molecolari ed un target particolarmente interessante per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche anti-retrovirus è rappresentato appunto dal meccanismo di transattivazione.

Tale processo è un buon bersaglio per terapie anti-HIV poiché, oltre ad essere direttamente coinvolto nel processo di replicazione del virus, implica proteine virali molto conservate in virus HIV che infettano specie animali diverse (16).

L'infezione da HIV è caratterizzata da un lungo periodo di latenza, durante il quale la RNA polimerasi a livello delle LTR forma dei complessi trascrizionali che vengono terminati prematuramente. In questo stadio intervengono proteine virali e fattori cellulari che permettono livelli basali di espressione genica dell'HIV, con produzione di piccole quantità di nuove proteine virali fra cui Tat, Rev e Nef.

Tat è una proteina di 101 aminoacidi, ricca di arginine, conservata in tutti i lentivirus che infettano i primati (17); si tratta di un attivatore trascrizionale atipico poiché non si lega ad una sequenza di DNA, ma ad uno specifico RNA, TAR, che si trova vicino al promotore (18-21).

La proteina Tat è codificata da due esoni: gli aminoacidi codificati dal primo esone (aminoacidi dall'1 al 72) sono necessari sia per il legame alla sequenza target di mRNA, che per l'attivazione della trascrizione. Il secondo esone contiene le informazioni necessarie per attivare le differenti funzionalità patogenetiche dell'HIV e quella immunosoppressiva di Tat.

È stato dimostrato che sono sufficienti 86 aminoacidi per mantenere tutte le funzioni di questa molecola, compresa la propagazione dell' HIV *in vivo* (22) e tale minima porzione attiva è suddivisa in 6 distinti domini (figura 2.4):

- **1-21:** dominio N-terminale caratterizzato da residui idrofilici ed idrofobici arrangiati in modo periodico. L'elevata concentrazione di prolina in questa regione può avere il ruolo di impedire la degradazione di Tat da parte delle proteasi;

- **22-37**: dominio ricco di residui di cisteina, che formano un motivo ben conservato nei diversi sottotipi di HIV-1. È stato sperimentalmente osservato che la delezione di tale regione porta ad una riduzione della capacità transattivante di Tat (23), probabilmente perché responsabile dell'interazione con numerosi co-fattori cellulari [Jeang, 1996b #98];
- **38-48**: “core” di dieci amminoacidi idrofobici estremamente conservato. Di particolare importanza il residuo di lisina 41, la cui delezione porta al mancato riconoscimento della sequenza TAR con conseguente perdita dall'attività transattivante (23);
- **49-59**: dominio basico, contenente sei arginine (*Arginine Rich Region*), e due lisine, caratteristico della famiglia delle proteine RNA-leganti e responsabile dell'interazione con la sequenza TAR, la cui delezione porta a perdita di attività della proteina (24, 25). Tale regione è inoltre coinvolta nella capacità di Tat di attraversare le membrane cellulare e nucleare (26);
- **60-72**: regione meno conservata, ricca di glutammina che forma un' α -elica quando Tat interagisce con TAR.

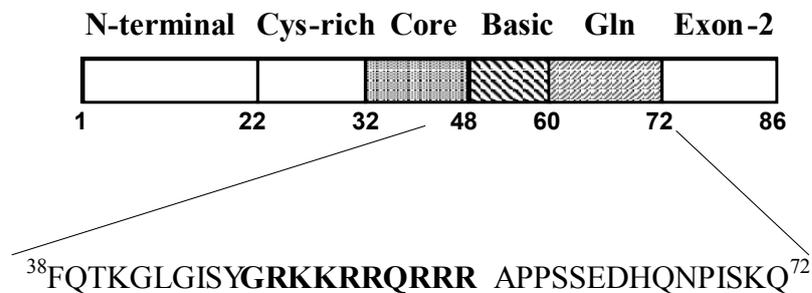


Fig. 2.4 Rappresentazione schematica della proteina Tat di HIV.

Come accennato prima, Tat esplica la sua funzione interagendo con la sequenza target di mRNA, TAR (*Trans-Activation Responsive Region*). Il TAR RNA (figura 2.5) è una struttura a *stem* e *loop* di 59 nucleotidi, situata all'estremità 5' di tutti i nuovi trascritti virali (27). Tale struttura a RNA è caratterizzata da un anello (*loop*) di sei nucleotidi, separato tramite una regione a doppia elica (*stem*) da un *bulge*, il quale è costituito da una sequenza di tre nucleotidi UUU o UCU. Il *bulge* del TAR rappresenta il sito di

legame per Tat, mentre il *loop* risulta essenziale per la trans-attivazione e il legame del complesso Tat/ciclina T1 (28).

Numerosi studi di mutagenesi e legame con peptidi hanno contribuito a chiarire le caratteristiche dell'interazione proteina-RNA. Si è potuto determinare che la proteina Tat si lega direttamente alle basi U23, U38 e U40 nel solco maggiore dell'RNA e che durante questa interazione si trova in stretta vicinanza all'O6 di G21 e G26 ancora nel solco maggiore dell'RNA (29, 30).

La regione basica di Tat è direttamente coinvolta nel legame con il TAR. Mediante studi di delezione si è evidenziato che la regione compresa fra gli amminoacidi 38 e 72, contenente la porzione basica di Tat, è da sola in grado di legarsi all'RNA, con affinità comparabile al peptide completo (24), mentre la porzione compresa tra gli amminoacidi 48 e 57, ricca di residui basici di arginine, rappresenta la regione necessaria e sufficiente per il legame al bulge del TAR (31-33). In particolare le lisine contribuiscono alla formazione del complesso tramite interazioni elettrostatiche, mentre le arginine, in particolare l'arginina 52, inducono in TAR la conformazione funzionale (34). Infine il dominio ricco in cisteine sembra implicato nel legame con le proteine cellulari che interagiscono con il *loop* dell'acido nucleico (31). Mediante esperimenti di *cross-linking* si è determinato che, durante il complessamento con il TAR, l'amminoacido in posizione 57 del peptide si trova in stretta vicinanza al nucleotide in posizione 31 nel *loop* della struttura di acido nucleico (30).

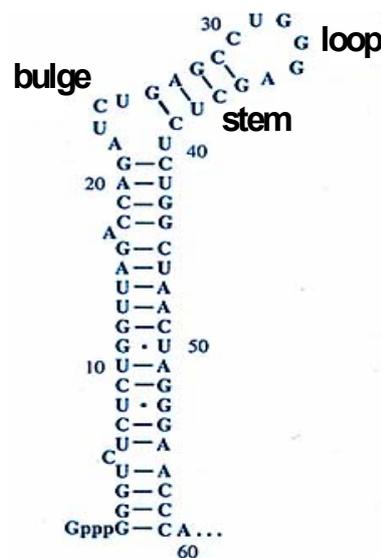


Fig. 2.5 Struttura del TAR RNA.

In assenza di Tat, le tre basi che formano il bulge di TAR mostrano un alto grado di flessibilità che permette al bulge stesso di assumere numerose conformazioni, ma solamente quella Tat-indotta risulta funzionale.

Studi di *molecular modeling* mostrano la variazione conformazionale che TAR subisce in seguito all'interazione con Tat (figura 2.6): in assenza di Tat, le basi U23, C24 e U25 sono impilate su A22 e formano il *bulge*; in presenza di Tat, o di un residuo di arginina, il *bulge* viene disorganizzato, ovvero U23 si muove in direzione di G26 e gli altri due nucleotidi vengono spinti ulteriormente fuori. Il gruppo guanidinico dell'arginina 52 interagisce, a livello del bulge, con il residuo U23 ed, in prossimità di esso, con i residui G26 e A27, i quali risultano quindi fondamentali per la formazione del complesso Tat-TAR (29, 35).

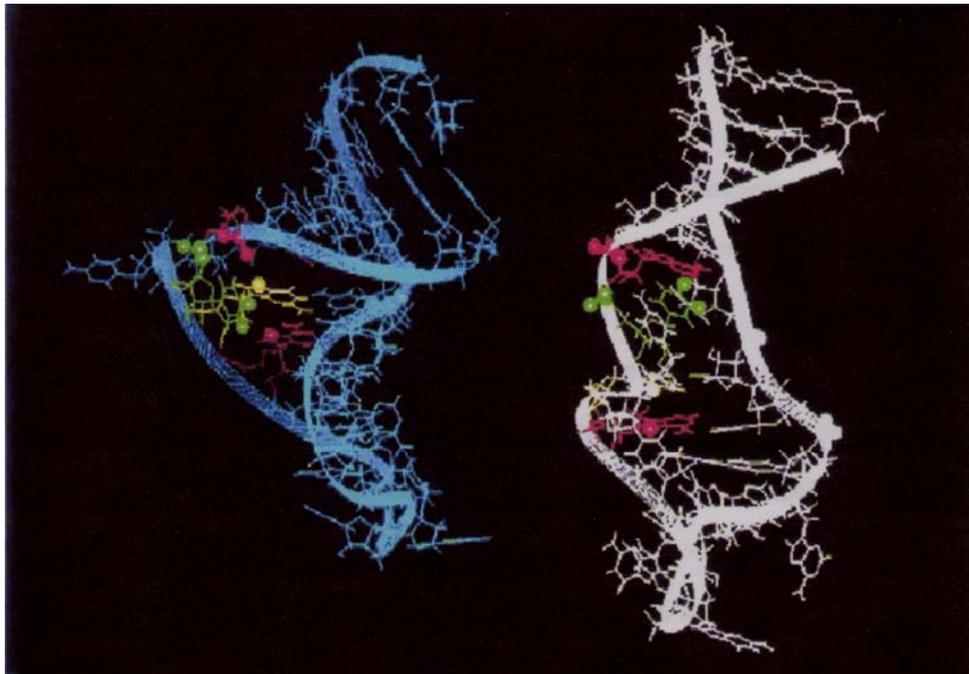


Fig. 2.6 Rappresentazione del solco maggiore del TAR libero (sinistra) e legato a Tat (destra). Vengono identificati i gruppi essenziali ai fini del legame di Tat. A22 e A27 sono rappresentati in rosso; U23 in verde; G26 in giallo.

L'interazione di Tat con i fattori cellulari, quali la chinasi ciclino-dipendente CDK9 e la ciclina T1, è di fondamentale importanza per il suo riconoscimento ad alta affinità con TAR, così da aumentare la processività dell'RNA polimerasi II. In caso contrario, l'elongazione trascrizionale dell'mRNA virale terminerebbe appena dopo la sintesi di brevi trascritti (36). In assenza di Tat, la trascrizione ha infatti inizio, ma perde di

efficienza poiché il promotore richiama polimerasi scarsamente processive che si staccano prematuramente dal DNA stampo.

Il processo trascrizionale può essere quindi così riassunto (figura 2.7): le prime fasi del processo trascrizionale sono regolate da numerosi fattori cellulari, chiamati fattori basali di trascrizione (TFII D-B-F-E-H), i quali, per interazione con specifiche sequenze a livello del promoter virale, danno luogo, insieme all'RNA polimerasi II, alla formazione di un complesso di elongazione "competente" (37). La fosforilazione dell'estremità carbossi-terminale della polimerasi ad opera della chinasi CDK7, una componente del fattore di iniziazione TFIIH, consente la *clearance* del promoter e l'inizio della trascrizione di TAR, che assumendo la sua caratteristica struttura *stem-loop* richiama Tat a livello del complesso di trascrizione. L'interazione tra Tat e TAR coinvolge anche il cofattore cellulare TAK, una chinasi associata a Tat (38), con formazione di un complesso ternario Tat-TAR-TAK. Questo cofattore, identico a P-TEFb, un fattore positivo di elongazione trascrizionale (39), contiene la subunità chinasi CDK9 e la ciclina T1 chinasi dipendente (40). Il CDK9 iperfosforila il dominio carbossi-terminale dell'RNA polimerasi II, permettendo così un'efficiente processività.

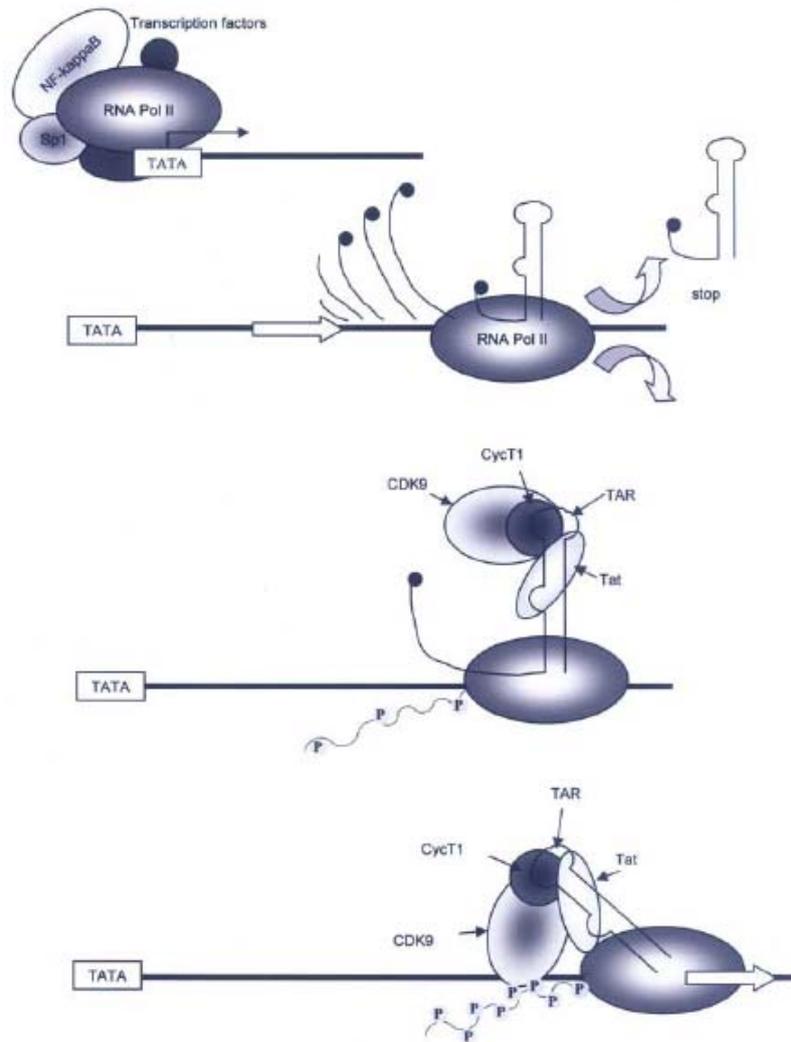


Fig. 2.7 Interazione TAR-Tat ed effetto sulla RNA polimerasi II.

Tat oltre a svolgere la sua azione di transattivatore della trascrizione genomica virale nel nucleo della cellula ospite, a livello extracellulare mostra un'attività pleiotropica (41). Tat è l'unica proteina dell'HIV che viene attivamente rilasciata dalle cellule infette (42) e che ha la capacità di legarsi alla superficie delle cellule non infette attraverso l'interazione con i recettori per le chemochine (43), con le integrine di superficie (44) o mediante interazioni elettrostatiche (45). È in grado di entrare nelle cellule infettate, in fase latente, attivando la trascrizione del genoma virale, e di indurre l'espressione dei corecettori per il virus, promuovendone la diffusione. Inoltre è stato sperimentalmente osservato che le cellule che possiedono Tat mostrano una ridotta risposta T-linfocitica agli stimoli antigenici, un'iperproduzione di interferone- α , e un incremento della replicazione di HIV-1 (46, 47). A livello extra-cellulare promuove la distruzione dei

linfociti T, aumentando l'espressione del ligando di Fas (CD95L) in monociti e macrofagi ed incrementando la sensibilità cellulare agli effetti di questa molecola (48).

Tat risulta inoltre implicata, in qualità di neurotossina, nella patogenesi della demenza da AIDS. Sembra inoltre responsabile dell'aumentata incidenza di tumori nei malati di AIDS, per la sua capacità di indurre neovascolarizzazione (42). Favorisce le infezioni secondarie, attivando la trascrizione del genoma del virus dell'herpes 8, dell'epatite C e del citomegalovirus (49), ed infine induce *up-regulation* di un ampio spettro di citochine, chemochine, fattori di crescita e dei loro recettori.

Pertanto il ruolo di Tat nella patogenesi dell'HIV non è solo quello di promuovere la replicazione virale in cellule già infettate, ma anche quello di tossina extra-cellulare (50), in quanto aumenta la diffusione del virus riducendo l'immunità antivirale.

2.1.5 INIBIZIONE DEL LEGAME TAT-TAR

Il meccanismo di transattivazione Tat-mediato rappresenta un target particolarmente attraente per lo sviluppo di nuovi farmaci antiretrovirali in quanto la proteina Tat non solo è richiesta per l'espressione virale dei geni durante la crescita esponenziale del virus, ma è essenziale durante la fase di attivazione del genoma provirale integrato (51). Inoltre, dato che TAR è una regione di RNA ben conservata, non presente nelle cellule umane, composti che interagiscono a questo livello o comunque impediscono la formazione del complesso Tat-TAR sono da considerare buoni candidati per lo sviluppo di nuovi farmaci selettivi anti-HIV.

L'inibizione della transattivazione mediata da Tat potrebbe essere ottenuta dal *targeting* selettivo di elementi fra i fattori virali e cellulari che modulano il processo. Sono stati già identificati numerosi inibitori del complesso Tat-TAR, secondo un approccio peptidomimetico o tramite screening di librerie combinatoriali di peptidi, oligonucleotidi antisenso, antibiotici aminoglicosidici, steroidi e composti strutturalmente più semplici quali poliamidine aromatiche (52). Molti di tali composti mostrano però un profilo farmacologico inadeguato per un potenziale utilizzo terapeutico (53), presentando notevoli limiti di bassa biodisponibilità e/o tossicità, tali da precluderne lo sviluppo.

Per quanto riguarda lo sviluppo di agenti diretti nei confronti del TAR-RNA, i composti potrebbero quindi essere riassunti nelle seguenti categorie:

Inibitori basati su peptidi

Il primo approccio è stato lo sviluppo di diversi peptidi analoghi al dominio di legame all'RNA di Tat, al fine di ottenere un'interazione selettiva con il *bulge*. Tali peptidi si sono dimostrati abili nel bloccare la transattivazione (54, 55) e, a partire dai primi analoghi del Tat, si sono sviluppate successivamente strutture peptidiche non naturali, come peptoidi (56), e agenti peptidomimetici (57, 58), generalmente più idonee dei peptidi naturali per le applicazioni farmacologiche.

Inibitori basati su oligonucleotidi

Oligonucleotidi e loro derivati sono stati studiati come potenziali inibitori della transattivazione grazie alla loro abilità a formare interazioni sequenza-specifiche con il target RNA-TAR e quindi impedire il legame di Tat e/o altri fattori cellulari.

Una classe di oligonucleotidi studiati a tale scopo sono gli oligonucleotidi antisense complementari alla struttura *stem-loop* di TAR, che si sono dimostrati i più potenti tra gli inibitori antisense aventi HIV-1 come target (59, 60); recentemente è stata proposta una nuova classe di inibitori antisense diretti all'LTR di HIV-1 e legati ad un dominio catalitico in grado di inibire efficacemente la replicazione virale in cellule eucariotiche (61, 62). Oltre agli oligonucleotidi antisense, è stato individuato attraverso selezione in vitro un aptamero a RNA diretto verso il TAR, in grado di effettuare un complesso *loop-loop* (63-65).

Infine una terza classe di oligonucleotidi diretti verso il TAR è rappresentata dagli RNA interfering (RNAi), corti frammenti (21-23 residui) di RNA a doppio filamento che mediano la degradazione sequenza-specifica di un mRNA target. Lo sviluppo degli RNAi antivirali è molto recente, ma alcuni studi hanno riportato alcuni RNAi diretti verso il TAR, in grado di ridurre efficacemente la produzione virale (66, 67).

Piccole molecole non peptidiche

In questi ultimi anni la ricerca farmaceutica ha volto la sua attenzione all'inibizione della trascrizione dell'mRNA virale attraverso l'interazione di piccole molecole a livello di TAR facendo emergere numerose molecole interessanti come potenziali antivirali, alcune delle quali verranno di seguito descritte.

2.1.5.1 Requisiti per l'interazione con il TAR

La struttura cristallografica del complesso Tat-TAR non è stata ancora risolta, tuttavia un importante contributo alla comprensione della natura di questo complesso proteina-RNA è derivato da studi biochimici ed analisi NMR. Si hanno a disposizione numerosi dati circa la struttura 3D dell'HIV-TAR libero (35) o complessato con inibitori peptidici e non peptidici, che hanno fornito informazioni dettagliate sul sito di legame del TAR e sulle modifiche alle quali va incontro in seguito ad interazione con gli opportuni ligandi. Un esempio è rappresentato dall'Argininamide (figura 2.8), una piccola molecola che, grazie alla sua semplice struttura, è il ligando di TAR più investigato, sia per individuare la conformazione dell'RNA nel legame con Tat, che per identificare i nucleotidi del TAR stesso coinvolti in tale interazione.

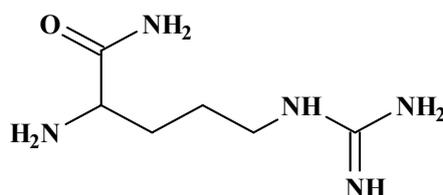


Fig. 2.8 Struttura chimica dell'Argininamide

Studi di dinamica molecolare effettuati sul complesso TAR-Argininamide hanno mostrato che, nella conformazione complessata, si viene a formare una tripletta di basi U23-A27-U38, come mostrato schematicamente in figura 2.9. Questa tripletta risulta coinvolta nel legame al ligando, in quanto tale configurazione stabilizza il complesso attraverso interazioni catione- π , che coinvolgono i residui all'interfaccia delle due eliche e promuovono la formazione di legami ad idrogeno [Long, 1995 #24; Dougherty, 1996 #122]. Inoltre, da tali studi è emersa l'importanza delle interazioni elettrostatiche tra il gruppo guanidinico dell'Argininamide e i gruppi fosfato dei residui U23 e A22 del *bulge* di TAR (68).

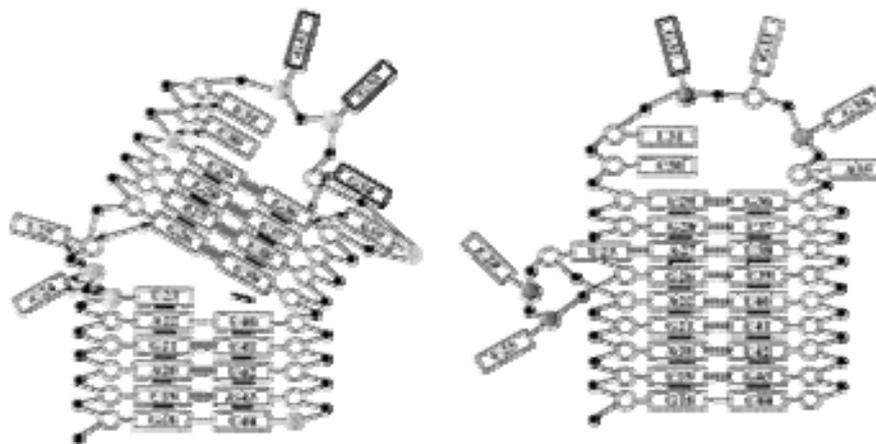


Fig. 2.9 Rappresentazione schematica del TAR-RNA nella sua forma non complessata (sinistra) e complessata (destra).

Molecole come l'Argininamide, che mimano il dominio basico di Tat, inducono un cambiamento nella conformazione globale del TAR (35, 69), che prevede il legame al *bulge* e ai nucleotidi in prossimità di esso. L'angolo medio tra le due regioni a doppia elica viene così modificato da circa 47° nel TAR libero a 11° nel TAR complessato, portando ad un blocco della flessibilità inter-elica caratteristica del TAR non legato, con conseguente stabilizzazione dell'intera conformazione (figura 2.10).

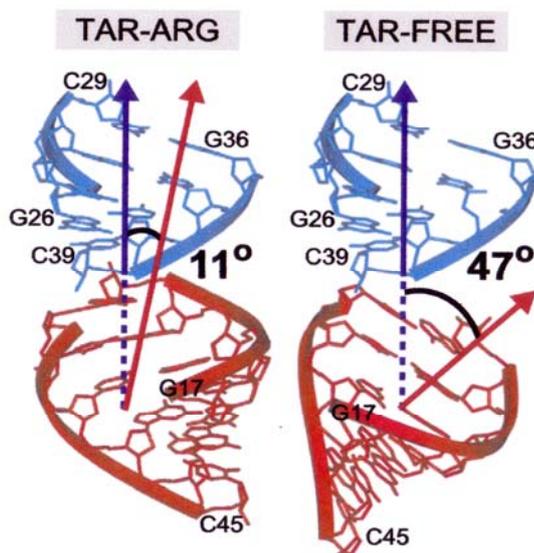


Fig. 2.10 Modificazione conformazionale di TAR in presenza di Argininamide.

Le diverse conformazioni del TAR costituiscono un attraente bersaglio per inibitori sintetici in grado di bloccarlo in una conformazione non funzionale. Come detto prima, dagli studi biochimici e dall'analisi NMR sono emersi i requisiti strutturali

indispensabili per l'interazione con il TAR e tali indicazioni stanno tutt'ora guidando il disegno e la sintesi di molecole con affinità e specificità per questa struttura a RNA.

Tali requisiti strutturali sono:

- una testa protonabile che, in analogia alla regione basica ricca di arginine di Tat, permette il riconoscimento del *bulge* tramite interazioni elettrostatiche e/o catione- π . In realtà studi recenti suggeriscono la necessità di due gruppi protonabili, in grado di stabilizzare le due tasche a potenziale fortemente elettronegativo presenti a livello del *bulge* di TAR, posizionate sopra e sotto il residuo nucleotidico U23 (70). In contrasto quindi con l'osservazione che una singola molecola di Argininamide è richiesta per l'interazione con il *bulge*, numerose evidenze sperimentali, confermano la necessità di due specifiche interazioni elettrostatiche per stabilizzare il TAR in una conformazione non funzionale (71-73). Oltre alle interazioni elettrostatiche, anche la capacità di formare legami ad idrogeno, viene considerata importante ai fini della riconoscimento del TAR.
- Gruppi aromatici capaci di interagire in prossimità del *bulge* di TAR o di legarsi al solco maggiore, che concorrono a rafforzare il legame tramite interazione di *stacking*.

2.1.5.2 Piccole molecole in grado di inibire il complesso Tat-TAR

Come detto precedentemente, negli ultimi anni, l'interesse della ricerca farmaceutica, nel campo dell'inibizione della trans-attivazione virale, è stato diretto verso lo sviluppo di piccole molecole inibitrici del legame Tat-TAR, in alternativa allo studio di agenti peptidici o peptidomimetici, caratterizzati dai ben noti problemi di biodisponibilità.

In letteratura troviamo diversi lavori sullo studio del legame di diverse classi di composti al TAR e sostanzialmente potremmo distinguere in due grandi famiglie i composti diretti verso il TAR, in base alle loro modalità di interazione: le molecole in grado di intercalarsi nelle zone a doppio filamento dell'RNA, presumibilmente in prossimità del *bulge* e quelle che invece interagiscono direttamente a livello del *bulge* effettuando *stacking*.

A tale scopo sono stati sviluppati e studiati diversi agenti in grado di intercalarsi a livello del doppio filamento dell'RNA ed in particolare si è cercato di rendere tale legame selettivo per il TAR stesso, direzionando l'interazione a livello della zona del

bulge. Sono quindi stati sviluppati ligandi caratterizzati da una porzione eterociclica, alla quale è legata tramite un *linker*, una porzione carica positivamente in grado di interagire con lo scheletro fosfato dell'RNA.

Diversi lavori riportati in letteratura descrivono la capacità di classici agenti intercalanti del DNA, come etidio bromuro, proflavina e DAPI, di legare fortemente l'RNA-TAR (74).

A partire da questi studi sono stati investigati per l'interazione con il TAR altri derivati intercalanti, come un derivato del bisbenzimidazolo, Hoechst 33258 (75) ed alcuni coniugati etidio-arginina (76). Questi ultimi composti sono stati disegnati per coniugare la capacità dell'etidio a formare complessi stabili con l'RNA, con la capacità dell'arginina stessa e di arginino-derivati ad interagire a livello del *bulge* pirimidinico, allo scopo di ottenere molecole bifunzionali in grado di legare fortemente e specificatamente l'RNA-TAR nella forma inattiva, interferendo così con la formazione del complesso. A tal fine è stata sintetizzata una serie di molecole contenenti un residuo di arginina in grado di interagire con i nucleotidi U23, C24 e U25 del bulge, una porzione intercalante rappresentata dall'etidio, che intercala tra le coppie di basi C18-G44 e C19-G43, ed uno spaziatore che connette le due porzioni della molecola leganti l'RNA. In figura 2.11 è schematicamente rappresentata la modalità di legame al TAR appena descritta.

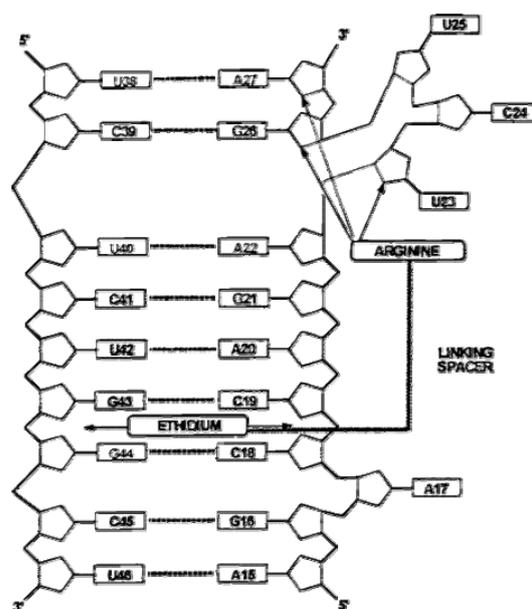


Fig. 2.11 Rappresentazione schematica del processo di interazione con il TAR di derivati etidio-arginina coniugati

Un'altra classe di composti analizzati per il legame all'RNA è rappresentata dai cosiddetti *Threading Intercalators*, intercalanti caratterizzati da un nucleo poliaromatico disostituito con due catene cariche disposte in direzioni opposte. Il processo intercalativo di tali composti prevede l'inserzione della porzione eterociclica tra le basi del doppio filamento di acido nucleico, localizzando i due distinti sostituenti nei due solchi dell'elica. Affinché tale processo intercalativo sia reso possibile è necessario il passaggio attraverso il duplex, che richiede una apertura transiente della doppia elica a livello del sito di legame. Tale processo può avvenire preferenzialmente in zone dinamiche dell'RNA *target* ed è questo il motivo per cui un buon bersaglio di tali composti potrebbe essere rappresentato dall'RNA con la sua struttura flessibile *bulge-loop*.

In questa categoria possiamo inserire i così detti coniugati peptide-intercalanti (PIC: *Peptide-Intercalator Coniugate*), piccole molecole in grado appunto di legare il doppio filamento di RNA con alta affinità e selettività, il cui processo intercalativo è schematizzato in figura 2.12.

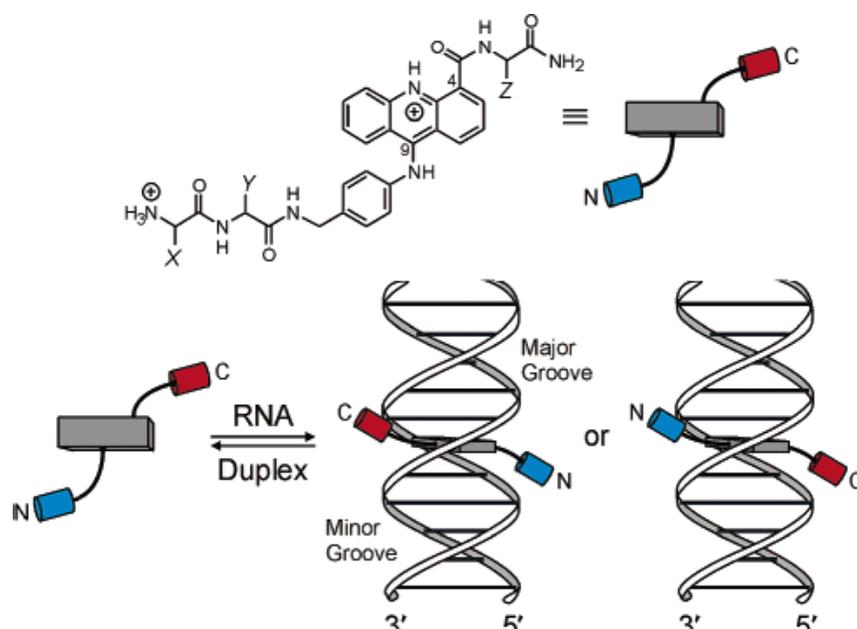


Fig. 2.12 Rappresentazione schematica del processo di *threading intercalator* da parte dei *Peptide-Intercalator Coniugate* (PIC).

Come accennato prima, oltre ai composti che interagiscono con l'RNA-TAR tramite un processo intercalativo, possiamo considerare un'altra importante classe di composti,

rappresentata da molecole che si inseriscono a livello del bulge del TAR dove effettuano interazioni di *stacking* con le basi qui presenti.

A questa categoria appartengono alcuni tra i più potenti inibitori della transattivazione Tat-mediata, rappresentati da derivati acridinici, caratterizzati sia da catene con gruppi amminici che da anelli aromatici planari (77). Il composto più attivo di questa classe è il composto CGP40336A (figura 2.13), il quale risulta il migliore ligando di TAR fino ad ora individuato. Tale derivato inibisce competitivamente la formazione del complesso Tat-TAR in vitro (saggi EMSA) con un valore di $IC_{50}=22$ nM, mentre è capace di bloccare l'espressione dell'HIV nei saggi di transattivazione in vivo, con una $IC_{50}=1.2$ μ M (56). La struttura di tale composto può essere schematicamente rappresentata come mostrato in figura 2.13. Esso è infatti costituito da una porzione policromatica/eterociclica (porzione A), potenzialmente in grado di interagire tramite *stacking* nella cavità del TAR delimitata dai nucleotidi U23, A22 e G26; una funzionalità carica positivamente (porzione C), che interagisce con lo scheletro fosfato dell'RNA e uno *spacer* (porzione B) che connette le due porzioni appena descritte.

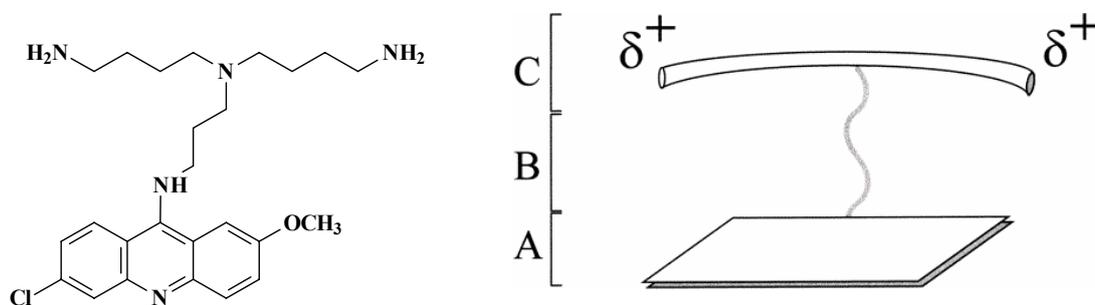


Fig. 2.13 a) Struttura chimica del composto CGP 40336A. **b)** Rappresentazione schematica della struttura del composto CGP40336A, consistente in tre distinte porzioni: una porzione aromatica per l'interazione di *stacking* (A), un *linker* alifatico (B) e la porzioni policationica che prende contatto con lo scheletro fosfato (C).

Studi di NMR bidimensionale hanno indicato un'interazione del composto con le basi G26-C39 del TAR RNA; emerge inoltre l'esistenza di un legame ad idrogeno tra il gruppo NH acridinico e l'N7 del residuo di guanina, mentre un secondo legame ad idrogeno è stato ipotizzato tra il metossile ed il gruppo amminico della citosina. Un'interazione di *stacking* con il bulge di TAR viene infine ipotizzata per la porzione eteroaromatica (78).

Sempre tra i composti in grado di interagire con il TAR mediante stacking, possiamo considerare due serie di composti sintetizzati come potenziali inibitori di TAR, all'inizio del 2004 dal gruppo di Karn (79, 80). Il composto rbt203 (figura 2.14), il più attivo della prima serie, è in grado di promuovere nel TAR la stessa conformazione indotta dall'argininamide e da un analogo peptidico di Tat, con affinità micromolare. Entrambe le catene laterali si posizionano nel solco maggiore di TAR ed interagiscono con il residuo U23 tramite un'interazione catione- π : i residui guanidinici delle catene R2 e R1 si posizionano rispettivamente al di sotto e al di sopra di tale residuo, mentre lo *scaffold* della molecola si alloggia a livello del solco maggiore perpendicolarmente agli anelli aromatici delle basi dell'RNA.

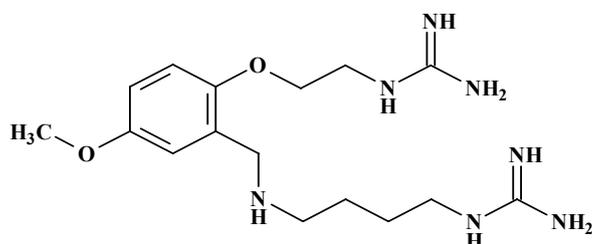


Fig. 2.14 Struttura chimica del composto rbt203

Per quanto riguarda la seconda serie, il composto più attivo è risultato essere l'rbt550 (figura 2.15), che prevede un nucleo indolico planare sostituito in posizione 4 con un anello benzenico, a sua volta disostituito con due catene laterali basiche. Il legame al TAR avviene con alta affinità, sempre in prossimità del *bulge*, dimostrando come i gruppi guanidinici ed amidinici, caratteristici della prima serie di molecole, possano essere vantaggiosamente rimpiazzati da altri residui protonabili come ad esempio quello piperazinico, di più facile sintesi. Tale composto è quindi in grado di stabilizzare il TAR nella conformazione inattiva attraverso interazioni di *stacking* della porzione indolica con una guanina (G) in posizione 26, un'adenina (A) in posizione 22 e un uracile (U) in posizione 40; le catene basiche interagiscono con i gruppi fosfato delle basi azotate del TAR-RNA mentre l'azoto benzilico di una delle due catene laterali basiche stabilisce un legame con l'uracile (U) in posizione 23.

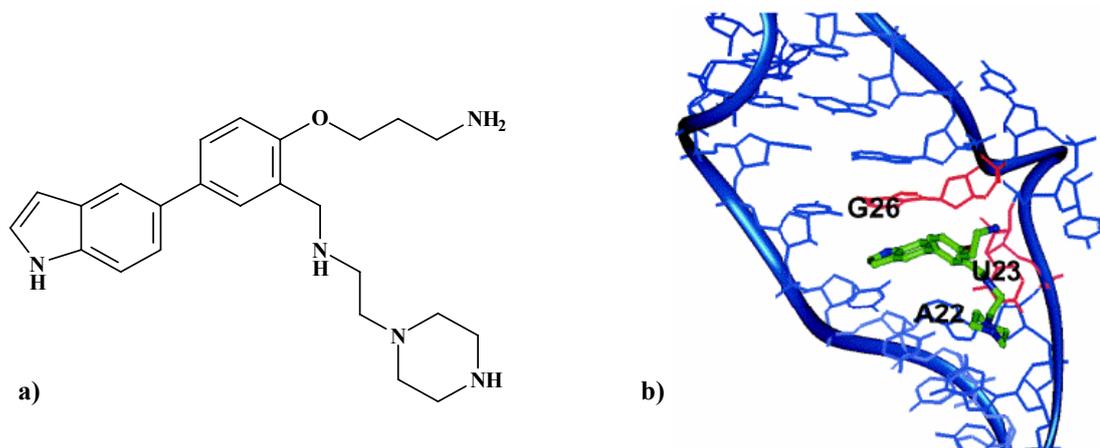


Fig. 2.15 a) Struttura molecolare del composto rbt550. b) Immagine di *molecular modeling* che descrive le interazioni che intervengono nella formazione del complesso TAR- rbt550.

Dai saggi effettuati sui derivati di entrambe le serie, al fine di valutare la loro capacità di inibire il complesso Tat-TAR, il miglior risultato è emerso proprio per il derivato rbt550, caratterizzato da una $K_i = 0.039 \mu\text{M}$. Lo studio di *docking* con TAR mostra che il nucleo biarilico interagisce con la coppia di basi G26-G39, mentre la restante parte della molecola si posiziona in prossimità dei residui U23 e A22 a livello del *bulge*. L'anello benzilico e il gruppo amminico, su cui è inserita la catena laterale R_2 , si adattano sotto il nucleo pirimidinico di U23, mentre il gruppo amminico terminale della catena R_1 interagisce con una delle due tasche elettronegative. La piperazina sembra invece essere implicata in interazioni elettrostatiche con la parte bassa dello *stem*.

Un'altra importante classe di piccole molecole verso cui la ricerca ha volto il suo interesse come potenziali inibitori del legame Tat-TAR è quella dei chinoloni.

I chinoloni sono farmaci antibatterici che agiscono bloccando il complesso tra l'enzima girasi e il cromosoma batterico ed in passato è stata avanzata l'ipotesi che possano legare anche acidi nucleici virali (81, 82). In effetti alcune molecole contenenti la struttura chinolonica (costituita da un nucleo che può essere benzopiridonico, naftiridico o piridopirimidinico), una porzione carbossilica e differenti sostituenti lipofili, furono testati contro il virus HIV-1, dimostrandosi efficaci nel trattamento o nella profilassi dell'AIDS. Il gruppo di Baba in particolare dimostrò un'inibizione potente e selettiva dell'infettività di HIV-1 da parte del fluorochinolone K12, la cui struttura è riportata in figura 2.16 (83). Tale composto è risultato in grado di ridurre la sintesi di mRNA virale

suggerendo che la sua attività si realizzasse nei confronti della trascrizione, senza notevoli effetti sull'affinità di Tat. Successivamente sono stati studiati derivati di K12 più potenti del progenitore in cellule cronicamente infettate, caratterizzati da sostituenti diidro-fenil-piperidinici in posizione 7 e con un meccanismo d'inibizione dell'espressione genica mediato, in parte, dall'inibizione funzionale di Tat (84).

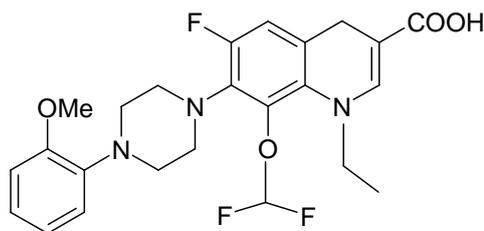


Fig. 2.16 Struttura del chinolone K-12.

Studi condotti sulle relazioni struttura-attività dei composti chinolonici hanno dimostrato la compatibilità con l'attività antibatterica di congeneri non aventi il classico sostituente fluoro in posizione 6 (85), che sono stati saggiati anche come antivirali. Di questi alcuni 6-aminochinoloni opportunamente modificati in posizione 7 si sono dimostrati in grado di inibire efficacemente lo sviluppo virale con $EC_{50} < 50$ nM su cellule infettate cronicamente (86). Il gruppo amminico in posizione 6 sostituito al posto del fluoro apporta non solo un incremento degli effetti antivirali su HIV-1, ma un effetto selettivo, in quanto la potenza risulta ridotta per l'*herpes simplex virus I* (HSV-1).

Si è pensato quindi che i derivati chinolonici opportunamente modificati, che avevano dimostrato attività anti-HIV, avessero un meccanismo d'azione riconducibile all'inibizione dell'interazione Tat-TAR, dovuta al legame del farmaco con la componente a RNA. In particolare, il 6-aminochinolone WM5 (figura 2.17) si è rivelato particolarmente attivo nell'inibizione della replicazione virale in cellule infettate ed il suo meccanismo d'azione è stato appunto ricondotto alla distruzione del complesso Tat-TAR con una IC_{50} nel range micromolare, in saggi *in vitro* (87, 88). Tale chinolone dimostra possedere un'elevata affinità per la regione *bulge* del TAR, accompagnata da una bassa affinità per il *loop* e per la regione a doppio filamento (88). Inoltre l'attività di questo chinolone è stata collegata alla presenza della funzione cheto-carbossilica in posizione 3-4 che, in presenza di ioni magnesio, può chelare il magnesio, fondamentale

per il corretto ripiegamento del TAR stesso (82). Comunque, come visto per gli analoghi del WM5, un eccesso di legame al magnesio porta ad un fenomeno di perdita di selettività per il virus, in quanto altri acidi nucleici, oltre al TAR, possono essere riconosciuti e legati, con un incremento della tossicità verso cellule non infettate.

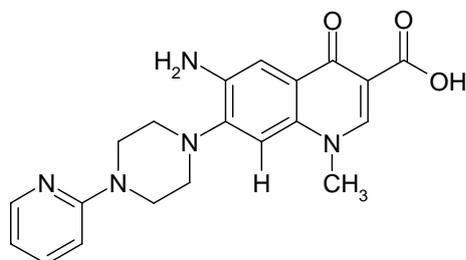


Fig. 2.17 Struttura del chinolone WM5.

A partire dal composto attivo WM5 sono stati sintetizzati oltre 100 derivati, che hanno permesso sia di ottenere altri composti attivi, che di identificare i requisiti strutturali responsabili dell'attività antivirale. In particolare la grande varietà di composti sintetizzati ha permesso di delineare uno studio SAR abbastanza dettagliato per la classe dei 6-aminochinoloni (89), riassunto di seguito (figura 2.18).

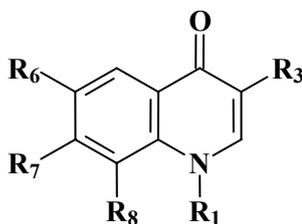


Fig. 2.18 Struttura del nucleo chinolonico con indicate le posizioni dei sostituenti.

-Posizione N-1: il metile è il sostituto ottimale ai fini di un'elevata potenza antivirale; comunque la sua sostituzione con gruppi poco ingombranti, come quello *c*-propilico, permette di mantenere l'attività antivirale. Composti caratterizzati da gruppi ingombranti in questa posizione risultano invece privi di attività antivirale ad una concentrazione inferiore a quella citotossica.

-Posizione C-3: la presenza del gruppo carbossilico è indispensabile per il mantenimento dell'attività antivirale; l'eliminazione di tale gruppo o la sostituzione con

il gruppo ammidico, chetonico, ossimico o nitrilico portano infatti ad annullamento dell'attività antivirale.

-Posizione C-6: il gruppo amminico risulta il migliore sostituente; l'introduzione di gruppi quali nitro, guanidinico, metilaminico o azoto endociclico ha sempre condotto ad una diminuzione dell'attività. Gli unici composti che hanno mostrato un'attività apprezzabile, accompagnata da una netta diminuzione della citotossicità, sono i derivati privi del sostituente in questa posizione, i 6-idrogeno chinoloni.

-Posizione C-8: a differenza di quanto avviene per i 6-fluorochinoloni, l'assenza di sostituenti in tale posizione permette di ottenere i composti più potenti; i vari gruppi introdotti (CH₃, OCH₃, F) infatti portano tutti ad annullamento dell'attività senza nessun miglioramento della citotossicità.

-Posizione C-7: è indispensabile la presenza di una adatta 4-arilpiperazina. I migliori anelli aromatici sono quello 2-piridinico, 2-trifluorometilfenilico, 2-benzotiazolico, 2-tiazolico, 2-pirazinico e 2-benzossazolico. L'assenza del sostituente in posizione N-4 della piperazina o la presenza di un gruppo amidinico portano a completa perdita di attività, mentre qualsiasi modifica a carico dell'anello piperazinico, come la sua apertura o il suo rimpiazzamento con un atomo di S a diverso grado di ossidazione, comporta un annullamento dell'attività antivirale, ma parallelamente anche di quella citotossica. Lo stesso comportamento si osserva quando la 1-(2-piridil)piperazina viene rimpiazzata con un anello tiazolidindionico attraverso un legame C-C.

Molti studi sono stati effettuati allo scopo di identificare il meccanismo d'azione dei 6-amminochinoloni (87, 89, 90) a livello molecolare, ma ad oggi non è stato ancora individuato in modo inequivocabile il target di questi derivati. Gli esperimenti condotti mostrano chiaramente che i 6-amminochinoloni interagiscono in uno step post-integrazionale del ciclo replicativo dell'HIV, in particolare a livello della trascrizione genomica Tat-mediata. Per il derivato WM5, studi fluorimetrici di *binding* condotti con varie sequenze genomiche di acidi nucleici (tRNA, TAR-RNA, ssDNA, dsDNA) in presenza di concentrazioni fisiologiche di Mg⁺⁺, hanno evidenziato la sua capacità di interagire con alta affinità e selettività con il *bulge* di TAR RNA, mentre lo stesso composto non dimostra significativa affinità per la regione *stem* e *loop* del TAR o per sequenze casuali di DNA o RNA (87). Lo spiazzamento del complesso Tat-TAR da parte dell'WM5 è stato confermato anche da saggi EMSA (*Electrophoresis mobility*

shift assay). Tale selettiva interazione è stata comunque evidenziata solo per il WM5; infatti, gli studi di *binding* condotti per gli altri 6-amminochinoloni anti-HIV hanno mostrato che alcuni non interagiscono affatto con TAR, mentre altri lo fanno in maniera non specifica (88).

2.1.6 SCREENING DI PICCOLE MOLECOLE COME POTENZIALI INIBITORI DEL PROCESSO DI TRANS ATTIVAZIONE

In questa tesi sono stati esaminati composti appartenenti a classi differenti, caratterizzati da strutture tali da ricondurli a potenziali inibitori del complesso Tat-TAR, allo scopo sia di identificare interessanti nuove molecole attive, sia di ottenere informazioni riguardo le modalità del legame al TAR e individuare i motivi strutturali fondamentali per l'attività inibitoria. In particolare ci si è occupati inizialmente ed approfonditamente di una serie di 2-fenilchinoloni, per poi passare all'esame di altre piccole serie di composti, tra cui alcuni 6-amminochinoloni, alcuni acridoni ed alcuni antrachinoni mono e di-sostituiti. Tutti i composti esaminati sono di seguito descritti.

2.1.6.1 2-Fenilchinoloni

Dai dati soddisfacenti ottenuti con il chinolone WM5 e suoi analoghi, si è pensato che altre piccole molecole di natura chinolonica, con motivi strutturali differenti rispetto sia ai fluorochinoloni (K12), sia rispetto agli amminochinoloni (WM5), fossero in grado di legare selettivamente il TAR e di conseguenza inibire il processo di transattivazione mediato dal complesso TAR-Tat. Con questo intento sono stati quindi disegnati nuovi ligandi a struttura chinolonica opportunamente funzionalizzati con adatte catene protonabili, identificate come idonee per la stabilizzazione della struttura flessibile di TAR in una conformazione non funzionale.

E' così stata progettata una nuova prima serie di molecole (tabella 2.2, composti dal WRNA1 al WRNA8), caratterizzate dalla presenza di:

- un ulteriore anello aromatico in posizione C-2 del nucleo chinolonico, inserito con l'intento di rafforzare l'interazione di *stacking* con le basi nucleotidiche posizionate nelle immediate vicinanze del *bulge* di TAR;
- catene protonabili di varia lunghezza ancorate all'anello aromatico addizionate tramite *linker* O o tramite legame ammidico;

- un gruppo metilico in posizione N1, emerso quale miglior sostituente nei chinoloni anti-HIV e due metossili per le posizioni C-5 e C-7, la cui lipofilia dovrebbe in parte controbilanciare l'idrofilia impartita dalle catene protonabili.

La prima serie di 2-fenilchinoloni sintetizzati è quindi caratterizzata dalla presenza di una singola catena alchilica a 3 termini legata all'anello aromatico tramite un ponte ad ossigeno, e portante, quali gruppi protonabili terminali, il gruppo NH₂ (WRNA1), piperidinil (WRNA3) o N-metilpiperazinil (WRNA5). Oltre a questi sono stati sintetizzati i derivati WRNA2, WRNA4 e WRNA6, che presentano una ulteriore catena protonabile (N,N-dimetilaminobutanoica) ancorata all'anello aromatico tramite un legame amidico in *orto* al gruppo *O*-alchilico. Il legame ammidico è l'unico tipo di aggancio che ha permesso l'introduzione della seconda catena protonabile in tali derivati. Un ulteriore derivato studiato con questa prima serie di chinoloni è il composto WRNA8, in cui un gruppo protonabile è rappresentato dall'anello piridinico selezionato in base all'analogia strutturale con il WM5.

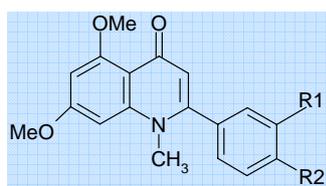
In un secondo momento è stata sintetizzata una seconda serie di composti, analoghi ai composti WRNA3 e WRNA5, ma con alcuni motivi strutturali differenti. In particolare i composti WRNA13, WRNA14, WRNA18, WRNA20, WRNA21 e WRNA22 presentano lo stesso identico nucleo chinolonico della serie precedente, ma con alcune modifiche a livello delle catene laterali: i chinoloni WRNA13, WRNA14 e WRNA15 presentano sostituzioni bioisosteriche della piperidina o della N-metilpiperazina in catena laterale; i composti WRNA20 e WRNA21 sono analoghi del WRNA3, aventi la catena alchilica più lunga; il composto WRNA22 presenta invece una sostituzione bioisosterica dell'ossigeno con un atomo di zolfo a livello della catena alchilica; infine il WRNA18 è un analogo del WRNA3, ma senza il gruppo amminico legato all'anello aromatico. Il composto WRNA23 rappresenta un controllo negativo in quanto non presenta la catena laterale basica, sostituita invece con un gruppo idrossilico.

Oltre a questi composti, sono stati sintetizzati alcuni 2-fenilchinoloni con modifiche a livello dell'anello chinolonico stesso. Tra questi, i composti WRNA9 e WRNA10 sono analoghi rispettivamente del WRNA3 e WRNA5, ma con un ossidrile in posizione 7 al posto del metossile; lo stesso per il WRNA19, analogo sempre del WRNA3, che però manca del gruppo amminico legato all'anello aromatico. Anche i derivati WRNA11 e WRNA12 sono analoghi del WRNA3 e WRNA5, ma non presentano i due metossili in

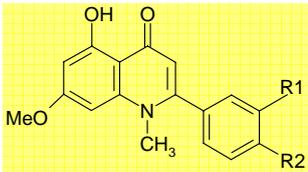
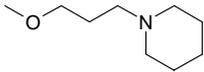
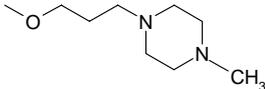
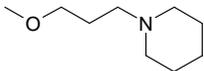
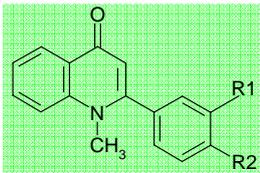
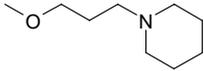
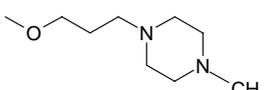
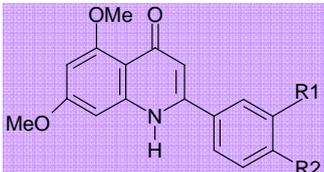
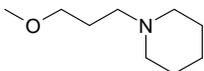
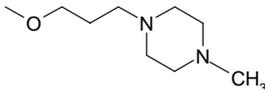
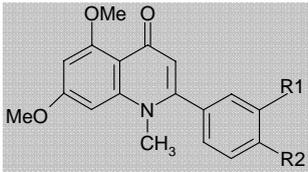
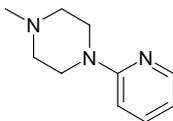
posizione 5 e 7, mentre i chinoloni WRNA16 e WRNA17 sono privi del gruppo metile legato all'azoto N1.

Infine è stato testato, assieme a questa seconda serie, il chinolone FQ1, che presenta come catena laterale protonabile la 4-(2-piridil)-1-piperazina, in analogia con il WM5.

La serie di 2-fenilchinoloni è stata sintetizzata dal gruppo della Prof.ssa Violetta Cecchetti e della Prof.ssa Oriana Tabarrini, del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Perugia ed in tabella 2.2 sono riportate le strutture dei composti in esame.



Composto	R1	R2
WRNA1	—NH_2	
WRNA3	—NH_2	
WRNA5	—NH_2	
WRNA2		
WRNA4		
WRNA6		
WRNA8		
WRNA13	—NH_2	
WRNA14	—NH_2	
WRNA15	—NH_2	
WRNA20	—NH_2	
WRNA21	—NH_2	
WRNA22	—NH_2	
WRNA23	—NH_2	—OH
WRNA18	—H	

	WRNA9	—NH ₂	
	WRNA10	—NH ₂	
	WRNA19	—H	
	WRNA11	—NH ₂	
	WRNA12	—NH ₂	
	WRNA16	—NH ₂	
	WRNA17	—NH ₂	
	FQ1	—NH ₂	

Tab 2.2 Strutture chimiche dei chinoloni della serie WRNA e del composto FQ1

2.1.6.2 Derivati 6-amminochinolonici

La piccola serie di 6-amminochinoloni esaminati comprende i composti WP7-5, W5AM1 e W5AM, analoghi del chinolone attivo WM5, ma con diverse sostituzioni sull'azoto in posizione 1, le cui strutture chimiche sono riportate in tabella 2.3.

L'analisi di questi amminochinoloni è stata fatta per integrare uno studio relazione attività già riportato in letteratura (89) e per valutare se l'attività nei confronti del virus già rilevata per questi composti (De Clercq, non pubblicato), sia riconducibile all'inibizione dell'interazione Tat-TAR.

Anche questi chinoloni sono stati sintetizzati dal gruppo della Prof.ssa Violetta Cecchetti e della Prof.ssa Oriana Tabarrini, del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Perugia.

Composto	Struttura
WP7-5	
W5AM1	
W5AM	

Tab. 2.3 Strutture dei 6-amminochinoloni esaminati.

2.1.6.3 Derivati acridonici

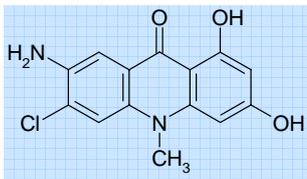
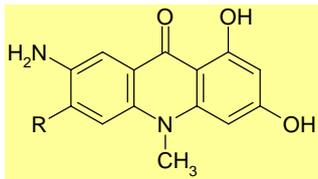
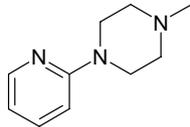
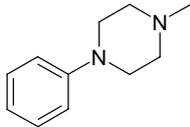
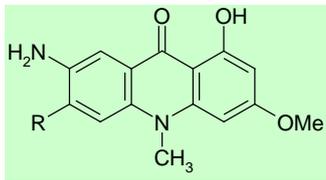
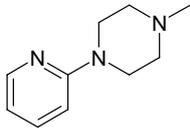
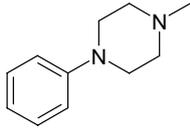
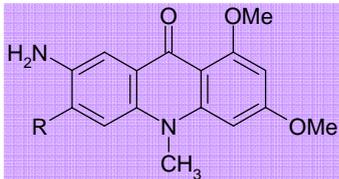
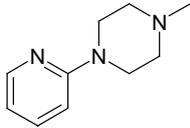
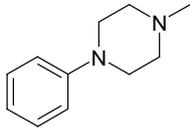
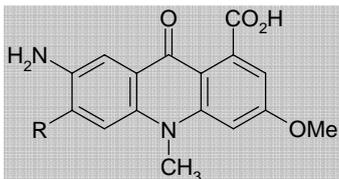
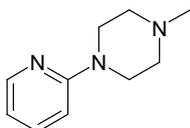
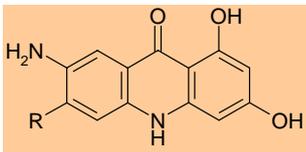
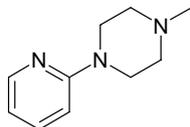
Una terza classe di potenziali inibitori testati è rappresentata da alcuni 7-amminoacridoni, già studiati e riportati in letteratura per la loro attività nei confronti del virus BVDV (*Bovine Viral Diarrhea Virus*), valido surrogato del virus dell'epatite C per lo studio di farmaci antivirali.

Si è scelto comunque di testare la capacità di tali composti di agire nei confronti del processo di trans-attivazione del virus HIV, ed in particolar modo il nostro interesse è rivolto ad una serie caratterizzata dalla sostituzione in posizione 9 con una 4-(2-fenil)-1-piperazina o da una 4-(2-piridil)-1-piperazina, in analogia con il WM5, per valutare l'effetto sull'attività dell'estensione della porzione planare da due a tre cicli.

I composti analizzati presentano alcune differenze a livello del nucleo acridonico: i composti W4i e W4g14, sostituiti rispettivamente in catena laterale con la 4-(2-piridil)-1-piperazina e la 4-(2-fenil)-1-piperazina, presentano due idrossili liberi in posizione 3 e 5 del nucleo acridonico; i composti W4h e W4g13, corrispondenti ai precedenti, ma con un metossile in posizione 3; i composti W4g e W4g12 con entrambi gli idrossili bloccati

dai metossili; il composto W4g19, analogo del W4i, ma con un carbossile in posizione 5; il composto W4g3 sempre analogo del W4i, ma in questo caso privo del sostituente metilico a livello dell'azoto in 1. Parallelamente è stato testato anche l'acridone di controllo non sostituito.

Ancora una volta, i composti sono stati sintetizzati dal gruppo della Prof.ssa Violetta Cecchetti e della Prof.ssa Oriana Tabarrini, del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Perugia e le relative formule di struttura dei composti esaminati sono riportate in tabella 2.4.

Composto	Struttura	R
W4e		
W4i		
W4g14		
W4h		
W4g13		
W4g		
W4g12		
W4g19		
W4g3		

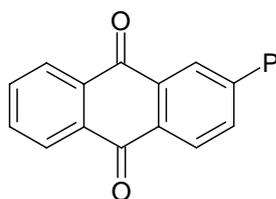
Tab. 2.4 Strutture dei 6-aminoacridoni esaminati.

2.1.6.4 Derivati antrachinonici

Come già riportato, diversi lavori in letteratura descrivono la capacità di classici agenti intercalanti del DNA di legare fortemente l'RNA-TAR. Abbiamo perciò esaminato una nuova classe di composti, già a nostra disposizione, rappresentata da alcuni antrachinoni mono e di-sostituiti, allo scopo di valutare la capacità di interagire con il TAR, e conseguentemente spiazzare il complesso con il peptide Tat.

I derivati peptidil-antrachinonici scelti per l'analisi antivirale presentano un nucleo antrachinonico in grado di intercalarsi all'RNA ed una o più catene laterali funzionalizzate con residui amminoacidici, in particolare residui basici. I composti esaminati sono stati sintetizzati dal gruppo del Prof. Giuseppe Zagotto del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova; le formule di struttura dei derivati monosostituiti sono riportate in tabella 2.5, mentre quelle dei composti disostituiti in tabella 2.6.

Composto		P
7	AQ-βAla-Val	
107	AQ-βAla-Val-Ala	
31	AQ-Val-Gly	
36	AQ-Val-Met	
19	AQ-Gly-Val	
46	AQ-Gly-Val-Ile	
123	AQ-Gly-Val-Leu	



Tab. 2.5 Strutture chimiche della serie di peptidil-antrachinoni monosostituiti esaminati. P = catena peptidica

Composto			P
542	2,6-AQ-βAla-Val-Lys		
543	2,6 AQ-βAla-Lys-Ile		
Z6	2,6 AQ-βAla-Gly-Lys		
Z7	2,6 AQ-βAla-Ala-Lys		
721	2,6 AQ-βAla-Lys		
722	2,6 AQ-βAla-Ala		
723	2,6 AQ-βAla-Arg		
CSA2	2,6 AQ-Gly-Ala		
CSA8	2,6 AQ-Gly-Val		
Z8	2,6 AQ-Gly-Ala-Lys		
Z9	2,6 AQ-Gly-Gly-Lys		

Tab. 2.6 Strutture chimiche della serie di peptidil-antrachinoni disostituiti esaminati. P = catena peptidica

2.2 RISULTATI

2.2.1 NUOVI DERIVATI CHINOLONICI ANTI-HIV: RICONOSCIMENTO DI ACIDI NUCLEICI VIRALI E VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ

La prima classe di composti esaminata e maggiormente studiata è rappresentata dai 2-fenilchinoloni, molecole disegnate e sintetizzate sulla base di studi razionali per interferire con il complesso Tat-TAR. Tali composti possiedono una struttura eterociclica costituita dal nucleo chinolonico, sostituito in posizione 2 da un anello benzenico, che porta una o due catene laterali basiche.

In particolare sono state esaminate due serie di chinoloni: una prima serie (dal WRNA1 al WRNA8), di cui è stata studiata sia l'interferenza nei confronti del complesso, che la capacità di interagire con il TAR stesso e con altri tipi di acidi nucleici, ed una seconda serie di analoghi (dal WRNA9 al WRNA23 e il composto FQ1), sintetizzati in seguito, sulla base dei composti risultati più attivi dall'analisi del primo gruppo, per delineare uno studio relazione struttura/attività.

Le strutture dei 2-fenilchinoloni esaminati sono state riportate nella parte introduttiva in tabella 2.2.

2.2.1.1 STUDIO DELLA PRIMA SERIE DI 2-FENILCHINOLONI

2.2.1.1.1 Proprietà chimico-fisiche

La prima serie di composti esaminati comprende i chinoloni WRNA1, WRNA2, WRNA3, WRNA4, WRNA5, WRNA6, WRNA8.

Tutti i composti si sono dimostrati solubili in acqua ad eccezione del WRNA1, che è stato dissolto in DMSO e successivamente diluito in acqua.

Tutti i chinoloni in esame sono stati caratterizzati sia spettrofotometricamente che fluorimetricamente. Per quanto riguarda gli studi spettrofotometrici, si sono registrati gli spettri di assorbimento in tampone TNMg (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM) a pH 7.5, a 25°C.

Per i chinoloni della prima serie lo spettro di assorbimento è stato registrato da 200 a 450 nm e complessivamente tutti i composti presentano due bande di assorbimento: una intorno ai 240-260 nm ed una meno intensa intorno ai 329 nm (figura 2.19).

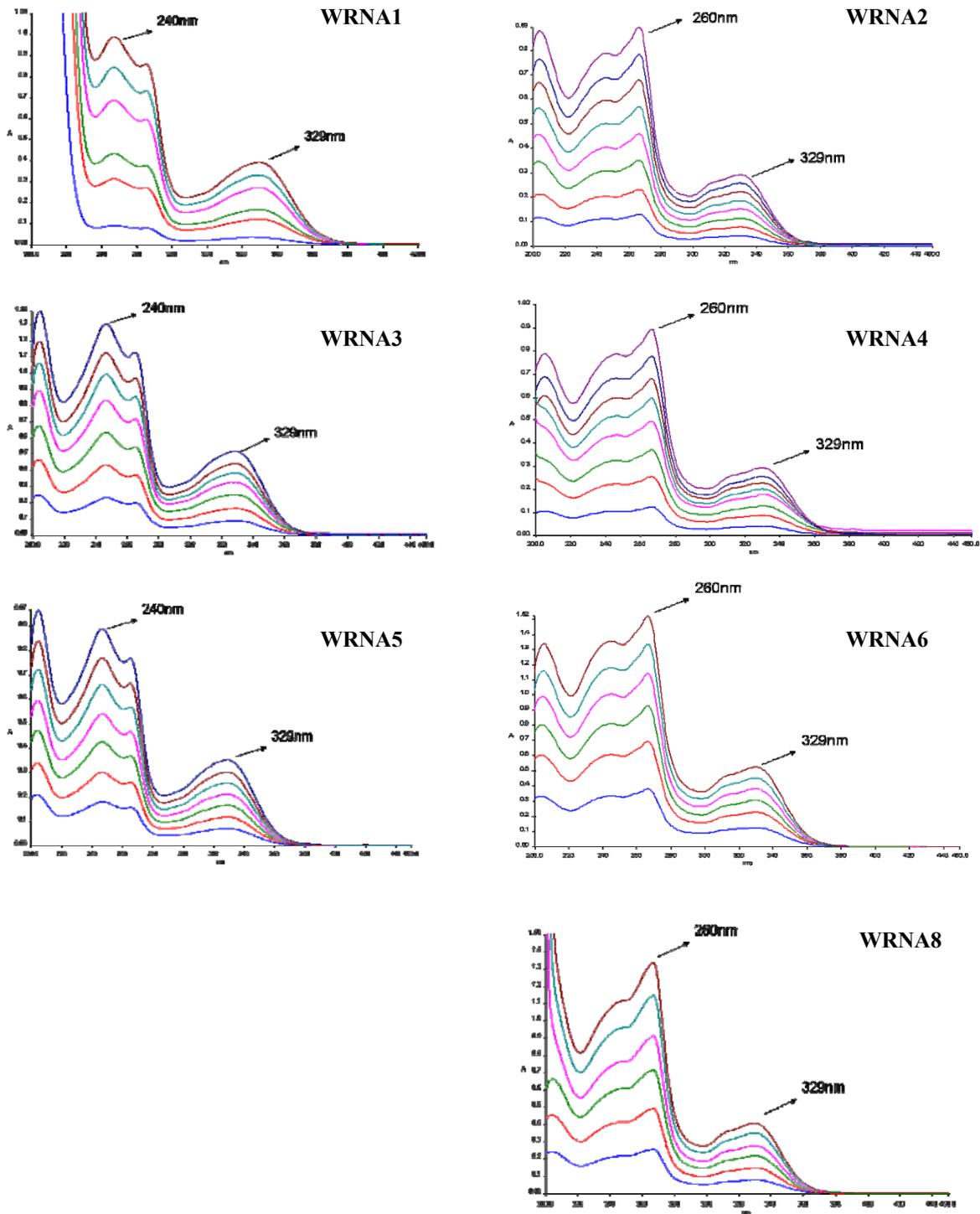


Fig 2.19 Spettri di assorbimento dei chinoloni della prima serie, eseguiti in TNMg (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM), a pH 7.5, 25° C.

La rilevazione degli spettri di assorbimento a differenti concentrazioni di composto è inoltre servita per la determinazione dei coefficienti di estinzione molare, che sono stati calcolati ad entrambi i valori massimi di lunghezza d'onda, mediante la costruzione delle opportune rette di taratura. Le rette di taratura ottenute per il WRNA4 sono riportate in figura 2.20 a titolo di esempio.

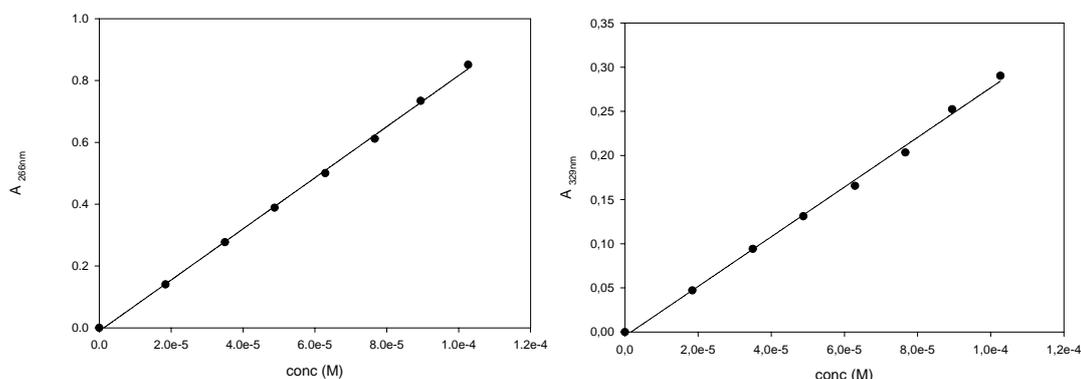


Fig 2.20. Rette di taratura ottenute dagli spettri di assorbimento, relative al composto WRNA4.

Per tutti i farmaci l'esperimento è stato effettuato in duplicato ed in tabella 2.7 sono riportati i valori medi dei coefficienti di estinzione molare, alle due lunghezze d'onda, in tampone TNMg (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), a pH 7.5, 25° C.

WRNA1	$\epsilon_{247\text{nm}} = 14740 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{329\text{nm}} = 5837 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
WRNA2	$\epsilon_{266\text{nm}} = 20830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{329\text{nm}} = 6935 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
WRNA3	$\epsilon_{247\text{nm}} = 22135 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{329\text{nm}} = 7383 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
WRNA4	$\epsilon_{266\text{nm}} = 8349 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{329\text{nm}} = 2804 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
WRNA5	$\epsilon_{246\text{nm}} = 37897 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{329\text{nm}} = 14995 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
WRNA6	$\epsilon_{266\text{nm}} = 33810 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{329\text{nm}} = 11595 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
WRNA8	$\epsilon_{266\text{nm}} = 34320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\epsilon_{329\text{nm}} = 10680 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Tab. 2.7. Valori dei coefficienti di estinzione molare dei chinoloni appartenenti alla prima serie.

Per quanto riguarda l'analisi fluorimetrica, invece, gli spettri di emissione (in seguito ad una eccitazione alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento) sono stati esaminati in due condizioni di pH differenti: in tampone TNMg a pH 7.5 e in tampone glicina 0.1 M a pH 3.0, tampone di lisi delle cellule nei saggi di *uptake* che verranno descritti più avanti.

I composti della prima serie si sono dimostrati tutti fluorescenti a pH fisiologico eccitando a 329 nm, con emissione intorno ai 460-465 nm, fuorché il WRNA1 e il WRNA3 che, eccitati a 329 nm, hanno un'emissione di fluorescenza molto bassa. È inoltre stata esaminata, per via fluorimetrica, la stabilità nel tempo di queste molecole seguendo la variazione di intensità al massimo di assorbimento per la durata di venti ore. I risultati ottenuti hanno dimostrato una buona stabilità delle soluzioni di tutti i chinoloni appartenenti a questa prima serie, come d'esempio in figura 2.21.

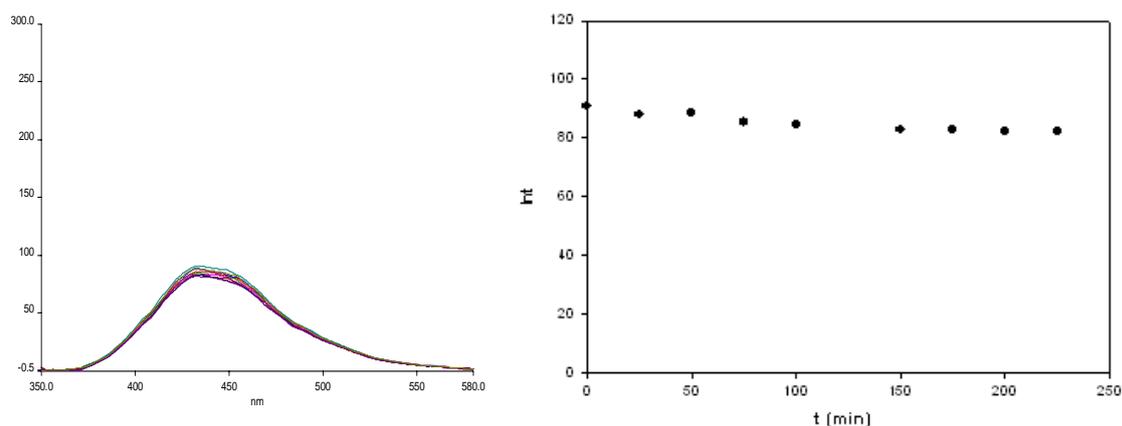


Fig. 2.21 Valutazione della stabilità di fluorescenza nel tempo del WRNA4, in tampone TNMg (Tris 10mM, NaCl 20mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), pH 7.5, 25°C. $\lambda_{ecc}=329$ nm.

Successivamente sono stati valutati gli spettri di emissione di tutti i chinoloni in condizioni di pH acido, in tampone glicina 0.1 M a pH 3.0. Lo spettro è stato registrato sia al tempo zero, che a diversi tempi dopo agitazione del campione. Tutti i chinoloni dimostrano una variazione del picco di intensità e dell'intensità di fluorescenza in queste nuove condizioni; in particolare, a valori di pH inferiori, si assiste ad un aumento della lunghezza d'onda massima di emissione e dell'intensità di fluorescenza. Tale evento probabilmente accade poiché assistiamo a stati di protonazione diversi delle molecole: a pH acido non si ha l'aggregazione delle molecole, fenomeno che invece opera un effetto *quencher* a valori di pH maggiori, provocando una diminuzione dell'intensità di fluorescenza. In particolar modo questo è dimostrato per i chinoloni WRNA1, WRNA3 e WRNA5.

In figura 2.22 sono riportati gli spettri di fluorescenza ottenuti nelle due diverse condizioni di pH. Si noti come nel caso dei chinoloni dispari, monosostituiti (a), la variazione di emissione ai due diversi pH sia molto più marcata rispetto ai chinoloni pari, disostituiti (b).

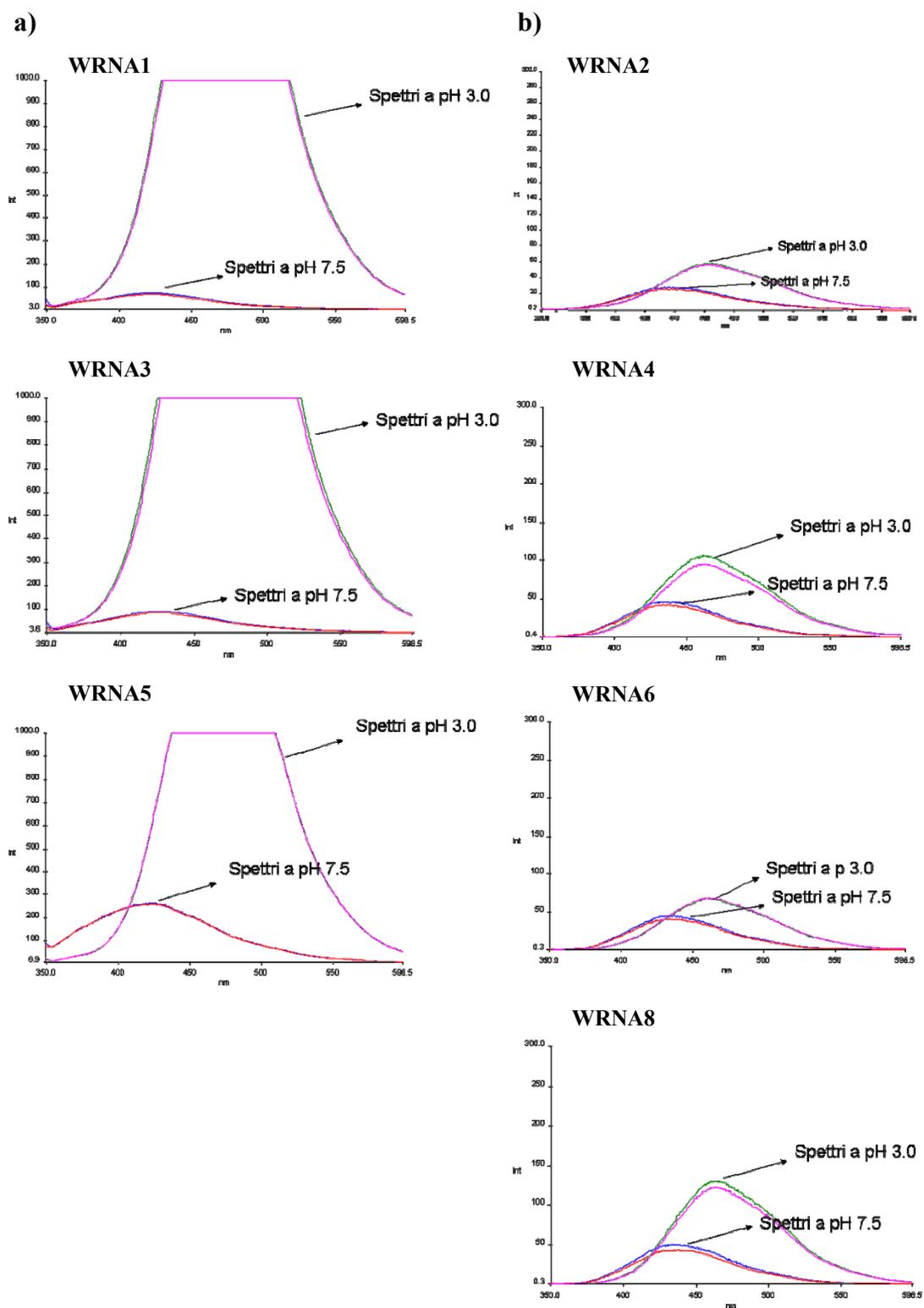


Fig. 2.22 Spettri di emissione di fluorescenza in tampone glicina 0.1M a pH 3.0 e in TNMg (Tris 10mM, NaCl 20mM, $Mg(ClO_4)_2$ 10 M) a pH 7.5, T 25°C, dei chinoloni dispari in esame (a) appartenenti alla classe monosostituita (apertura delle slit della luce 15.0) e dei chinoloni pari in esame (b) appartenenti alla classe disostituita (apertura delle slit della luce a 15.0 con utilizzo di un filtro al 2%).

Sono state effettuate delle prove di controllo sull'emissione di fluorescenza dei composti conducendo le analisi in tampone glicina 0.1 M a pH 7.5, per verificare che la variazione di emissione fosse dipendente dal pH e non influenzata dalla glicina. I dati ottenuti hanno confermato che la variazione di emissione dei composti è pH-dipendente. La maggiore variazione di emissione in dipendenza dal pH si ha per i chinoloni WRNA3 e WRNA5.

2.2.1.1.2 Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

I saggi di *Gel Mobility Shift* permettono di stimare l'attività in vitro dei composti in esame, valutando la loro capacità di interferire con il complesso Tat-TAR.

Tale saggio sfrutta la differente mobilità elettroforetica del complesso Tat-TAR rispetto all'RNA libero ed in particolare abbiamo messo a punto un protocollo sperimentale non radioattivo che prevede, dopo la corsa elettroforetica, la colorazione con la molecola fluorescente *Sybr Green II*. Con tale metodo non si riesce a vedere la banda relativa al complesso Tat-TAR, perché, in presenza del peptide legato, il colorante non riesce ad intercalare l'RNA; è possibile comunque seguire la reazione di complessazione, osservando la scomparsa della banda relativa al TAR non legato.

Inizialmente ci si è occupati di determinare i migliori rapporti necessari alla formazione del complesso, incubando il TAR con quantità crescenti di peptide. Come si vede in figura 2.23, che illustra la formazione del complesso Tat-TAR, l'aggiunta di basse concentrazioni di Tat (pozzetti 1-3) non è sufficiente a complessare il TAR e quindi ad osservare uno *shift* della banda. Si deve aggiungere peptide in concentrazione 1 μ M (pozzetto 4) per vedere la scomparsa della banda relativa al TAR libero e quindi dedurre la completa formazione del complesso.

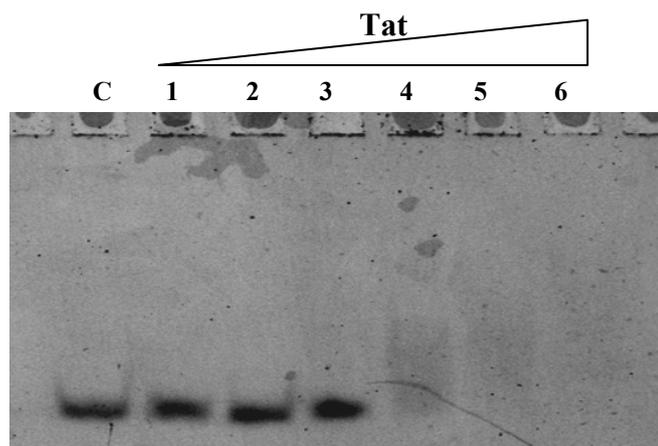


Fig. 2.23 Saggio EMSA per valutare il legame del peptide Tat all'RNA-TAR. Campione C: 60 ng di TAR. Campioni 1-6: 60 ng di TAR + concentrazioni crescenti di Tat: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M

Una volta stabilite le concentrazioni di Tat e TAR necessarie per formare il complesso, si sono iniziate ad aggiungere al complesso preformato quantità crescenti dei chinoloni, per valutare l'abilità di tali composti di interferire con l'interazione peptide-RNA.

A titolo di esempio è riportato in figura 2.24 il gel ottenuto dall'aggiunta di concentrazioni crescenti di WRNA5 al complesso Tat-TAR. Come si può vedere, la banda relativa all'RNA-TAR (pozzetto C) scompare quasi totalmente in seguito all'aggiunta del peptide Tat (pozzetto 1), in presenza di concentrazioni crescenti di WRNA5 (pozzetti 2-6), si ha la progressiva ricomparsa della banda relativa all'acido nucleico non complessato, evento che indica la relativa distruzione del complesso. Tale fenomeno si osserva fino ad una concentrazione di chinolone di circa 100 μ M (pozzetto 6), oltre la quale si osserva la comparsa di uno *smear* ad alti pesi molecolari. Tale evento potrebbe essere giustificato ipotizzando, ad elevate concentrazioni di farmaco, la formazione di aggregati fra le molecole stesse, quindi non più disponibili per interferire con il complesso Tat-TAR.

Si è provato anche ad incubare il TAR con 50 e 500 μ M di WRNA5 in assenza di Tat (pozzetti 7-8, figura 2.24), per valutare la capacità del composto da solo di legare l'acido ribonucleico; come si può osservare non si hanno variazioni della banda relativa al TAR libero, indicando un'incapacità del composto da solo di rallentare la corsa elettroforetica dell'RNA.

Nel saggio è stato incluso anche un campione ottenuto incubando il complesso con il chinolone WM5, utilizzato come controllo positivo.

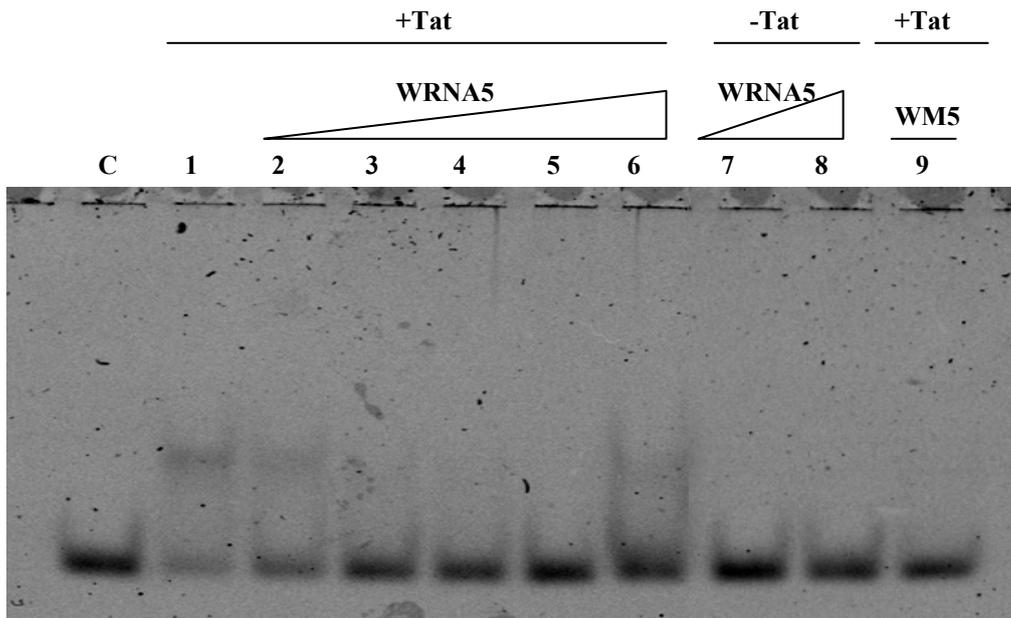


Fig. 2.24 Saggio EMSA per valutare l'inibizione del complesso Tat-TAR da parte del chinolone WRNA5. Campione C: 60 ng di TAR. Campione 1: 60ng di TAR + Tat 1 μ M. Campioni 2-6: 60 ng di TAR + Tat 1 μ M + concentrazioni crescenti di WRNA5: 1, 5, 10, 50, 100 μ M. Campioni 7-8: 60 ng di TAR + WRNA5 50 e 500 μ M. Campione 9: 60ng di TAR + Tat 1 μ M + WM5 200 μ M.

Lo stesso tipo di esperimento riportato in figura 2.24 per WRNA5 è stato eseguito per tutti i composti, in triplicato.

I risultati hanno confermato l'incapacità di tutti i chinoloni di spostare la corsa elettroforetica del TAR in assenza di Tat. In presenza di Tat invece, si sono dimostrati più o meno attivi i chinoloni WRNA1, WRNA2, WRNA3, WRNA4, WRNA5, mentre i composti WRNA6 e WRNA8 non hanno evidenziato capacità di spostare la migrazione del complesso Tat-TAR. Sono stati quindi ritenuti non attivi ai fini dell'inibizione del complesso acido nucleico virale-peptide.

Per poter confrontare in maniera omogenea l'attività dei composti risultati variamente attivi, abbiamo considerato la concentrazione di ogni farmaco in grado di inibire del 20% la formazione del complesso. Inoltre per i composti più attivi è stato possibile valutare anche il dato relativo ad un'interferenza del 50% (K_i). I valori trovati sono riportati in tabella 2.8.

	EC ₂₀ μ M	EC ₅₀ (K _i) μ M
WM5	0.47	4.06
WRNA1	2.54	N.A.
WRNA2	8.44	N.A.
WRNA3	0.06	0.30
WRNA4	2.15	N.A.
WRNA5	0.63	2.69

Tab.2.8 Valori di EC₂₀ ed EC₅₀ dei chinoloni della prima serie, ottenuti tramite saggi EMSA. N.A.= non applicabile

Osservando i valori riportati in tabella 2.8, possiamo notare come il chinolone di controllo WM5, sottoposto al saggio EMSA non radioattivo, dimostri una EC₅₀ del tutto paragonabile a quella già riportata in letteratura (3.5 μ M) (87, 88), ottenuta con saggi EMSA eseguiti con il TAR marcato radioattivamente. Questo dato ci ha permesso di validare il nuovo metodo non radioattivo di indagine.

L'analisi dei valori di EC₅₀ ci permette di valutare più puntualmente l'attività dei nuovi composti in studio; quello che risulta essere più attivo è il WRNA3, con un'attività circa dieci volte maggiore rispetto al WM5, nelle stesse condizioni sperimentali. Il WRNA5 dimostra un'attività dello stesso ordine di grandezza del controllo positivo WM5.

In figura 2.25 è rappresentata graficamente l'attività relativa dei composti attivi, rispetto a quella del composto di riferimento WM5.

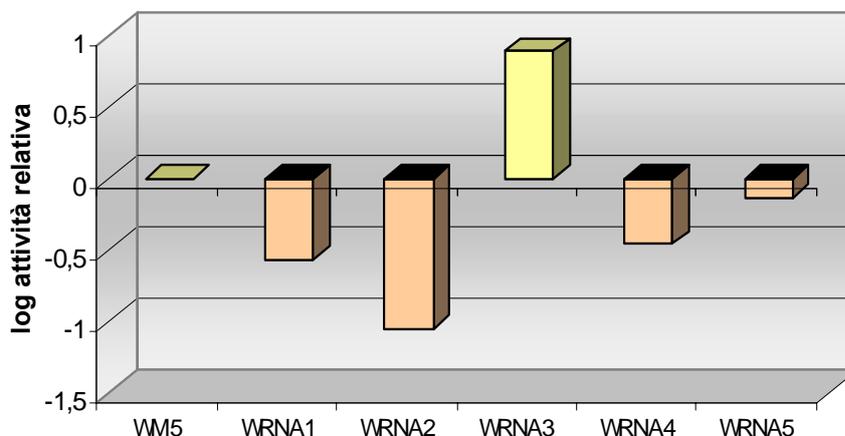


Fig. 2.25 Attività relativa dei chinoloni della I serie WRNA, rispetto al WM5, in saggi di EMSA. I valori riportati sono stati ricavati come logaritmo del rapporto tra EC₂₀ di WM5 e EC₂₀ di WRNAx.

Nei saggi appena descritti, che possiamo definire *Competition Assay*, veniva pre-formato il complesso Tat-TAR e successivamente aggiunto il composto in esame; successivamente sono stati eseguiti un secondo tipo di saggi che definiamo *Challenge Assays*, in cui è stato pre-incubato il TAR con il chinolone e successivamente aggiunto il peptide (figura 2.26a). Per poter confrontare i risultati sono state determinate, anche per i *Challenge Assays*, le concentrazioni di chinolone alle quali si ha il 50% della capacità di spostare il complesso Tat-TAR (EC_{50}).

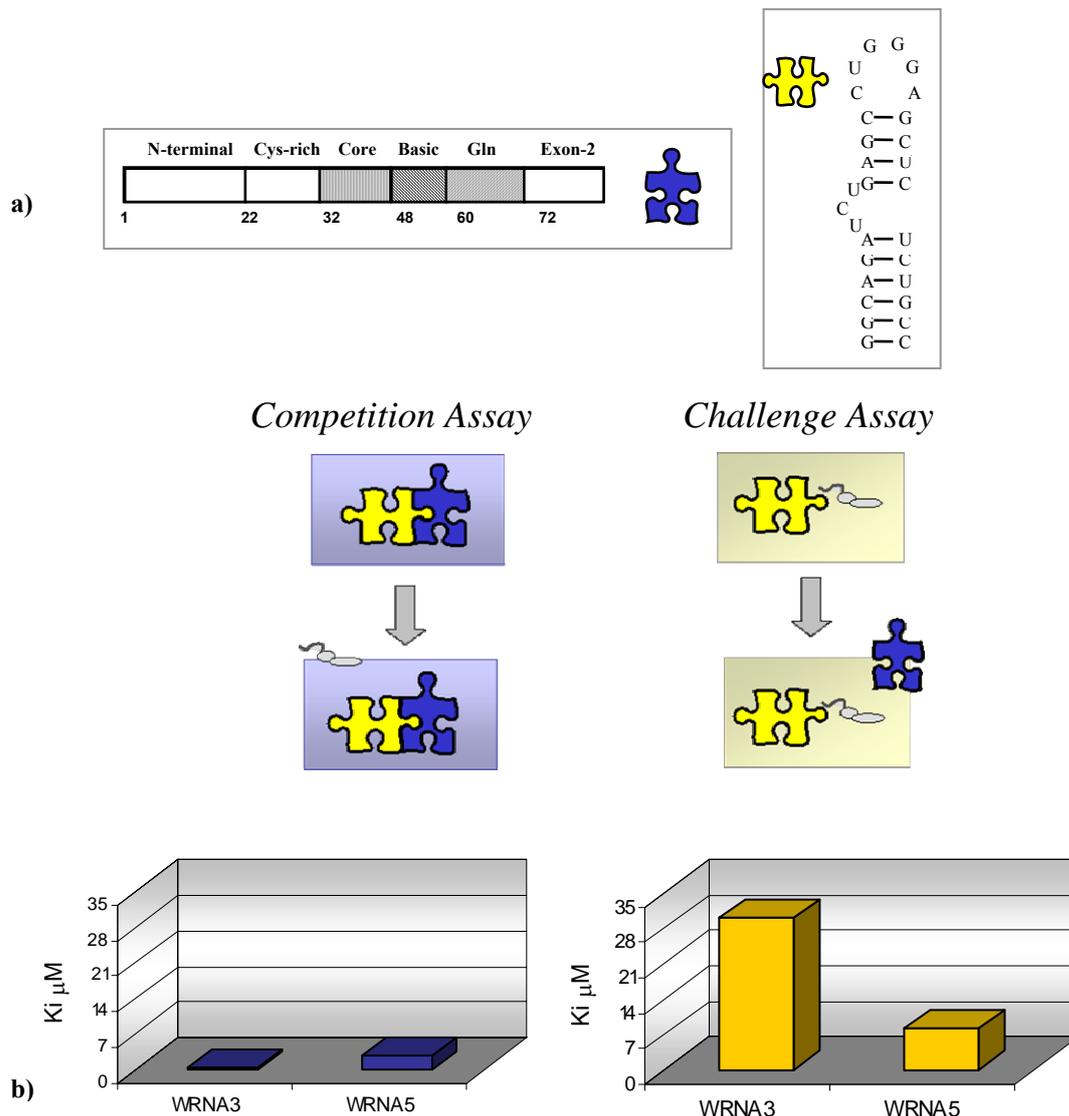


Fig. 2.26 a) Semplificazione schematica della metodica seguita per i saggi *Competition Assays* e per i saggi *Challenge Assays*. **b)** Rappresentazione grafica dei valori di EC_{50} ottenuti per i chinoloni WRNA3 e WRNA5 con i 2 diversi tipi di saggi.

I dati ottenuti per WRNA3 e WRNA5, riportati graficamente in figura 2.26b, ci suggeriscono come, nel caso dei *Challenge Assays*, sia il WRNA5 il composto migliore

nell'impedire la formazione del complesso, mentre nei *Competition Assay* era il WRNA3 il composto maggiormente attivo. Inoltre facendo un confronto del comportamento dello stesso composto nei due tipi di saggio, si può evidenziare come l'affinità del WRNA5 per il complesso, rispetto al TAR da solo, non vari molto, a differenza del WRNA3 che presenta un'affinità notevolmente superiore per il complesso rispetto al TAR da solo.

La differenza del WRNA3 nella capacità di legare il TAR da solo o complessato può essere imputabile alla variazione conformazionale che l'acido nucleico subisce in seguito all'interazione con Tat (35). In presenza della proteina infatti il *bulge* viene disorganizzato e il TAR stesso assume una struttura caratterizzata da una maggiore rigidità; questa conformazione è probabilmente quella preferita dal chinolone con la piperidina in catena laterale (WRNA3).

2.2.1.1.3 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA

I saggi EMSA rappresentano un utile metodo di indagine per valutare l'interferenza nei confronti del complesso dei composti in esame, ma presentano alcune limitazioni. Si tratta infatti di un saggio che richiede la corsa elettroforetica, quindi una manipolazione del sistema in seguito all'interazione farmaco-RNA. Per cercare un metodo di indagine più veloce e versatile si è perciò messo a punto e validato un protocollo per esaminare l'interferenza dei composti nei confronti del complesso Tat-TAR tramite FQA (*Fluorescence Quenching Assay*).

Tale saggio di *Fluorescence Quenching* (FQ) rappresenta una particolare applicazione del fenomeno di *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET), anche detto *Förster Type Energy Transfer* (91). Tale meccanismo sfrutta la presenza di due molecole fluorescenti, dette "donatore" ed "accettore". Verso il fluoroforo donatore, viene diretta un'onda luminosa ad una lunghezza d'onda specifica (tipicamente quella relativa al suo picco di assorbimento) e il donatore, eccitato, può emettere fluorescenza secondo il suo spettro tipico di emissione. Se lo spettro di emissione del donatore si sovrappone in maniera consistente a quello di assorbimento dell'accettore (se, cioè, i salti energetici associati ai due processi sono simili), il donatore eccitato non emette luce ma "trasmette" l'eccitazione in maniera risonante all'accettore (in modo più o meno

efficiente), che emetterà un quanto luminoso alla sua lunghezza d'onda caratteristica. Affinché il fenomeno di FRET avvenga è necessario quindi che lo spettro di emissione di fluorescenza del donatore sia sovrapponibile con lo spettro di assorbimento dell'accettore, come mostrato in figura 2.27.

Il trasferimento di energia avviene attraverso semplici interazioni dipolo-dipolo a lungo raggio; secondo tale principio il fluoroforo eccitato può essere inteso come un dipolo oscillante, in grado di trasferire energia ad un secondo dipolo che abbia una simile frequenza di risonanza. Il trasferimento di energia per risonanza non è sensibile al tipo di solvente in cui si trova il campione: rispetto ad un trasferimento di energia luminosa, infatti, tale processo dipende esclusivamente dalla distanza tra le molecole e non dalle caratteristiche del mezzo da attraversare.

E' importante quindi sottolineare come il fenomeno di trasferimento di fluorescenza sia limitato dalla distanza che separa il donatore e l'accettore, detta distanza di Förster, che dovrebbe essere compresa tra 10 e 100 Å (92), corrispondente approssimativamente alla distanza tra tre nucleotidi localizzati nella doppia elica del DNA (93).

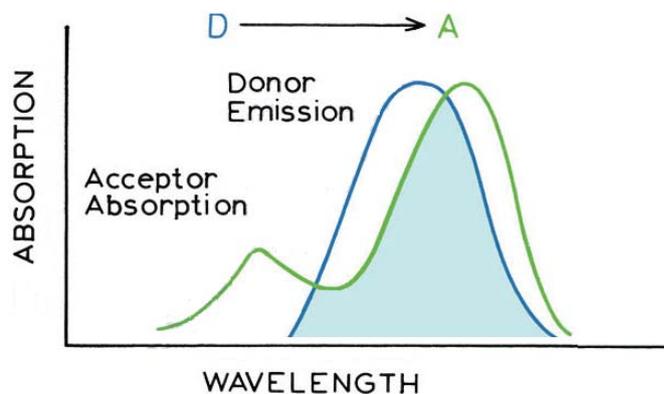


Fig. 2.27 Sovrapposizione degli spettri del donatore e dell'accettore necessaria per il fenomeno di trasferimento di energia (FRET).

Il processo di FRET è ampiamente utilizzato per misurare la distanza tra due siti in una macromolecola, per studi di ripiegamento delle proteine, di fusione e aggregazione di membrane (94), per lo *screening* di composti diretti verso recettori di rilevanza farmacologica (95), per effettuare *Real-Time PCR* (96), per investigare strutture e ripiegamenti degli acidi nucleici (97, 98) e per molti altri usi.

Come già accennato, il saggio di FQ da noi utilizzato consiste in una modificazione del protocollo di FRET, nel quale viene utilizzato come accettore di fluorescenza non un secondo fluoroforo, ma una molecola in grado di fungere da “*dark quencher*”. Questo tipo di *Quenching*, detto *Contact-Quenching* o *Static-Quenching*, risulta dall’interazione tra il fluoroforo ed il *quencher* stesso, con la conseguente formazione di un complesso non-fluorescente.

Il saggio di FQ, messo a punto per esaminare l’interferenza dei composti nei confronti del complesso Tat-TAR, permette, come già riportato in letteratura (79), di analizzare velocemente librerie di piccole molecole in grado di competere con il complesso Tat-TAR e di determinarne la costante di inibizione K_i . L’esperienza acquisita con i saggi EMSA è stata sfruttata per validare il metodo FRET, che verrà quindi da qui in avanti utilizzato come metodo di *screening* rapido, sensibile e versatile di composti con possibile attività antivirale.

Nel protocollo messo a punto la molecola donatore è rappresentata dal fluoroforo fluoresceina legato all’estremità N-terminale di una porzione del peptide Tat, mentre il gruppo accettore è il *quencher* dabcyl (4-(dimethylaminoazo)benzene-4-carboxylic acid) legato all’estremità 3’ dell’RNA. Il trasferimento di energia avviene in seguito alla formazione del complesso Tat-TAR, mentre la sua distruzione, da parte dei composti in esame, porta ad una diminuzione di tale trasferimento, corrispondente quindi ad un incremento dell’intensità di fluorescenza.

I saggi sono stati effettuati inizialmente utilizzando un peptide lungo 10aa, corrispondente alla regione compresa tra gli aminoacidi 48 e 57 di Tat (⁴⁸GRKKRRQRRR⁵⁷); tale sequenza, ricca di residui basici, rappresenta la regione sufficiente per il legame all’RNA TAR (24). Successivamente si è utilizzato anche un secondo peptide, lungo 36aa, corrispondente alla sequenza di Tat compresa tra gli aminoacidi 37 e 72 (³⁷CFTTKALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQ⁷²) che include quindi, oltre alla regione basica (rappresentata dal peptide di 10aa), 11 residui della regione “core” di Tat; secondo dati di letteratura (24), tale sequenza (aa 37-72) è quella in grado di legare il TAR con una specificità paragonabile a quella della proteina Tat completa.

Per confermare l’efficacia del trasferimento di energia sono state effettuate prove preliminari registrando al fluorimetro lo spettro di emissione del peptide fluoresceinato,

in presenza e in assenza dell'RNA *quencher* ed in seguito all'aggiunta di EDTA o di un'elevata concentrazione salina, allo scopo di spiazzare il complesso. In figura 2.28 sono riportati gli spettri registrati nelle condizioni descritte, in seguito all'eccitazione a 490 nm.

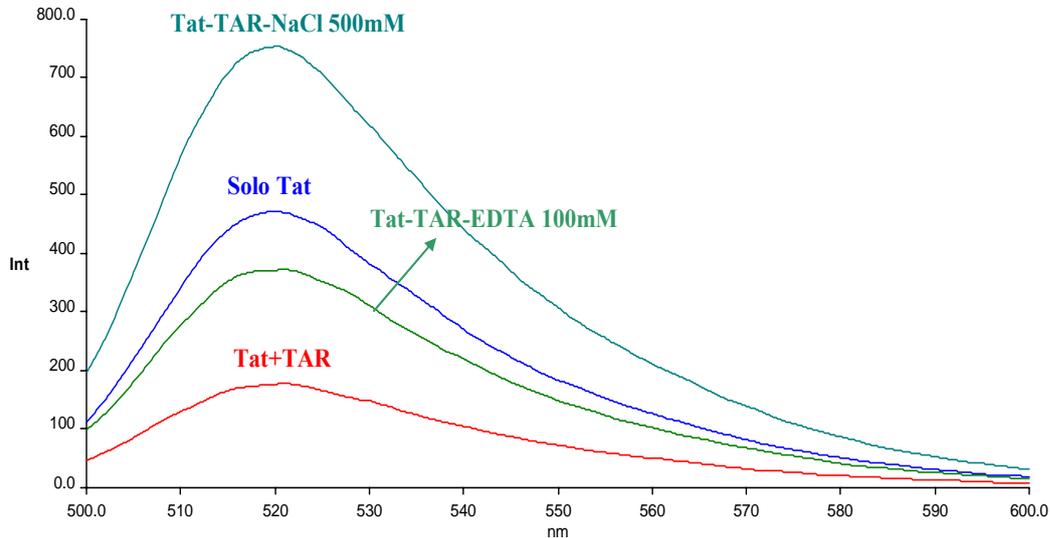


Fig. 2.28 Spettri di fluorescenza, registrati in seguito all'eccitazione a 490nm, del peptide Tat lungo 10aa fluoresceinato (100 nM), in presenza e assenza del TAR (100 nM), ed in seguito all'aggiunta di EDTA 100 mM o NaCl 500 mM.

Come si può osservare in figura 2.28, in seguito all'aggiunta del TAR al Tat, si ha un abbassamento dell'intensità di fluorescenza dello spettro della fluoresceina, dovuto all'effetto *quencher* del gruppo dabcyI nei confronti del peptide fluoresceinato.

Abbiamo inoltre effettuato un'ulteriore verifica del trasferimento di fluorescenza, osservando la variazione del segnale in seguito allo spiazzamento del complesso. In particolare è stato possibile ottenere una distruzione del complesso in seguito all'aggiunta di un'elevata concentrazione salina (NaCl 500 mM), che impedisce l'interazione elettrostatica tra acido nucleico e peptide, o per aggiunta di EDTA 100 mM, che chelando il magnesio impedisce al TAR di assumere l'esatta conformazione strutturale per l'interazione. In entrambi i casi osserviamo un incremento del segnale di fluorescenza rispetto a quello del peptide in forma complessata. In particolare, in seguito all'aggiunta del sale, il segnale di fluorescenza diventa addirittura maggiore a quello del Tat libero, probabilmente imputabile alla conformazione assunta dal peptide ad elevata concentrazione salina. Questo ci conferma che lo spiazzamento del

complesso, e quindi l'allontanamento dell'acido nucleico dal peptide, impedisce un efficiente trasferimento di energia tra fluoroforo e *quencher*, validando il nostro protocollo.

A questo punto il saggio di FQ è stato trasferito su micropiastra allo scopo di minimizzare ed ottimizzare il sistema, utilizzando un lettore di fluorescenza multipiastra.

Il protocollo che si è scelto di utilizzare, per studiare la capacità dei composti di interferire con il complesso, consiste nell'effettuare delle titolazioni del peptide fluoresceinato (a concentrazione fissa) con quantità crescenti di TAR-*quencher*, in presenza di una concentrazione fissa dei farmaci in esame.

Prima di procedere con l'analisi dei composti, è stato messo a punto ed ottimizzato il protocollo sperimentale.

Innanzitutto sono state effettuate le titolazioni con i due diversi peptidi (Tat10aa e Tat36aa) in assenza di farmaco, sia per determinare le migliori condizioni nelle quali operare, che per valutare la loro affinità per il TAR-RNA e stimare i relativi valori delle costanti di dissociazione (K_d).

Per il Tat da 10aa è stata effettuata la titolazione del peptide fluoresceinato con l'acido nucleico, in tampone TNMg con concentrazione salina 20 mM. In figura 2.29 è riportato il grafico ottenuto correlando i valori di I/I_0 (dove I_0 è l'intensità di fluorescenza iniziale in assenza di TAR) con le concentrazioni di TAR. La titolazione è stata ripetuta molte volte, rivelandosi abbastanza riproducibile e permettendoci di stimare un valore della K_d medio di $3,10 \pm 1,94$ nM. Tale valore della costante di dissociazione è in accordo con quella misurata per il complesso del TAR con il peptide corrispondente alla regione compresa tra gli amminoacidi 47 e 58 del Tat, riportata in letteratura (97).

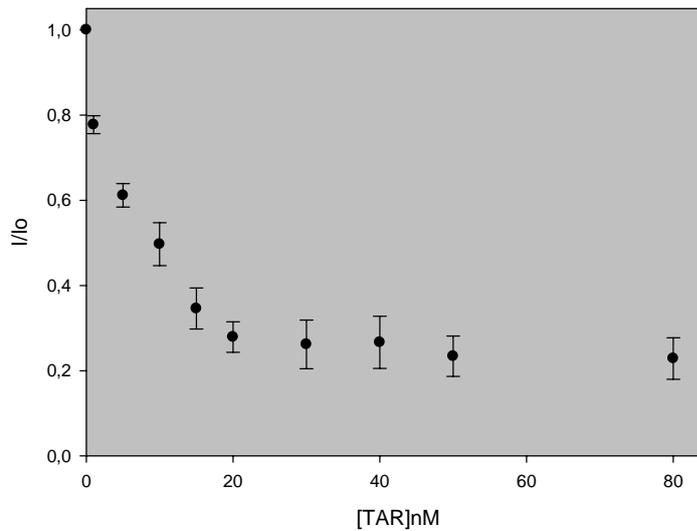


Fig. 2.29 Titolazione del Tat da 10aa marcato con fluoresceina, con TAR-*quencher* in TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), pH 7.5.

Anche per quanto riguarda il peptide lungo 36 aa, sono state effettuate diverse titolazioni, in assenza di farmaco, allo scopo di determinare il valore della K_d per questo complesso peptide-RNA (figura 2.30).

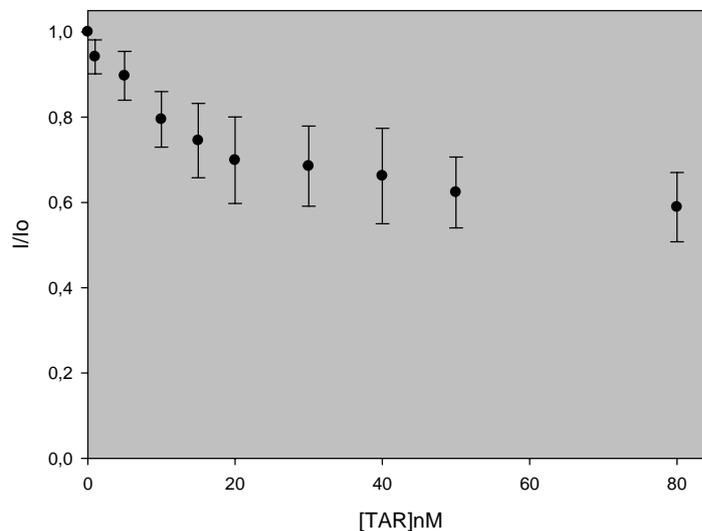


Fig. 2.30 Titolazione del Tat da 36 aa marcato con fluoresceina, con TAR-*quencher* in TNMg80 (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM) + dsTAR 20 nM, pH 7.5.

Anche in questo caso la titolazione è stata ripetuta più volte, ottenendo la curva riportata nel grafico in figura 2.30. E' importante sottolineare che con il peptide da 36 aa è stato necessario lavorare in condizioni di concentrazione salina maggiori (80 mM di NaCl) ed in presenza di un RNA competitore rappresentato dalla sequenza del TAR a doppio

filamento (dsTAR). Le titolazioni sono state effettuate in queste condizioni sia per riprodurre le condizioni utilizzate in un lavoro simile riportato in letteratura (79), sia perché, alla concentrazione salina di 20 mM, l'interazione peptide-acido nucleico risultava essere talmente forte da osservare un effetto *quencher* totale già all'aggiunta di concentrazioni bassissime di TAR. La K_d del complesso Tat 36aa-TAR calcolata in queste condizioni è risultata essere $8,28 \pm 3,04$ nM. Se confrontiamo tale valore di K_d con quello calcolato per il peptide da 10aa alla stessa concentrazione salina, che risulta essere $67,02 \pm 14,71$ nM, possiamo evidenziare come l'affinità del TAR sia effettivamente maggiore per la sequenza di Tat lunga 36 aa, in accordo con dati riportati in letteratura (24).

Un secondo aspetto che è stato considerato, prima di passare ad effettuare le titolazioni in presenza dei composti, è l'effetto del solvente. Come descritto precedentemente, non tutti i composti in esame sono solubili in acqua; si è quindi reso necessario valutare l'effetto sulla titolazione del DMSO, usato in qualche caso come solvente per le soluzioni madre. E' stato così stabilito quale sia la massima concentrazione che non influisce in modo sostanziale sull'esperimento. Le titolazioni Tat36aa-TAR in presenza di diverse percentuali di DMSO, confrontate con quelle ottenute in assenza di tale solvente sono riportate in figura 2.31.

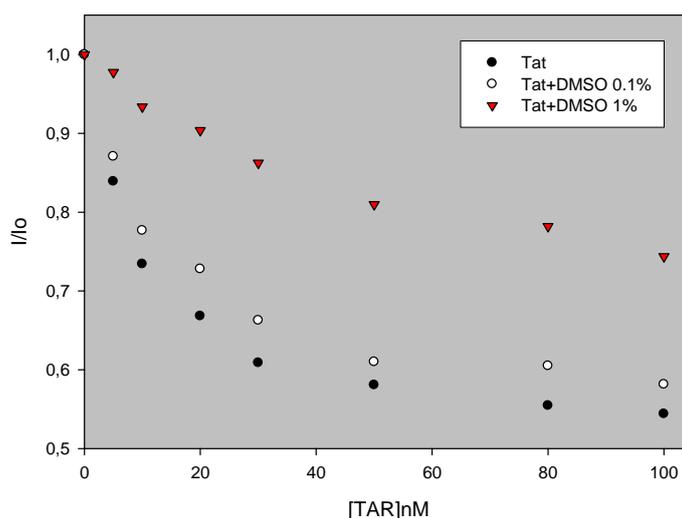


Fig. 2.31 Titolazione del Tat da 36 aa marcato con fluoresceina, con TAR-*quencher* in TNMg80 (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM) pH 7.5, in presenza di DMSO allo 0.1% e 1%.

Come si può notare dal grafico in figura 2.31, l'aggiunta di DMSO all'1% determina una notevole diminuzione del trasferimento di energia, probabilmente perché la presenza di tale percentuale di solvente sfavorisce l'interazione peptide-RNA, con conseguente spostamento della curva verso l'alto. Tale fenomeno è invece molto minore in presenza di una concentrazione di DMSO dello 0.1%, per cui si è deciso di considerare tale percentuale come concentrazione massima tollerabile nei nostri saggi. In ogni caso è importante sottolineare che si è operato facendo in modo di avere la medesima percentuale di DMSO in tutti i campioni (compresi i campioni in assenza di farmaco), in modo da normalizzare il sistema e rendere quindi le curve di titolazione confrontabili tra loro.

Un'ultima prova effettuata, prima di passare all'analisi dei composti, è stata quella di validare il sistema utilizzando una molecola effettivamente in grado di spiazzare il complesso ed, a tale scopo, è stato utilizzato l'amminoacido L-arginina. E' infatti riportato in letteratura che la L-arginina è in grado di bloccare l'interazione Tat-TAR, legandosi allo stesso sito di legame sul TAR del peptide stesso (98).

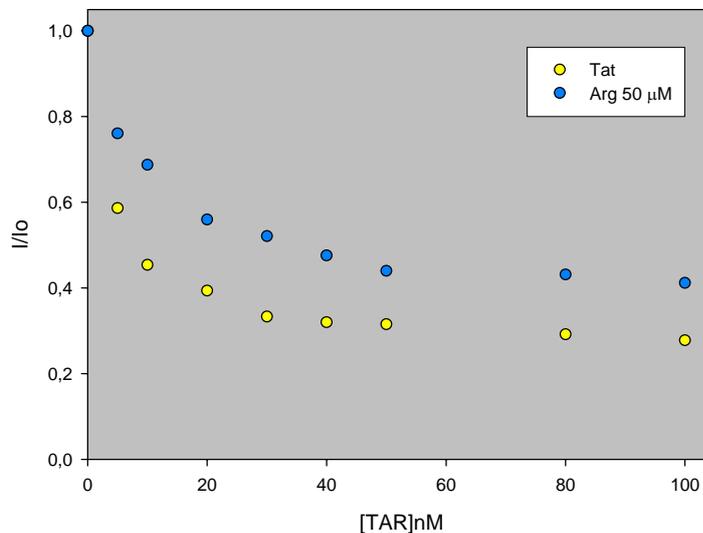


Fig. 2.32 Analisi tramite *Fluorescence Quenching* della distruzione del complesso da parte della L-arginina. Titolazione del Tat lungo 36 aa marcato con fluoresceina, con TAR-*quencher*, in TNMg (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM) pH 7.5, in presenza e assenza di L-arginina 50 μM. Ki Arginina=2.35 μM

Dalle curve di titolazione in figura 2.32, notiamo che in presenza della L-arginina abbiamo uno spostamento verso l'alto della curva di titolazione, come conseguenza

della diminuzione del trasferimento di energia tra fluoroforo e *quencher*; ciò indica effettivamente uno spiazzamento del complesso ad opera del composto in esame.

A questo punto, una volta perfezionato il sistema, si è potuto passare ad effettuare le titolazioni del Tat con il TAR in presenza dei composti inibitori a concentrazione fissa 10 μ M. Come osservato per la prova con la L-arginina, appena descritta, se i composti sono in grado di interferire con la formazione del complesso peptide-acido nucleico, dovremmo osservare uno spostamento verso l'alto delle curve di titolazione.

E' stata esaminata la prima serie di chinoloni e il controllo WM5, già analizzati tramite saggio EMSA, utilizzando il saggio di FQ con il peptide lungo 10 amminoacidi.

I saggi con i composti sono stati ripetuti più volte ed in figura 2.33 sono riportate, a titolo di esempio, le curve di titolazione ottenute in uno degli esperimenti effettuati.

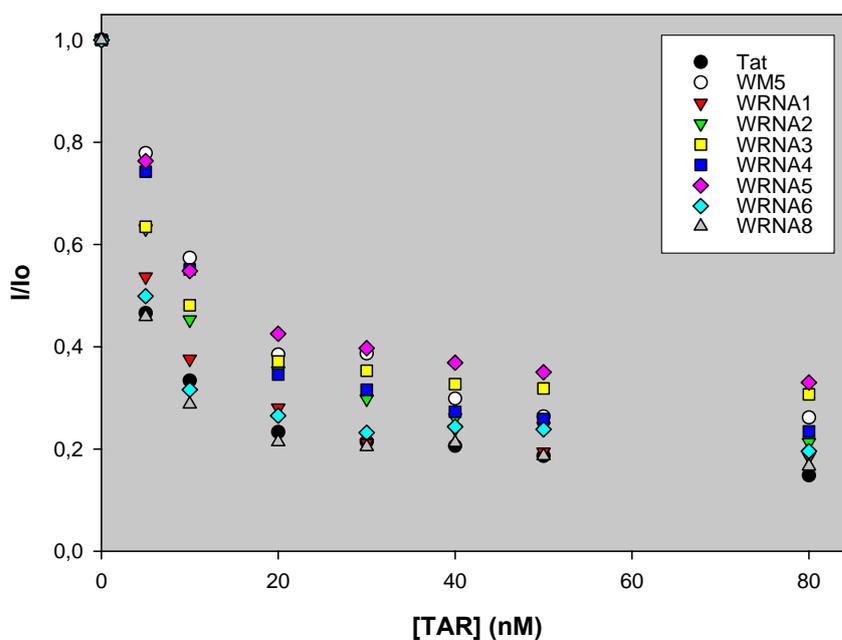


Fig. 2.33 Analisi tramite *Fluorescence Quenching* della distruzione del complesso da parte della prima serie di chinoloni. Le titolazioni sono state effettuate utilizzando il peptide Tat di 10aa, in presenza dei composti a concentrazione 10 μ M, in TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), pH 7.5.

Osservando le curve in figura 2.33 possiamo effettivamente notare come alcuni chinoloni siano in grado di spostare la curva di titolazione del Tat verso l'alto in modo più o meno marcato. Per quantificare l'interferenza dei composti nei confronti del complesso sono stati calcolati i valori delle costanti di inibizione (K_i), applicando l'equazione descritta nella sezione "Materiali e Metodi". I valori delle K_i calcolati, per i

composti esaminati, nelle condizioni descritte, sono riportati in tabella 2.9 e riassunti graficamente in figura 2.34.

	Ki (μM)
WM5	2.18 \pm 0.34
WRNA1	3.85 \pm 0.86
WRNA2	3.03 \pm 0.51
WRNA3	1.95 \pm 0.50
WRNA4	2.60 \pm 0.43
WRNA5	1.58 \pm 0.29
WRNA6	N.A.
WRNA8	N.A.

Tab. 2.9 Valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM) pH 7.5, in presenza dei primi chinoloni esaminati in concentrazione 10 μM . N.A.= non attivo

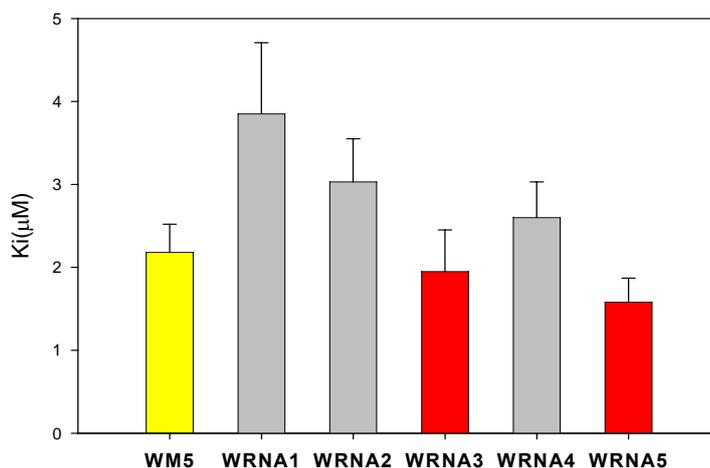


Fig. 2.34 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM) pH 7.5, in presenza dei primi chinoloni esaminati in concentrazione 10 μM . N.A.= non attivo

Dai dati ottenuti, si può osservare come tra la prima serie di chinoloni, i composti monosostituiti WRNA3 e WRNA5 presentino le K_i minori, con valori paragonabili o leggermente più bassi rispetto a quelle del controllo WM5, a significare una buona capacità di interferire con il complesso Tat-TAR. I composti WRNA1, WRNA2 e WRNA4 presentano invece valori di K_i elevati ad indicare scarsa capacità di inibire la complessazione Tat-TAR, mentre i composti WRNA6 e WRNA8 non sono in grado di spiazzare il complesso, in quanto gli andamenti delle loro titolazioni sono praticamente sovrapponibili a quella con il TAR da solo in assenza di farmaco.

A questo punto abbiamo effettuato le stesse titolazioni utilizzando il peptide lungo 36aa; in figura 2.35 sono riportate le titolazioni di uno degli esperimenti effettuati, mentre i relativi valori di K_i misurati sono riportati in tabella 2.10 e in figura 2.36.

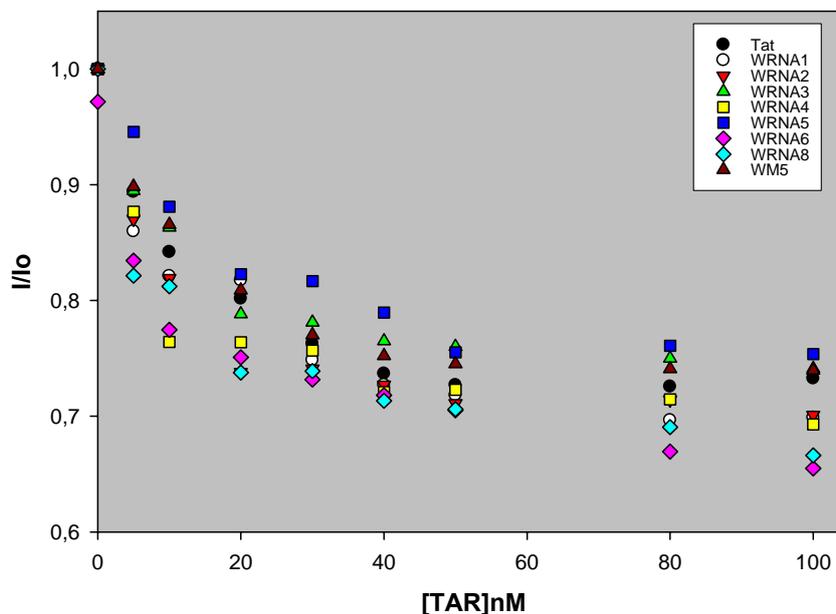


Fig. 2.35 Analisi tramite *Fluorescence Quenching* della distruzione del complesso da parte della prima serie di chinoloni esaminati. Le titolazioni sono state effettuate utilizzando il peptide Tat di 36aa, in presenza dei composti a concentrazione 10 μ M, in TNMg80 (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 10 mM) + dsTAR 20nM, pH 7.5.

	K_i (μM)
WM5	1.07 ± 0.13
WRNA1	N.A.
WRNA2	N.A.
WRNA3	0.81 ± 0.15
WRNA4	N.A.
WRNA5	0.68 ± 0.11
WRNA6	N.A.
WRNA8	N.A.

Tab. 2.10 Valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat36aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg80 (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM) + dsTAR 20nM, pH 7.5, in presenza della prima serie di chinoloni esaminati, in concentrazione 10 μ M. N.A.= non attivo

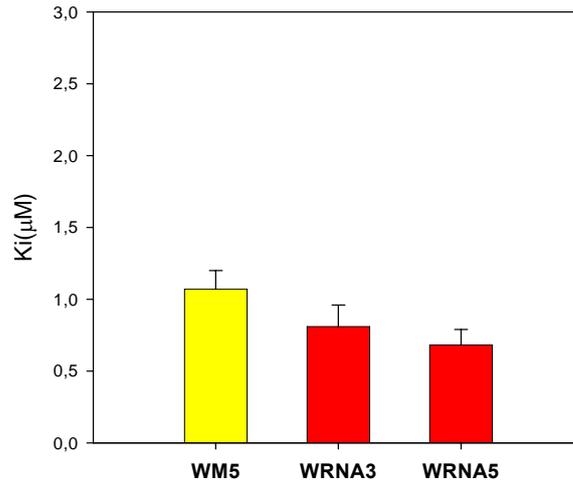


Fig. 2.36 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat36aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg80 (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM) + dsTAR 20 nM, pH 7.5, in presenza della prima serie di chinoloni esaminati, in concentrazione 10 μ M. N.A.= non attivo

Osservando i dati ottenuti vediamo che, lavorando con il peptide più lungo, siamo maggiormente in grado di discriminare tra composti attivi e non attivi, infatti in tali condizioni sperimentali, gli unici chinoloni in grado di spiazzare in parte il complesso risultano essere il WRNA3 e il WRNA5, con delle costanti di inibizione inferiori a quelle del controllo WM5, in particolare per il WRNA5. Il fatto che gli altri chinoloni in queste condizioni non siano in grado di spiazzare il complesso può essere dovuto alla presenza del competitore TAR a doppio filamento (dsTAR) con il quale i composti WRNA1, WRNA2 e WRNA4 probabilmente interagiscono non rendendosi così più disponibili per spiazzare il complesso wtTAR-Tat.

Infine i composti WRNA6 e WRNA8 risultano inattivi in entrambe le modalità di esecuzione del saggio. Tutti i dati sono in accordo con quelli ottenuti dai saggi EMSA, effettuati con il peptide da 36aa, nei quali risultavano attivi solamente i composti WRNA3 e WRNA5, sia nella modalità *competition* che *challenge assay*.

2.2.1.1.4 Studio dell'interazione dei chinoloni con gli acidi nucleici tramite dialisi all'equilibrio

In questa parte del lavoro si è passati ad analizzare il legame dei composti in esame nei confronti del bersaglio TAR-RNA, di suoi mutanti alle strutture *loop* e *bulge*, nonché all'affinità per sequenze di RNA non correlate a TAR (tRNA) e per DNA a singola e a doppia catena.

Inizialmente, per valutare l'interazione dei chinoloni con gli acidi nucleici, sono state effettuate titolazioni fluorimetriche. La metodica ha però presentato grosse problematiche: innanzitutto per raggiungere la saturazione del legame dovevano essere utilizzate elevate quantità di acido nucleico, con costi elevati anche per quantità limitate. Inoltre il metodo non era applicabile ai chinoloni non fluorescenti tra cui il WRNA3. Si sono provate ad effettuare anche titolazioni spettrofotometriche, osservando la variazione dello spettro di assorbanza in seguito all'aggiunta dei composti, ma anche questa metodica è stata abbandonata in quanto presenta gli stessi problemi descritti e inoltre non è abbastanza sensibile.

Si è quindi scelto di passare allo studio dell'interazione dei composti con gli acidi ribonucleici di interesse mediante dialisi all'equilibrio. In particolare, il primo protocollo elaborato si basava sull'utilizzo di camere da dialisi (*Spectrum Dialyzer*) contenenti ognuna 1.5 ml di soluzione e la successiva determinazione spettrofotometrica della concentrazione di chinolone libero. Il metodo presentava gli stessi limiti importanti già visti: la necessità di utilizzare elevati volumi sia di soluzioni di farmaco che di acido nucleico, nonché una bassa sensibilità dell'analisi spettrofotometrica. Per tali motivi si è deciso di passare allo studio dell'interazione con una tecnica di dialisi miniaturizzata, che prevede l'uso di *Mini Slide Tube*, con il vantaggio di poter effettuare un ampio numero di prove simultaneamente, utilizzando volumi relativamente ridotti.

Tale tecnica prevede l'allestimento di due camere da dialisi come descritto nella sezione "Materiali e Metodi" ed in particolare nella camera A (figura 4.4) viene introdotto il farmaco e l'acido nucleico, mentre nella camera B il tampone. All'equilibrio, la concentrazione di farmaco non legato, in grado di passare quindi nella camera B, viene determinata tramite misura dell'emissione di fluorescenza del composto a pH 3.0 e si risale alla sua concentrazione, tramite opportune rette di taratura, precedentemente costruite.

2.2.1.1.4.1 Studio dell'interazione dei chinoloni in esame con TAR *wild-type* e forme mutate di TAR

Innanzitutto si è analizzato il legame con il TAR *wild type* per i chinoloni risultati più attivi nei saggi di inibizione del complesso (WRNA3 e WRNA5), per quelli non attivi (WRNA6 e WRNA8) e per il controllo WM5. Per tutti i composti la valutazione degli

spettri di fluorescenza dopo la dialisi ha indicato una diminuzione di intensità nel campione in cui era presente il chinolone e il TAR, rispetto al campione contenente solo il farmaco, ad indicare che parte del farmaco lega il TAR. Si sono calcolati i valori di frazione legato per ogni chinolone e i risultati ottenuti sono rappresentati graficamente in figura 2.37.

	Frazione legata (v)
WRNA3-wtTAR	0.51 ± 0.02
WRNA5-wtTAR	0.49 ± 0.04
WRNA6-wtTAR	0.71 ± 0.13
WRNA8-wtTAR	0.50 ± 0.08
WM5-wtTAR	0.61 ± 0.02

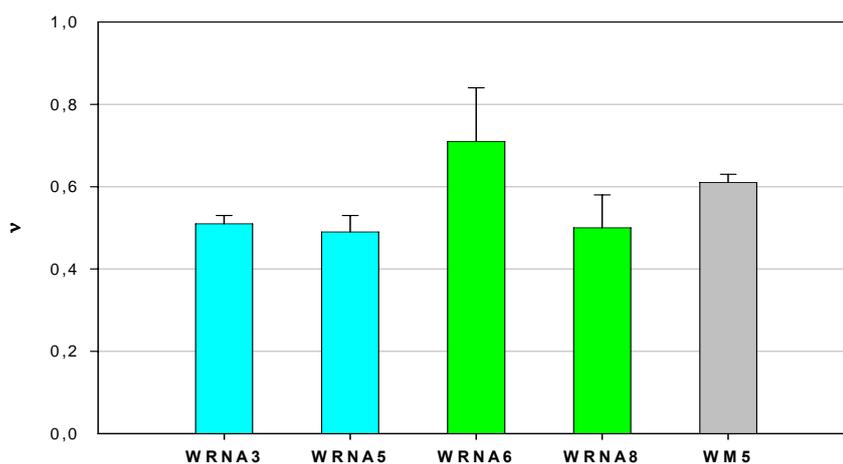


Fig. 2.37 Frazioni di chinoloni legate al wtTAR, ottenute mediante dialisi *Mini Slide Tube*, pH 7.5, T 25°C, in TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM). Tutti i valori fanno riferimento ad una concentrazione iniziale di chinolone pari a 30 µM, in rapporto stechiometrico 1:1 con l'acido nucleico.

Possiamo affermare dai dati ottenuti che tutti i chinoloni esaminati sono in grado di legare il wtTAR, a prescindere dal fatto che questi siano in grado o meno di spiazzare il complesso TAR-Tat. Sappiamo che i chinoloni WRNA6 e WRNA8 non interferiscono con la formazione del complesso, questo però non impedisce ai due chinoloni di avere comunque affinità per il TAR, anzi ciò non stupisce in modo rilevante vista la basicità dei nostri composti. Valutando l'affinità dei chinoloni in esame rispetto al valore ottenuto per il WM5, si può considerare una capacità di legame dei nuovi chinoloni simile a quella del nostro riferimento.

Ciò che a questo punto si è reso interessante per il nostro studio è stato cercare di capire in che modo avvenga l'interazione di questi chinoloni con il TAR. Per fare questo è stata studiata l'interazione dei farmaci con forme mutate di TAR, ovvero sequenze contenenti solo il *bulge* (TAR *bulge*), oppure prive sia del *bulge* che del *loop* (dsTAR) (figura 2.38).

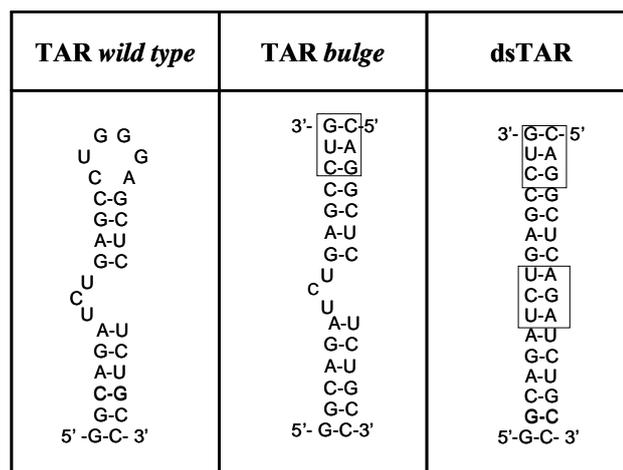


Fig. 2.38 Sequenze e strutture secondarie dell'RNA-TAR e dei suoi mutanti TAR *bulge* e dsTAR.

Per ragioni di ottimizzazione dei tempi e dei costi, tali prove sono state effettuate solo per i chinoloni WRNA3 e WRNA5, dimostratisi già attivi sul bersaglio. In figura 2.39 sono riportate graficamente le affinità relative dei due composti per i diversi mutanti, rispetto al TAR *wild type*.

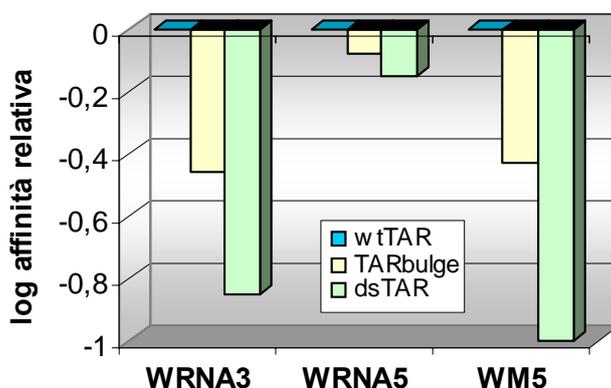


Fig. 2.39 Affinità relativa dei composti esaminati per i mutanti, rispetto al wtTAR. I valori riportati sono stati ricavati come logaritmo del rapporto $v(\text{mutante})/v(\text{wtTAR})$.

Osservando il grafico in figura 2.39 possiamo notare come l'affinità di legame dei chinoloni in esame, sia minore per i mutanti rispetto a quella per il TAR *wild type*. In particolar modo l'affinità diminuisce maggiormente per il mutante dsTAR rispetto al TAR che presenta ancora il *bulge*, ad indicare l'importanza di tale zona a singola catena nell'interazione con il chinolone. I risultati ottenuti per i composti WRNA3 e WRNA5 sono paragonabili a quanto osservato per il WM5; studi precedenti su tale composto hanno infatti evidenziato una minor capacità del composto di legare il TAR*bulge* rispetto al wtTAR e un'affinità praticamente nulla per il dsTAR. Inoltre, si deve fare una distinzione tra il comportamento dei due chinoloni monosostituiti con un anello eterociclico nei confronti dei mutanti: per WRNA3 notiamo infatti una diminuzione dell'affinità molto più marcata rispetto al WRNA5, indicando una maggiore specificità del WRNA3 per la struttura; WRNA5, che ha un'affinità più simile per le diverse forme di TAR, sembrerebbe invece legare il TAR con minor specificità, osservazione confermata anche paragonando i rapporti relativi tra le K_i nei saggi *Fluorescence Quenching* effettuati con i peptidi da 10 e 36 aa, come descritto precedentemente. Il composto WRNA5 inoltre si comportava in maniera sostanzialmente simile nei saggi EMSA competition e challenge (paragrafo 2.2.1.1.2), dato che valorizza e conferma una capacità più limitata del WRNA5 rispetto al WRNA3 di discriminare tra diverse strutture del TAR.

2.2.1.1.4.2 Interazioni dei chinoloni in esame con altri tipi di acidi nucleici

E' stata inoltre esaminata la selettività dei composti nei confronti del TAR, analizzandone la capacità di stabilire interazioni con altri tipi di acidi nucleici. In particolare, è stata verificata e quantificata l'interazione con il tRNA, un acido ribonucleico cellulare e non specifico di HIV-1, anch'esso strutturato in zone a doppia catena, *bulges* e *loops*, oltre che con acidi desossiribonucleici sia a singola che a doppia catena.

Anche in questo caso le dialisi sono state effettuate in triplicato e in figura 2.40 è riportato graficamente il confronto tra i valori di frazioni legate ottenuti con i tre diversi tipi di acido nucleico.

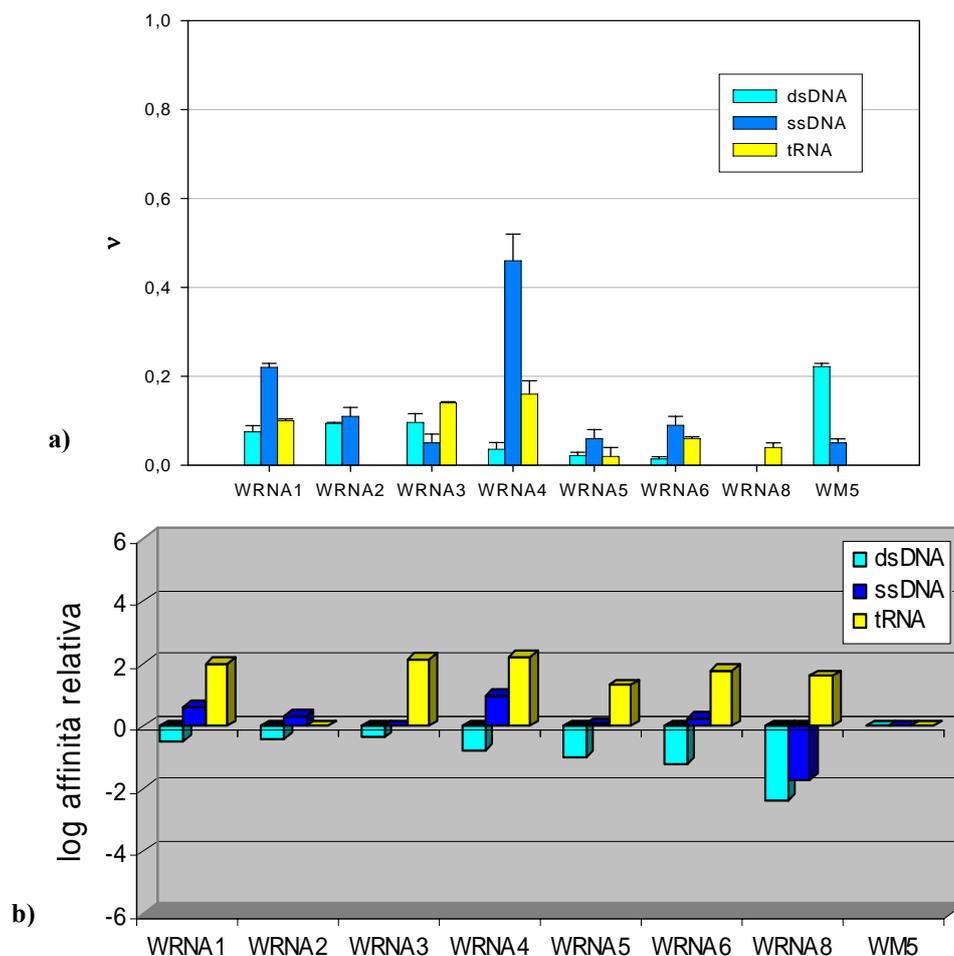


Fig. 2.40 a) Frazioni di chinoloni legate ai diversi tipi di acido nucleico, ottenute mediante dialisi *Mini Slide Tube*, a pH 7.5 T 25°C, in TNMg (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM). Tutti i valori fanno riferimento ad una concentrazione iniziale di chinolone pari a 30 µM, in rapporti stechiometrici 1:1 con l'acido nucleico. **b)** Affinità relativa dei chinoloni in esame per i diversi acidi nucleici rispetto al controllo WM5.

Osservando il grafico in figura 2.40 possiamo innanzitutto apprezzare una certa affinità di quasi tutti i chinoloni della nuova serie per il tRNA, rispetto al controllo WM5. Già studi precedenti avevano evidenziato l'incapacità del WM5 di legare il tRNA, probabilmente perchè la conformazione secondaria del tRNA, molto strutturata rispetto a quella del TAR, ostacola il legame di questo composto. I nuovi chinoloni presentano invece una certa capacità di legare il tRNA; la forte carica positiva conferisce probabilmente a tali composti la capacità di interagire anche con acidi ribonucleici strutturati, differenti dal TAR, presumibilmente a livello delle zone a singola catena. Per quanto riguarda il dsDNA osserviamo come l'affinità dei chinoloni della nuova serie sia in tutti i casi inferiore a quella osservata per il WM5, anche se in maniera più o meno marcata per i diversi composti; mentre nel caso del DNA a singolo filamento

notiamo un'affinità di legame nella maggior parte dei casi simile a quella del controllo, eccetto per il WRNA4 per cui risulta essere maggiore. Possiamo notare inoltre come il WRNA8 sia l'unico composto della nuova serie incapace di legare entrambe le forme di DNA.

2.2.1.1.5 Saggi di citotossicità

Un'indicazione sulla possibile genotossicità dei chinoloni è ottenibile da studi di citotossicità; questo dato è inoltre utile a stabilire l'indice di selettività di composti a potenziale attività antivirale.

L'effetto tossico di questa prima serie di composti è stato valutato analizzando la capacità di inibire la crescita cellulare, dopo 72 ore di incubazione, su diverse linee cellulari Jurkat, CEM e 293T.

La vitalità cellulare in presenza dei composti è stata stimata attraverso il saggio colorimetrico dell'MTT (descritto nella sezione "Materiali e Metodi"), ripetuto in triplicato, utilizzando come controllo negativo non citotossico la ciprofloxacina e come controllo positivo tossico per le cellule la doxorubicina.

In tabella 2.11 sono riportati i valori medi di EC₅₀ dei diversi composti in esame, in cellule Jurkat, dove l'EC₅₀ corrisponde alla concentrazione che determina la morte del 50% delle cellule in coltura.

	EC ₅₀ (μM)
WM5	61,0 ± 4.6
WRNA1	>100
WRNA2	>100
WRNA3	>100
WRNA4	>100
WRNA5	>100
WRNA6	>100
WRNA8	>100
DOXORUBICINA	0.1 ±
CIPROFLOXACINA	>100

Tab. 2.11 Valori di EC₅₀ dei chinoloni in esame nei confronti di cellule Jurkat dopo 72h di incubazione.

Osservando i valori di EC₅₀ possiamo notare come nessun chinolone della prima serie sia citotossico per questa linea cellulare, e lo stesso risultato si è ottenuto con le cellule CEM e 293T. Il valore di EC₅₀ ottenuto per il composto WM5 è risultato essere 61.5 µM, dato in perfetto accordo con quello ottenuto da studi precedenti (56.2 µM) e già riportato in letteratura (87).

2.2.1.1.6 Valutazione dell'attività antivirale

Il saggio *in vivo* di attività antivirale dei chinoloni è stato effettuato, dal gruppo della Prof.ssa Parolin del Dipartimento di Microbiologia e Virologia dell'Università di Padova, sui farmaci risultati maggiormente attivi nei saggi di attività *in vitro* (WRNA3 e WRNA5) e sul controllo WM5.

L'attività antivirale è stata valutata sulla linea cellulare linfocitaria Jurkat infettata con un ceppo di HIV-1 adattato in laboratorio (HXBc2) ed è stata considerata, come parametro virologico, la presenza nel soprannatante delle colture cellulari dell'attività di trascrittasi inversa (RT).

I dati ottenuti per i composti esaminati della prima serie di chinoloni sono riportati nei grafici in figura 2.41, dov'è riportata l'attività della trascrittasi inversa (espressa come cpm/500 µl) a diversi giorni dopo l'infezione, per i diversi composti, somministrati a diverse concentrazioni.

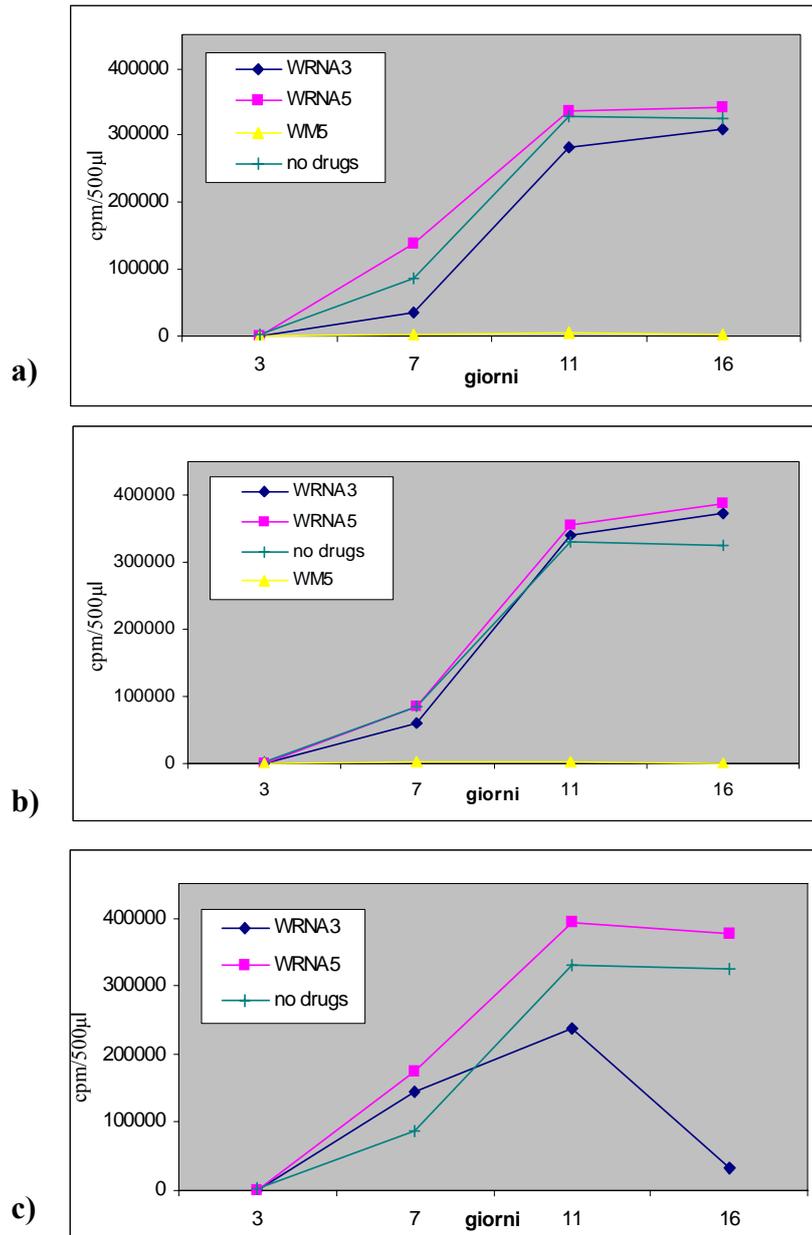


Fig 2.41 Attività antivirale dei chinoloni esaminati della I serie, sulla linea cellulare Jurkat infettata, somministrati a diverse concentrazioni: 1 µM (a), 10 µM (b) e 100 µM (c). E' stato considerato, come parametro virologico, la presenza e la quantificazione nel surnatante delle colture cellulari dell'attività di trascrittasi inversa (RT) dopo diversi giorni di infezione.

Come possiamo osservare dai grafici, il controllo WM5 è in grado di inibire la crescita virale già in concentrazione 1 µM, mentre tra i chinoloni esaminati della nuova serie, solamente il WRNA3 sembra in grado di interferire con la crescita del virus se somministrato in concentrazione 100 µM, almeno dopo 11 giorni di incubazione.

2.2.1.1.7 Determinazione sperimentale del coefficiente di ripartizione e valutazione dell'*uptake* cellulare

Data la citotossicità bassa o assente della maggior parte dei composti in esame e la modesta attività antivirale in vivo dei chinoloni WRNA3 e WRNA5, ci si è chiesti se, effettivamente, i composti in esame siano o meno in grado di entrare nelle cellule, tramite la misura sperimentale del logP ed una valutazione *in vivo* dell'*uptake* cellulare. Il coefficiente di ripartizione (logP) è una misura della propensione di un composto a ripartirsi tra una fase acquosa e una non-acquosa e rappresenta quindi un indicatore del passaggio dei composti attraverso le membrane cellulari.

I valori di logP sperimentali sono stati determinati con la metodica descritta in “Materiali e Metodi”, gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato ed i valori ottenuti sono riportati in tabella 2.12.

	LogP sperimentale
WM5(I)	0.74 ± 0.10
WRNA1	2.57 ± 0.56
WRNA2	-0.94 ± 0.41
WRNA3	0.37 ± 0.08
WRNA4	-0.58 ± 0.26
WRNA5	0.33 ± 0.10
WRNA6	-0.47 ± 0.12
WRNA8	-0.09 ± 0.08

Tab. 2.12 Valori di logP sperimentali della prima serie di chinoloni.

Un valore di logP positivo indica la tendenza del composto di passare nella fase oleosa, mentre un valore di logP negativo indica un composto non solubile in ottanolo.

Osservando i valori di logP sperimentali determinati per questa prima serie di chinoloni, i composti che sembrano essere potenzialmente in grado di attraversare le membrane sono i chinoloni dispari (WRNA1, WRNA3, WRNA5) ed il controllo WM5.

A questo punto si è passati a stimare l'effettiva capacità dei composti di attraversare la membrana di cellule in coltura, attraverso l'esecuzione di saggi di *uptake*, in quanto *in vivo* potrebbero intervenire altri meccanismi di trasporto. Per questa prima serie di chinoloni sono stati effettuati esperimenti di *uptake* su due differenti linee cellulari:

cellule Jurkat e cellule CEM, mentre per la seconda serie di composti il saggio è stato effettuato solamente sulle cellule Jurkat.

Per valutare l'*uptake* da parte delle cellule è stata sfruttata la fluorescenza intrinseca dei composti in esame, per quantificare appunto quanto composto viene captato dalle cellule. Le cellule vengono infatti incubate in presenza dei diversi chinoloni in concentrazione 100 μM , come descritto nei "Materiali e Metodi". Trascorso il tempo di incubazione le cellule vengono separate dalla soluzione extracellulare ed il *pellet*, nel quale troviamo anche il farmaco captato dalle cellule, risospeso in tampone glicina-HCl (pH3). A tali condizioni di pH, praticamente tutti i chinoloni si sono dimostrati essere fluorescenti, per cui dall'intensità di fluorescenza è possibile risalire, tramite opportune rette di taratura precedentemente costruite (una di tale rette è riportata a titolo di esempio in figura 2.42b), alla concentrazione di farmaco nella soluzione.

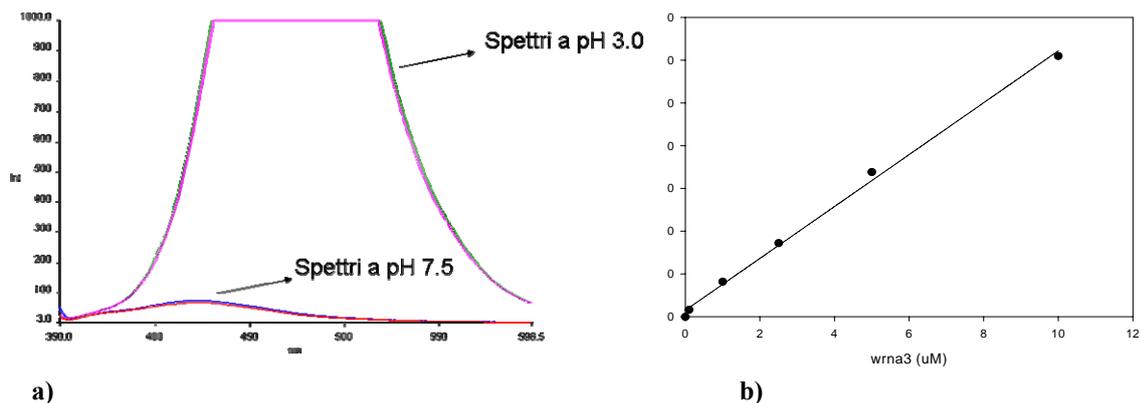


Fig. 2.42 Spettri di emissione di fluorescenza del composto WRNA3 in tampone TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM) a pH7.5 e in tampone Gly-HCl a pH3 (a) e relativa retta di taratura che correla la concentrazione di farmaco con l'intensità di fluorescenza in condizioni acide (b).

Inizialmente il saggio di *uptake* è stato effettuato solo per i chinoloni della prima serie risultati maggiormente attivi (WRNA3-WRNA5-WRNA1), per un chinolone non risultato attivo (WRNA2) e per il controllo positivo WM5.

Per tali chinoloni, si è tentato anche di favorire l'entrata dei composti nelle cellule applicando un protocollo comunemente usato per la trasfezione cellulare ed utilizzato anche nei saggi di infezione virale a cui saranno sottoposti i composti WRNA: il trattamento con lipofectamine. Si tratta di una classe di molecole formate da una coda policationica e da una porzione lipidica, che prevede la pre-incubazione dei farmaci con lipofectamina 2000 in concentrazione 0.04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ per 20 minuti a temperatura ambiente.

Abbiamo anche verificato l'efficacia della tecnica *Citospin*, un'altra metodologia utilizzata per favorire l'entrata dei virus nelle cellule, che consiste nella centrifugazione delle cellule a contatto con il farmaco per 2 ore a 2500 rpm.

I saggi sono stati ripetuti più volte e a differenti tempi di incubazione, ma è risultato subito evidente come l'efficienza di entrata sia massima dopo 3 ore di incubazione e non incrementi aumentando tale tempo. In figura 2.43 è rappresentata graficamente la capacità dei composti della prima serie di entrare nelle cellule, espressa come percentuale di farmaco rilasciato dalle cellule in seguito a lisi cellulare.

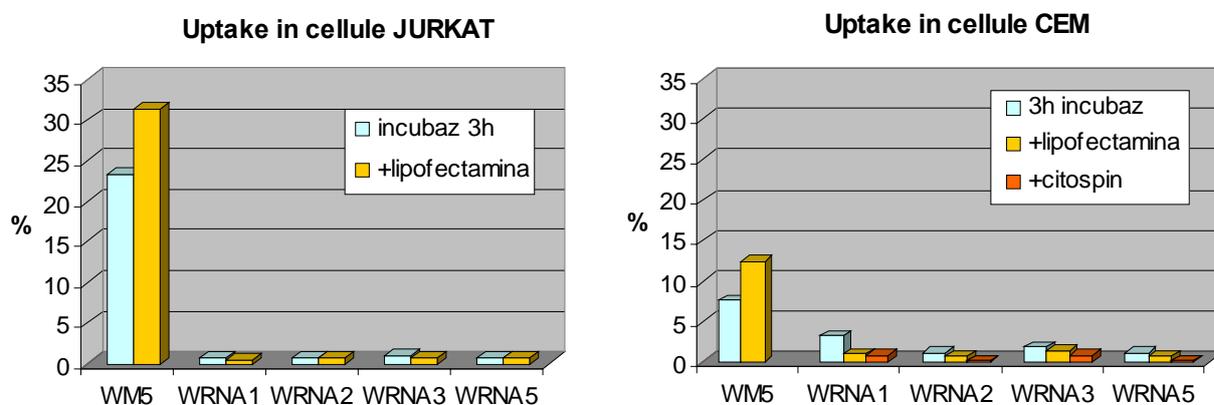


Fig. 2.43 *Uptake* intracellulare dei chinoloni esaminati della prima serie in due diverse linee cellulari dopo 3 ore di incubazione, senza trattamenti, con trattamento con lipofectamina e con trattamento con tecnica *Citospin*.

Come risulta evidente, per tutti i chinoloni non citotossici della prima serie esaminati (WRNA1, WRNA2, WRNA3 e WRNA5) la percentuale di farmaco rilasciata è in molti casi inferiore all'1%, in particolar modo per le cellule Jurkat. Quindi la carica positiva, a pH fisiologico, dei nuovi chinoloni inibisce l'*uptake* cellulare, mentre il WM5, essendo uno zwitterione, può entrare nelle cellule e compiere la sua attività antivirale.

Allo scopo di favorire l'entrata dei composti nelle cellule, si è tentato di forzare il sistema con trattamenti normalmente sfruttati in biologia cellulare per la trasfezione con acidi nucleici delle cellule: il trattamento con lipofectamina 2000 e la tecnica *Citospin*. Possiamo vedere come il trattamento con lipofectamina aumenti l'*uptake* del controllo WM5, mentre non influenza positivamente l'entrata dei nostri composti, sempre a causa della loro notevole carica positiva. Anche la tecnica *Citospin*, testata solo su cellule CEM, non è in grado di migliorare l'entrata dei composti.

Il fatto che tali composti non siano in grado di entrare nelle cellule può spiegare la loro non citotossicità. Inoltre tale difficoltà di attraversare le membrane cellulari può giustificare la bassa attività antivirale, nei confronti delle cellule infettate, dei composti attivi nei saggi in vitro.

2.2.1.2 STUDIO DELLA II SERIE DI 2-FENILCHINOLONI

Sulla base dei risultati appena descritti è stata sintetizzata una seconda serie di analoghi (dal WRNA9 al WRNA23), allo scopo di delineare più precisamente uno studio relazione struttura/attività, per questa serie. Assieme a questi composti è stato testato anche il chinolone FQ1.

In particolare i chinoloni di questa seconda serie presentano una sola catena laterale carica, in analogia con i composti risultati più attivi dall'analisi della prima serie (WRNA3 e WRNA5). Sono quindi state effettuate modificazioni sia a livello della catena laterale, come sostituzioni bioisosteriche della piperidina o della N-metilpiperazina e allungamento o modificazioni della catena alchilica, sia modifiche a livello dell'anello chinolonico.

Tutte le modificazioni che caratterizzano questa seconda serie sono già state descritte nella parte introduttiva.

2.2.1.2.1 Proprietà chimico-fisiche dei chinoloni esaminati

Nessuno dei nuovi composti esaminati è risultato esser solubile in acqua, quindi tutte le polveri sono state prima sciolte in DMSO e successivamente diluite in acqua.

Anche per questa serie di composti sono stati registrati gli spettri di assorbimento da 290 a 450 nm e in tale *range*, tutti i composti presentano una banda di assorbimento approssimativamente attorno ai 330 nm (fig. 2.44).

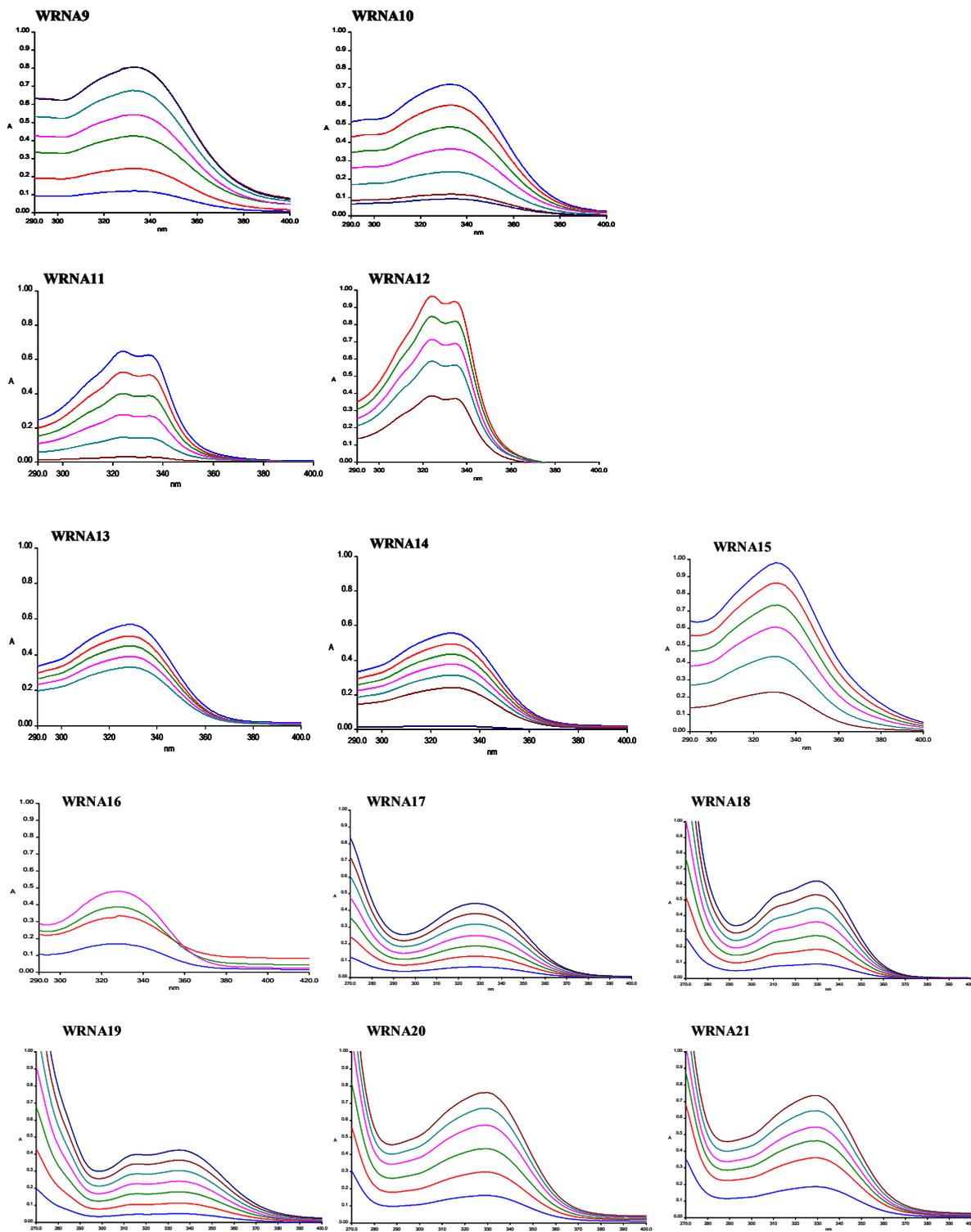


Fig. 2.44 Spettri di assorbimento dei chinoloni della seconda serie eseguiti a pH 7.5, T 25° C, in TNMg (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM).

Anche in questo caso, gli spettri di assorbimento sono serviti per la costruzione delle rette di taratura per il calcolo dei coefficienti di estinzione molare, riportati in tabella 2.13.

WRNA9	$\epsilon_{333\text{nm}} = 9581 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA10	$\epsilon_{333\text{nm}} = 6798 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA11	$\epsilon_{328\text{nm}} = 31175 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA12	$\epsilon_{324\text{nm}} = 20728 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA13	$\epsilon_{329\text{nm}} = 14976 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA14	$\epsilon_{329\text{nm}} = 9020 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA15	$\epsilon_{331\text{nm}} = 13439 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA16	$\epsilon_{329\text{nm}} = 16470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA17	$\epsilon_{329\text{nm}} = 17217 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA18	$\epsilon_{329\text{nm}} = 10393 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA19	$\epsilon_{329\text{nm}} = 8833 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA20	$\epsilon_{329\text{nm}} = 13242 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
WRNA21	$\epsilon_{329\text{nm}} = 14543 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Tab 2.13 Valori dei coefficienti di estinzione molare dei chinoloni della seconda serie

Per quanto riguarda la caratterizzazione fluorimetrica si sono dimostrati fluorescenti a pH fisiologico solamente i composti WRNA13, WRNA14, WRNA15, WRNA16, WRNA17, WRNA18, WRNA20 e WRNA21, eccitando alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento, con emissione intorno ai 440-450 nm (Fig. 2.45).

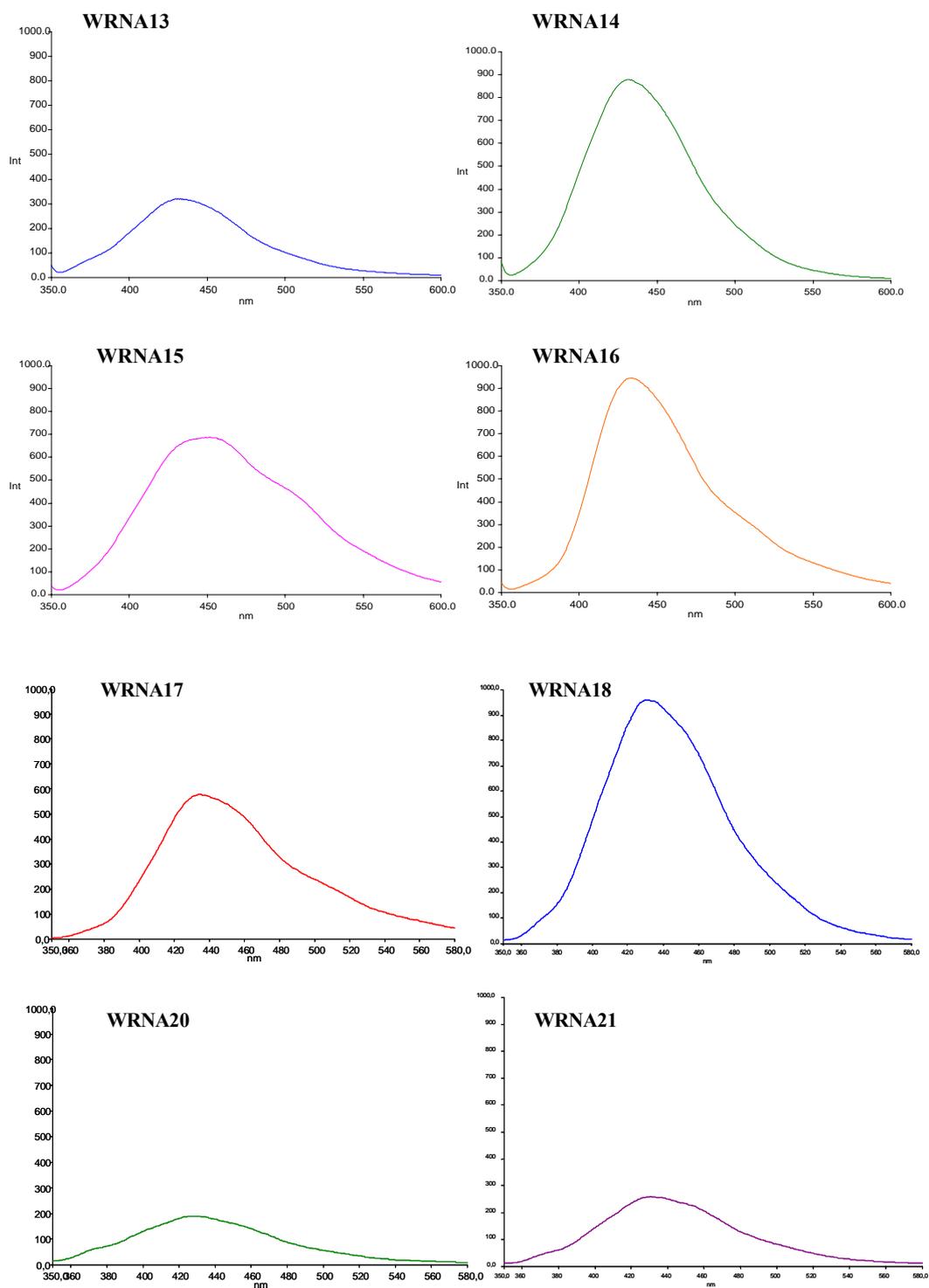


Fig. 2.45 Spettri di emissione di fluorescenza a pH 7.5 in TNMg (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM), T 25° C dei chinoloni WRNA13, WRNA14, WRNA15, WRNA16, WRNA17, WRNA18, WRNA20, WRNA21 in concentrazione 50 μM , in seguito ad eccitazione alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento.

Gli altri composti esaminati (WRNA9, WRNA10, WRNA11, WRNA12, WRNA19) presentano invece uno spettro di fluorescenza praticamente nullo in seguito ad eccitazione. Per tali chinoloni si è quindi passati a stimare lo spettro di emissione in tampone glicina 0.1 M a pH 3.0, per valutare se anche in questo caso, come per i chinoloni della prima serie, si osservavi un aumento di intensità di fluorescenza pH-dipendente (figura 2.46).

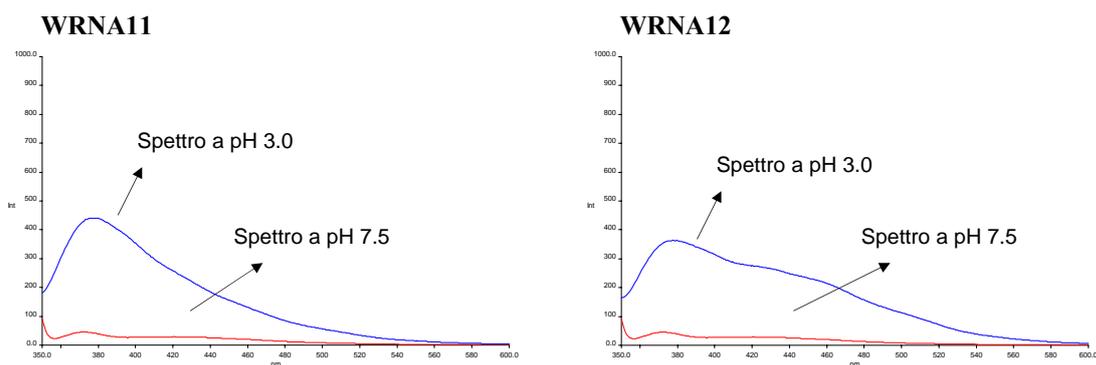


Fig. 2.46. Spettri di emissione di fluorescenza in tampone Gly a pH 3.0 e in TNMg (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM) a pH 7.5, dei chinoloni WRNA11 e WRNA12 a concentrazione 50 μ M.

I chinoloni WRNA9, WRNA10 e WRNA19 non hanno mostrato un'emissione di fluorescenza neppure a pH 3.0, mentre per i composti WRNA11 e WRNA12 si ha un aumento del picco di intensità di fluorescenza a valori di pH inferiori.

2.2.1.2.2 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA

Il saggio di FQ, messo a punto con lo studio della prima serie di composti, è stato utilizzato per valutare l'inibizione della seconda serie di chinoloni. L'analisi dei composti WRNA9, WRNA10 e WRNA19 è stata però presto abbandonata in quanto le soluzioni dei composti tendevano a diventare scure nel tempo, indice di una probabile instabilità dei composti, presumibilmente riconducibile all'ossidazione del gruppo idrossilico in posizione 5 del nucleo chinolonico.

Inizialmente sono state effettuate le titolazioni con il peptide da 10aa in tampone TNMg20; tale protocollo, più semplice e meno costoso, si è rivelato infatti il metodo ideale per effettuare uno *screening* iniziale, passando solo successivamente ad eventuali modifiche del saggio per approfondire o comprendere meglio i dati ottenuti.

In tabella 2.14 sono riportati i valori delle K_i per i composti esaminati, riassunti poi graficamente in figura 2.47.

	K_i (μM)
WM5	1.82 ± 0.34
WRNA5	1.51 ± 0.35
WRNA11	1.68 ± 0.42
WRNA12	1.57 ± 0.25
WRNA13	1.68 ± 0.33
WRNA14	1.48 ± 0.28
WRNA15	1.43 ± 0.28
WRNA16	2.13 ± 0.47
WRNA17	1.76 ± 0.27
WRNA18	1.02 ± 0.12
WRNA20	1.32 ± 0.16
WRNA21	1.20 ± 0.11
WRNA22	1.63 ± 0.18
WRNA23	N.A.
FQ1	1.47 ± 0.16

Tab. 2.14 Valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg20 (Tris 10mM, NaCl 20mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM) pH 7.5, in presenza della seconda serie di chinoloni esaminati, in concentrazione 10 μM . N.A.= non attivo.

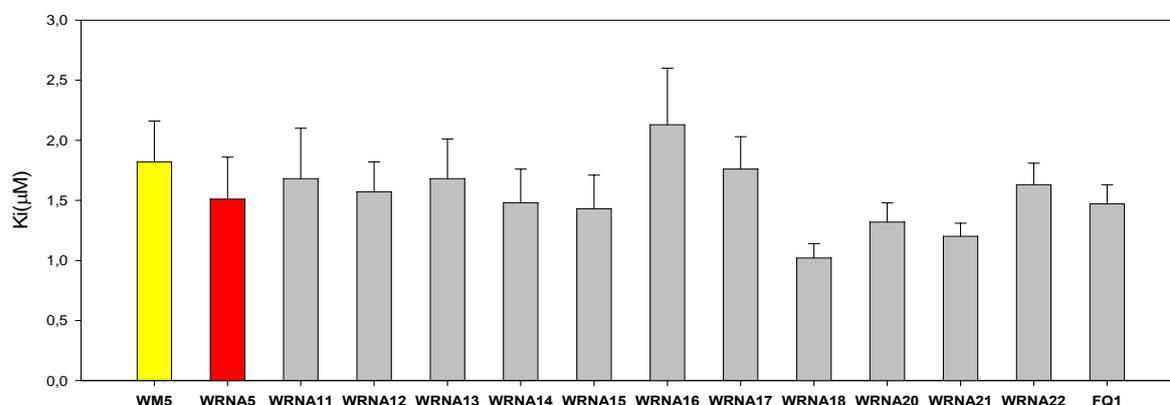


Fig. 2.47 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg20 (Tris 10mM, NaCl 20mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM) pH 7.5, in presenza della seconda serie di chinoloni esaminati, in concentrazione 10 μM .

Dal saggio con il peptide da 10aa è emerso come tutti i nuovi composti monosostituiti con un anello eterociclico azotato abbiano attività paragonabile o in certi casi migliore rispetto al composto più attivo della prima serie, il WRNA5, eccezione fatta per i composti WRNA16 e WRNA17, che mostrano valori di K_i più alti e per il composto WRNA23 che risulta essere inattivo.

Allo scopo di confermare i primi risultati ottenuti e di evidenziare una maggiore differenza di attività tra i vari composti, si è pensato di ripetere le titolazioni Tat-TAR a concentrazioni saline maggiori sfavorendo in parte il legame Tat-TAR, allo scopo di favorire lo spiazzamento del complesso da parte dei composti maggiormente attivi. Si sono quindi ripetute le titolazioni con il peptide da 10aa in tampone TNMg con le concentrazioni di sale 40 μM ; in queste condizioni la costante di dissociazione del complesso peptide-RNA risulta essere di $6.61 \pm 1.28 \text{ nM}$. In tabella 2.15 e in figura 2.48 è riportato il confronto dei valori di K_i misurati in queste condizioni.

In queste condizioni sperimentali non sono stati testati i composti WRNA22, WRNA23 e FQ1.

	K_i (μM)
WRNA5	1.21 ± 0.16
WRNA11	1.50 ± 0.24
WRNA12	1.53 ± 0.17
WRNA13	1.17 ± 0.18
WRNA14	1.04 ± 0.11
WRNA15	1.09 ± 0.11
WRNA16	1.93 ± 0.36
WRNA17	1.72 ± 0.27
WRNA18	0.86 ± 0.11
WRNA20	0.94 ± 0.12
WRNA21	0.91 ± 0.10

Tab. 2.15 Confronto valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg40 (Tris 10mM, NaCl 40mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM) pH 7.5, in presenza della seconda serie di chinoloni esaminati in concentrazione 10 μM .

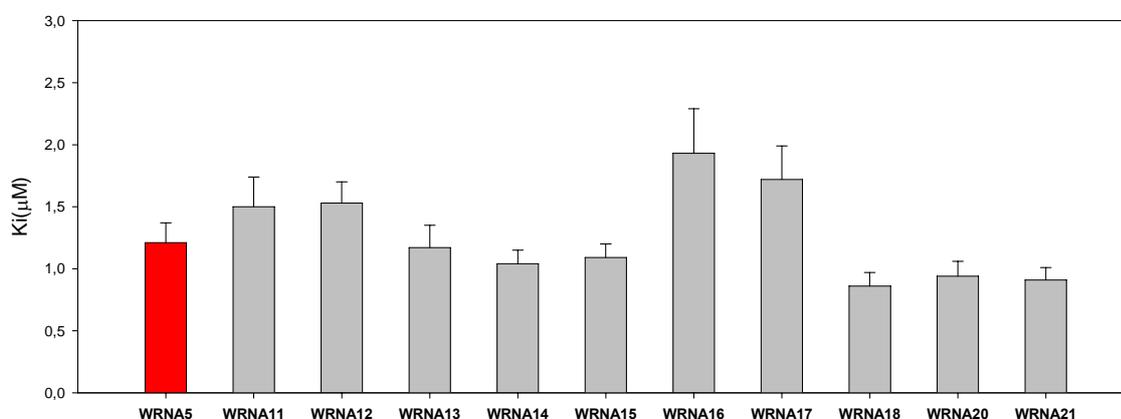


Fig. 2.48 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg40 (Tris 10mM, NaCl 40mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 10mM) pH 7.5, in presenza della seconda serie di chinoloni esaminati in concentrazione 10 μM .

In queste condizioni sperimentali riusciamo ad apprezzare una maggior discrepanza di attività tra i vari composti, ed in particolare i composti WRNA16 e WRNA17 si sono dimostrati possedere minor attività rispetto gli altri. Si è scelto quindi di procedere aumentando ulteriormente la concentrazione salina per verificare ulteriori differenze tra i vari composti (tabella 2.16 e figura 2.49).

	Ki (μM)
WRNA5	0.87 ± 0.09
WRNA11	1.27 ± 0.16
WRNA12	0.93 ± 0.05
WRNA13	0.95 ± 0.09
WRNA14	0.65 ± 0.02
WRNA15	0.83 ± 0.01
WRNA16	1.41 ± 0.11
WRNA17	1.45 ± 0.03
WRNA18	0.95 ± 0.06
WRNA20	0.76 ± 0.08
WRNA21	0.58 ± 0.08

Tab 2.16 Valori di Ki ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg80 (Tris 10mM, NaCl 80mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM) pH 7.5, in presenza della seconda serie di chinoloni esaminati in concentrazione 10 μM .

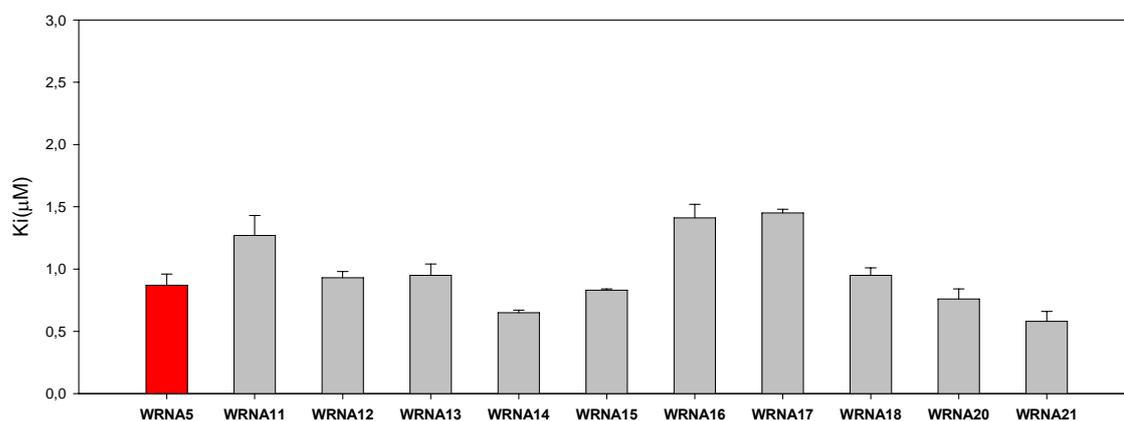


Fig. 2.49 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di Ki ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg80 (Tris 10mM, NaCl 80mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 10 M) pH 7.5, in presenza della seconda serie di chinoloni esaminati in concentrazione 10 μM .

Questa volta le titolazioni del peptide di 10aa con l'RNA, in presenza dei composti sono state eseguite ad una concentrazione salina di 80mM, ottenendo un valore di Kd pari a 15.58 ± 2.72 nM.

Lavorando in queste condizioni sperimentali riusciamo ad apprezzare una maggior discrepanza di attività tra i vari composti. In particolare i chinoloni che presentano un'attività leggermente migliore rispetto al composto di riferimento WRNA5 sono il WRNA18, il WRNA20 e il WRNA21. I composti WRNA13, WRNA14 e WRNA15 hanno attività paragonabile al WRNA5 ed infine gli altri composti testati (WRNA11, WRNA12, WRNA16 e WRNA17) hanno dimostrato un'attività minore. In particolare è bene sottolineare come il composto WRNA17 ed in particolare il WRNA16 siano quelli meno in grado di spiazzare il complesso, tanto da risultare in alcune titolazioni sono debolmente attivi o addirittura inattivi.

A questo punto si è passati a valutare l'efficacia nei confronti del complesso che si forma tra il TAR ed il peptide di 36aa (figura 2.50). Per i chinoloni della prima serie il saggio con tale peptide, più simile alla proteina completa in termini di affinità per il TAR, si era infatti dimostrato maggiormente selettivo e quindi utile per discriminare meglio i composti più attivi.

	Ki (μM)
WRNA5	0.80 ± 0.10
WRNA11	0.96 ± 0.02
WRNA12	0.99 ± 0.16
WRNA13	1.09 ± 0.16
WRNA14	0.68 ± 0.11
WRNA15	0.88 ± 0.14
WRNA16	N.A.
WRNA17	N.A.
WRNA18	1.03 ± 0.17
WRNA20	0.77 ± 0.13
WRNA21	0.57 ± 0.05
WRNA22	0.76 ± 0.16
WRNA23	N.A.
FQ1	0.69 ± 0.23

Tab. 2.17 Valori di Ki ottenuti dalla titolazione del Tat36aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg80 (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM) + dsTAR 20 nM, pH 7.5, in presenza della seconda serie di chinoloni esaminati in concentrazione 10 μM. N.A.= non attivo

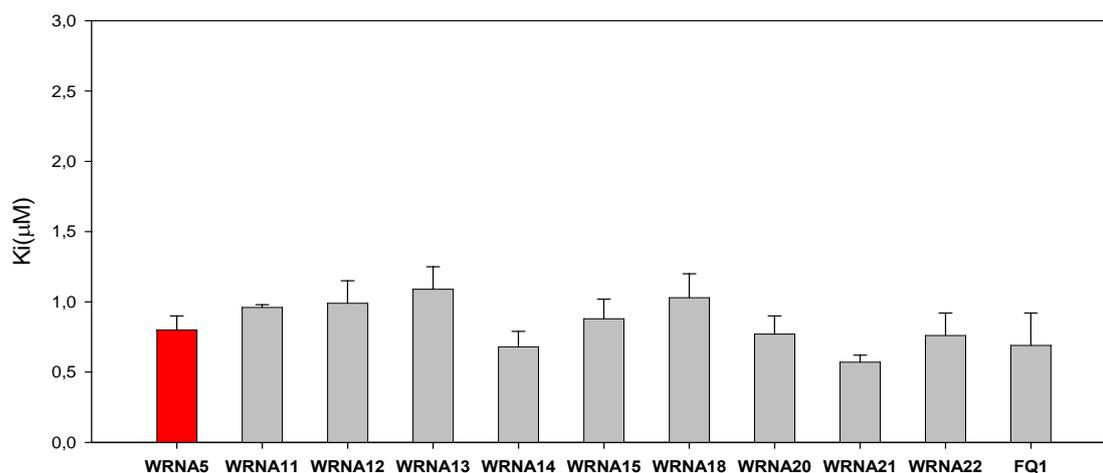


Fig. 2.50 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat36aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher* in TNMg80 (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM) + dsTAR 20 nM, pH 7.5, in presenza della seconda serie di chinoloni esaminati in concentrazione 10 μ M.

Eseguendo il saggio con il peptide più lungo si possono notare, anche per questa serie monosostituita, valori di K_i più bassi, con un andamento che rispecchia quello ottenuto lavorando con il Tat da 10aa; il valore di K_i con il peptide lungo permette anche di discriminare tra l'attività dei vari composti, che risulta appiattita dall'analisi con il peptide basico.

In particolare, con il Tat da 36aa, oltre al composto WRNA23, non risultano più in grado di spiazzare il complesso i chinoloni WRNA16 e WRNA17, sia perché inibitori deboli sia perché, presumibilmente, interagiscono con il dsTAR competitore presente oltre che con il TAR *wild-type*. Per quanto riguarda gli altri composti, essi sono tutti più o meno in grado di spiazzare il complesso con costanti di inibizione attorno all'1 μ M. I composti maggiormente attivi in queste condizioni, con attività pari o migliore rispetto al WRNA5, sono i chinoloni WRNA14, WRNA20, WRNA21.

2.2.1.2.3 Saggi di citotossicità

Anche per i nuovi composti è stata valutata la tossicità in cellule Jurkat, dopo 72h di incubazione, utilizzando il saggio colorimetrico dell'MTT. In tabella 2.18 sono riportati i valori di EC_{50} dei diversi composti in esame, corrispondenti cioè alla concentrazione che determina la morte del 50% delle cellule in coltura.

	EC ₅₀ (μM)		EC ₅₀ (μM)
WM5	61,0 ± 4.6	WRNA9	42,3 ± 4.5
WRNA13	>100	WRNA10	43,8 ± 8.0
WRNA14	>100	WRNA19	23,3 ± 1.8
WRNA15	>100	WRNA11	90,0 ± 14.1
WRNA20	>100	WRNA12	>100
WRNA21	87,0 ± 12.5	WRNA16	51,3 ± 5,3
WRNA22	>100	WRNA17	64,3 ± 0,4
WRNA23	>100	FQ1	36,00 ± 5,6
WRNA18	91.7 ± 14.4		

Tab. 2.18 Valori di EC₅₀ dei chinoloni in esame nei confronti di cellule Jurkat dopo 72h di incubazione.

Osservando i dati misurati per i nuovi composti, possiamo notare tossicità nulle o basse per i composti caratterizzati da un anello chinolonico identico a quello della prima serie (WRNA13, WRNA14, WRNA15, WRNA20, WRNA21, WRNA22, WRNA23, WRNA18) e per quelli caratterizzati dall'assenza dei metossili in posizione 5 e 7 (WRNA11 e WRNA12), mentre i composti WRNA9, WRNA10, FQ1 e in particolare il WRNA19 presentano una EC₅₀ più bassa. Come già accennato tali composti tendono però a degradare nel tempo e la tossicità potrebbe essere imputabile alla formazione di un intermedio tossico per le cellule. Infine, i composti WRNA16, WRNA17 presentano una tossicità residua simile a quella misurata per il controllo WM5 (in accordo con quanto già riportato in letteratura (87)).

2.2.1.2.4 Determinazione sperimentale del coefficiente di ripartizione e valutazione dell'*uptake* cellulare

Anche per i nuovi chinoloni in studio è stata investigata la capacità di entrare nelle cellule, tramite la misura sperimentale del loro logP ed una valutazione *in vivo* dell'*uptake* cellulare. In tabella 2.19 sono riportati i valori di logP sperimentali dei nuovi chinoloni testati (dal WRNA12 al WRNA21).

	LogP sperimentale
WRNA13	0.19 ± 0.03
WRNA14	1.92 ± 0.15
WRNA15	1.18 ± 0.04
WRNA20	0.58 ± 0.08
WRNA21	0.82 ± 0.13
WRNA18	1.26 ± 0.02
WRNA19	1.88 ± 0.25
WRNA11	0.74 ± 0.01
WRNA12	0.87 ± 0.03
WRNA16	1.04 ± 0.06
WRNA17	0.90 ± 0.06

Tab. 2.19 Valori di logP sperimentali della seconda serie di chinoloni.

Mentre per i composti della prima serie avevamo valori di logP negativi o, se positivi, molto bassi, i nuovi chinoloni testati presentano tutti logP positivi, mediamente più alti. Questo dato ci conferma come la presenza di una sola catena laterale carica positivamente (chinoloni dispari della prima serie e tutti quelli della seconda serie), renda il composto potenzialmente più in grado di attraversare le membrane per diffusione passiva.

Dato che il logP rappresenta solo una stima teorica della potenzialità dei composti di attraversare le membrane, anche per questa serie si è passati a stimare effettivamente la capacità dei composti di venir captati dalle cellule in coltura attraverso l'esecuzione di saggi di *uptake*. Per i nuovi composti il saggio è stato effettuato utilizzando solamente la linea cellulare Jurkat. Non sono stati testati i composti WRNA9, il WRNA10 e il WRNA19 che, oltre ad essere difficilmente analizzabili per i problemi di stabilità già descritti prima, non si sono dimostrati fluorescenti nel tampone di lisi, non permettendo quindi di quantificare la percentuale rilasciata dalle cellule.

In figura 2.51 sono riportati graficamente i rapporti relativi tra le percentuali di *uptake* dei nuovi composti e del WRNA5, rispetto al composto di riferimento WM5.

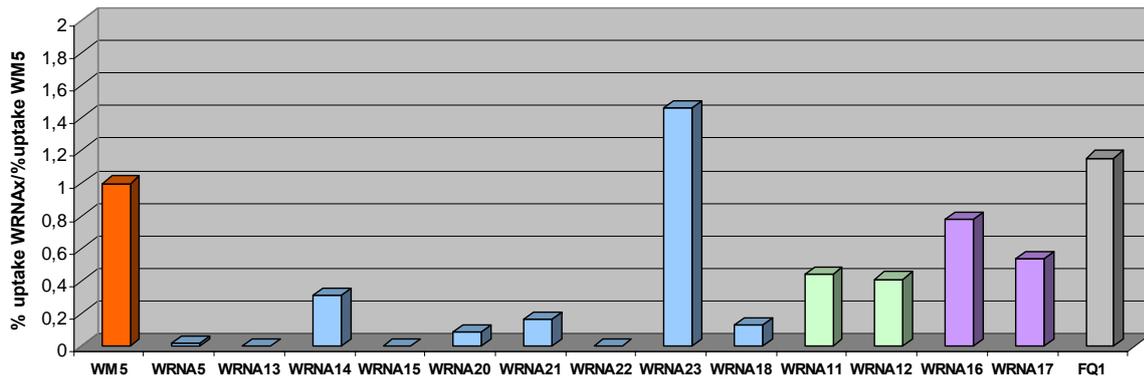


Fig. 2.51 *Uptake* intracellulare della seconda serie di chinoloni esaminati in cellule Jurkat, dopo 3 ore di incubazione.

Dal grafico riportato in figura 2.51 possiamo notare come i composti che risultano esser captati maggiormente dalle cellule sono i chinoloni WRNA23 e FQ1 (dei quali non conosciamo la citotossicità), con una percentuale di *uptake* maggiore rispetto al WM5. Gli altri composti in parte in grado di entrare nelle cellule sono il WRNA16 e WRNA17, composti con una certa citotossicità, seguiti dai composti WRNA11, WRNA12 e WRNA14. Anche una piccola percentuale dei composti WRNA18, WRNA20 e WRNA21 sembrano entrare o comunque aderire alla superficie cellulare, mentre i chinoloni WRNA13, WRNA15 e WRNA22 secondo i saggi di *uptake* non sono in grado di entrare nelle cellule, come già osservato per i chinoloni della prima serie esaminati.

2.2.1.2.5 Valutazione dell'attività antivirale

Anche per alcuni composti appartenenti a questa seconda serie è stata valutata l'attività antivirale *in vivo* ed in particolare il saggio è stato effettuato per i chinoloni WRNA11, WRNA12 e WRNA13. I primi due composti (WRNA11 e WRNA12) sono stati scelti in quanto presentano una buona attività anti Tat-TAR nei saggi *in vitro*, accompagnata da una discreta capacità di entrare nelle cellule, a differenza del composto WRNA13 che come i chinoloni della I serie non è in grado di attraversare le membrane cellulari.

Anche in questo caso l'attività antivirale è stata valutata sulla linea cellulare linfocitaria Jurkat infettata considerando come parametro virologico, la presenza nel soprannatante delle colture cellulari dell'attività di trascrittasi inversa (RT).

I dati di attività di RT sono riportati graficamente in figura 2.52, a diversi giorni dopo l'infezione, per concentrazioni crescenti di composti somministrati.

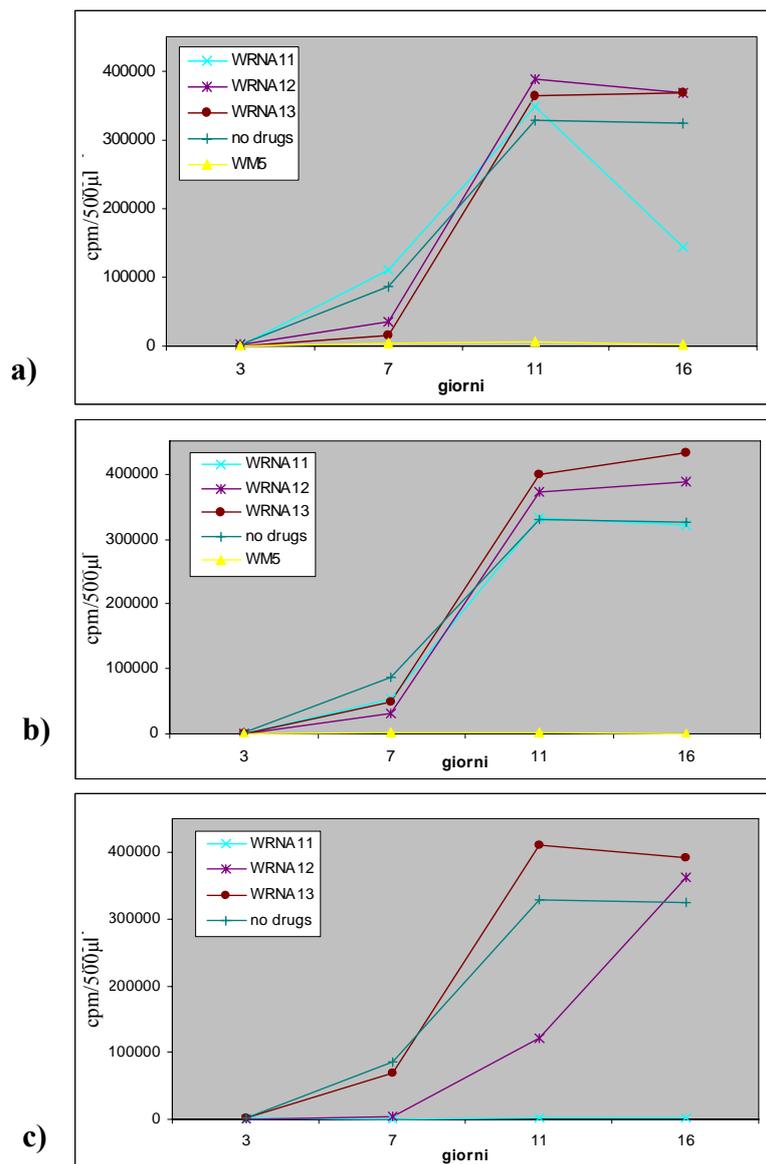


Fig 2.52 Attività antivirale dei chinoloni esaminati della II serie, sulla linea cellulare Jurkat infettata, somministrati a diverse concentrazioni: 1 µM (a), 10 µM (b) e 100 µM (c). E' stato considerato, come parametro virologico, la presenza e la quantificazione nel soprannatante delle colture cellulari dell'attività di trascrittasi inversa (RT) dopo diversi giorni di infezione.

Osservando i dati ottenuti possiamo notare come il composto WRNA11 inibisca completamente la crescita virale se somministrato in concentrazione 100 µM, mentre non risulta attivo a concentrazioni minori (il basso valore di RT, che si osserva in figura 2.52a, alla concentrazione 1 µM, dopo 16 giorni di incubazione è probabilmente imputabile ad un errore sperimentale). Anche il chinolone WRNA12 somministrato ad elevate concentrazioni (100 µM) è in grado di inibire parzialmente la crescita cellulare

nelle prime due settimane di incubazione, mentre il composto WRNA13 non ha dimostrato un'apprezzabile attività antivirale.

2.2.2 SCREENING DI NUOVI POTENZIALI INIBITORI TAT-TAR

Il saggio di *Fluorescence Quenching*, messo a punto per l'analisi dei chinoloni rappresenta un protocollo di analisi HTS (*High Throughput Screening*) che permette di analizzare velocemente librerie di piccole molecole in grado di competere con il complesso Tat-TAR. E' stato quindi utilizzato tale saggio per iniziare uno screening su nuove classi di composti, allo scopo di identificare nuovi potenziali agenti antivirali e riconoscere i motivi strutturali fondamentali per la loro attività inibitoria.

In particolare ci siamo occupati di una piccola serie di derivati 6-amminochinolonici, di una serie di acridoni, e di alcuni derivati peptidil-antrachinonici mono e di-sostituiti.

2.2.2.1 ANALISI DI ALCUNI 6-AMMINOCHINOLONI

2.2.2.1.1 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA

Innanzitutto si è deciso di analizzare una piccola serie di chinoloni sostituiti con un gruppo amminico in posizione 6, le cui strutture sono riportate in tabella 2.3 nella parte introduttiva. Tali composti, analoghi del WM5, presentano alcune sostituzioni a livello dell'azoto in posizione 1 e lo scopo di tale analisi è quello di integrare uno studio relazione attività già riportato in letteratura (89) e permette di valutare se l'attività nei confronti del virus già rilevata per questi composti [De Clercq, non pubblicato], sia riconducibile all'inibizione dell'interazione Tat-TAR. Abbiamo quindi valutato l'inibizione del complesso tramite il saggio di FQ, utilizzando il peptide lungo 10aa ed i valori di Ki determinati sono riportati in tabella 2.20 e rappresentati graficamente in figura 2.53.

	Ki (μM)
WM5	1,82 \pm 0,34
WP7-5	0,89 \pm 0,09
W5AM-1	1,06 \pm 0,13
W5AM	0,67 \pm 0,07

Tab. 2.20 Valori di Ki ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher*, in TNMg20 (Tris 10mM, NaCl 20mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), in presenza dei 6-amminochinoloni esaminati (conc=10 μM).

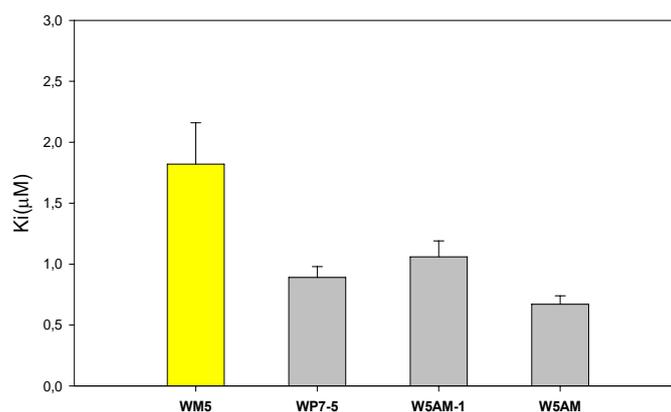


Fig. 2.53 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di Ki ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher*, in TNMg20 (Tris 10mM, NaCl 20mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), in presenza dei 6-amminochinoloni esaminati (conc=10 μM).

Come possiamo notare, tutti i nuovi 6-amminochinoloni esaminati presentano attività nei confronti del complesso, con Ki anche migliori rispetto al riferimento WM5. Questo ci indica che le sostituzioni effettuate a livello dell'azoto in 1 non determinano una perdita di attività, ma al contrario hanno un effetto positivo.

2.2.2.2 ANALISI DI UNA SERIE DI ACRIDONI

2.2.2.2.1 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA

E' stata analizzata una piccola serie di derivati acridonici, analizzati in quanto analoghi degli amminochinoloni con un nucleo a tre anelli più esteso rispetto al nucleo chinolonico, le cui formule di struttura sono riportate nella in tabella 2.4.

Anche in questo caso è stata valutata l'inibizione del complesso tramite il saggio di FQ con il peptide lungo 10aa ed i valori di Ki sono riportati in tabella 2.21 e rappresentati graficamente in figura 2.54.

	Ki (μM)
WM5	1,82 \pm 0,34
W4e	N.A.
W4i	0,3 \pm 0,15
W4g14	0,54 \pm 0,20
W4h	0,41 \pm 0,08
W4g13	0,6 \pm 0,23
W4g	N.A.
W4g12	N.A.
W4g19	0,45 \pm 0,13
W4g3	0,57 \pm 0,08

Tab. 2.21 Valori di Ki ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher*, in TNMg20 (Tris 10mM, NaCl 20mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), in presenza degli acridoni esaminati (10 μM).

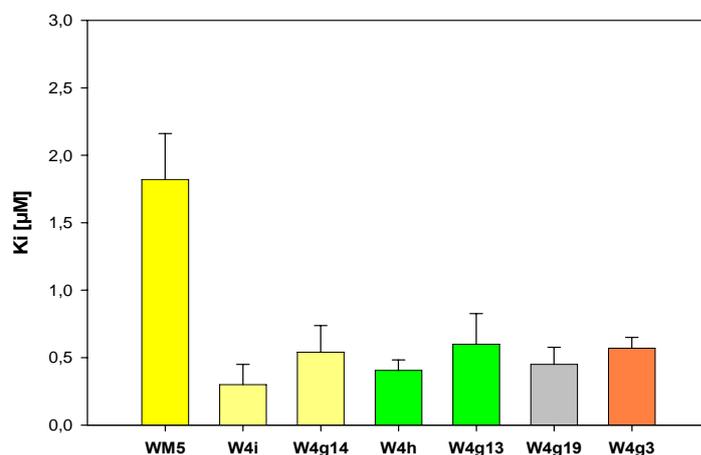


Fig. 2.54 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di Ki ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher*, in TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), in presenza degli acridoni esaminati (10 μM). W4e, W4g e W4g12 non attivi.

Come possiamo notare, tutti gli acridoni, ad eccezione dei composti W4e, W4g e W4g12, presentano una buona attività nei confronti del complesso, con valori di Ki notevolmente inferiori rispetto al WM5. Tale dato ci indica che la presenza della 4-(2-piridil)-1-piperazina o della 4-(2-fenil)-1-piperazina in posizione 9, associata ad un'espansione da due a tre anelli porta ad una migliore capacità di interagire con l'RNA-TAR. L'inattività del composto W4e dimostra che il solo anello acridonico non è in grado di interferire con il complesso, mentre tra le modifiche apportate a livello del nucleo chinolonico solamente il blocco degli idrossili in 3 e 5 con metossili (W4g e W4g12) determina una perdita di attività, chiaramente imputabile alla non possibilità di

chelare ioni divalenti. La demetilazione dell'ossidrilico in 5 risulta necessaria per poter ripristinare la funzione cheto-enolica in 5-6, analoga alla funzione cheto-carbossilica 3,4 del WM5, interazione necessaria per il legame del WM5 al TAR (82).

Infine considerando le sottofamiglie identificate in base all'analogia dell'anello chinolonico, notiamo che in presenza del sostituente 4-(2-piridil)-1-piperazina (acridoni W4i e W4h) abbiamo un'attività leggermente migliore rispetto alla presenza della 4-(2-fenil)-1-piperazina (W4g14 e W4g13).

2.2.2.3 ANALISI DI ALCUNI PEPTIDIL-ANTRACHINONI MONO E DI-SOSTITUITI

2.2.2.3.1 Studio dell'interferenza dei composti sul complesso Tat-TAR tramite FQA

A questo punto è stata esaminata la potenziale attività anti Tat-TAR di alcuni antrachinoni mono e di-sostituiti, le cui formule di struttura sono riportate rispettivamente in tabella 2.5 in tabella 2.6. La capacità di interferire con il complesso TAR-Tat10aa, è riportata graficamente in figura 2.55, mentre i valori delle K_i sono indicati in tabella 2.22.

a)		K_i (μM)	b)		K_i (μM)
	7	N.A.		542	0,49 ± 0,09
	107	0,83 ± 0,04		543	0,63 ± 0,01
	31	0,76 ± 0,04		Z6	0,08 ± 0,01
	36	0,85 ± 0,05		Z7	0,09 ± 0,01
	19	1,39 ± 0,08		721	0,21 ± 0,01
	46	1,23 ± 0,20		722	N.A.
	123	1,66 ± 0,09		723	0,39 ± 0,04
				CSA2	0,43 ± 0,07
				CSA8	0,60 ± 0,01
				Z8	0,06 ± 0,01
				Z9	0,08 ± 0,02

Tab. 2.22 Valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher*, in TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM), in presenza degli antrachinoni mono-sostituiti (a) e di-sostituiti (b) esaminati, in concentrazione 10 μM. Composti 7 e 722 non attivi.

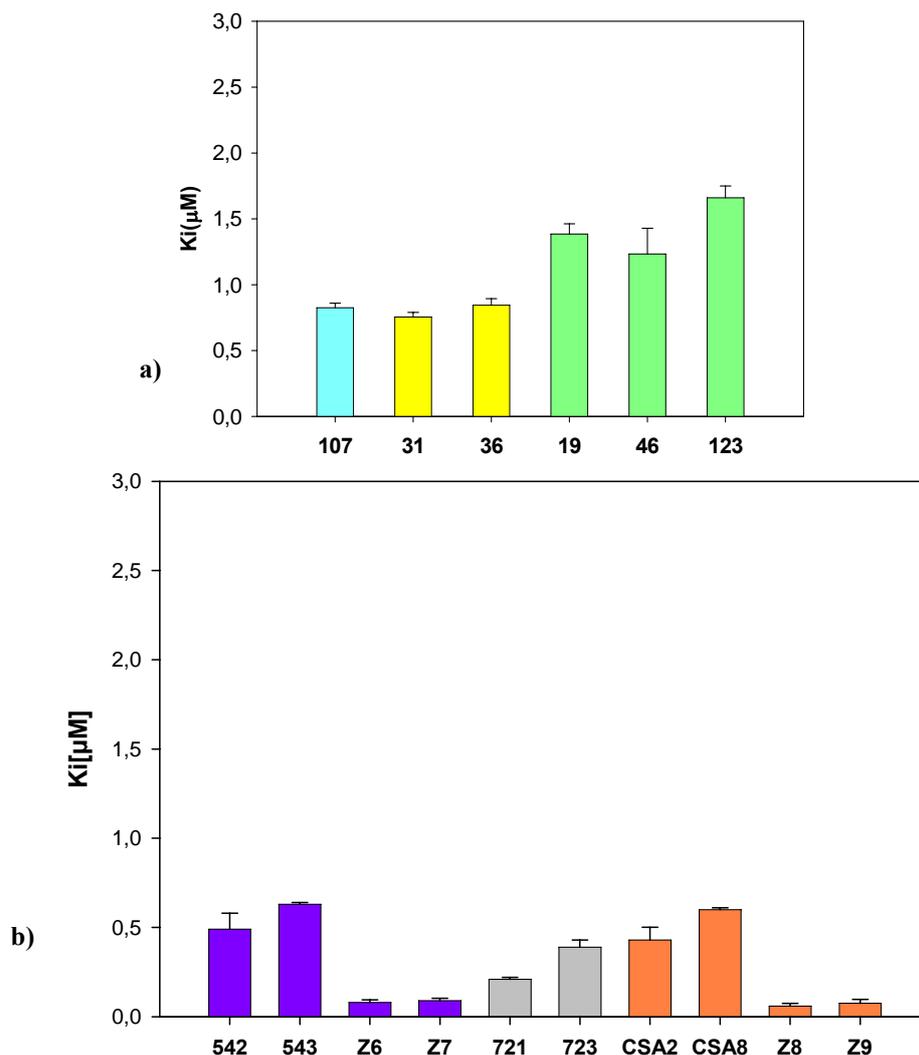


Fig. 2.55 Confronto tramite rappresentazione grafica dei valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa marcato con fluoresceina con TAR-*quencher*, in TNMg20 (Tris 10mM, NaCl 20mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM), in presenza degli antrachinoni monosostituiti (a) e disostituiti (b) esaminati, in concentrazione 10μM. Composti 7 e 722 non attivi.

Appare immediatamente evidente come le K_i della maggior parte dei composti siano buone e i composti di-sostituiti siano più attivi. Gli unici antrachinoni che non si sono dimostrati attivi nei confronti del complesso sono il composto 7 della serie monosostituita e il composto disostituito 722.

All'interno della serie dei monosostituiti, vediamo che tra i composti che presentano come *linker* β-Ala (composti 7 e 107) l'attività è mantenuta solamente quando abbiamo almeno due amminoacidi legati in catena (107); quando invece il *linker* è rappresentato dalla glicina (composti 19, 46 e 123), la presenza di due o tre amminoacidi in catena non varia sostanzialmente l'attività. Infine, i valori delle costanti di inibizione sono

minori quando il *linker* è rappresentato da (L)-valina (composti 31 e 36) direttamente legata al nucleo antrachinonico.

Per quanto riguarda la serie 2,6-disostituita, abbiamo delle K_i minori per tutti i composti, eccetto per il composto inattivo 722 ed in particolare i composti più attivi sono risultati essere gli antrachinoni della serie Z (Z6, Z7, Z8 e Z9), con delle costanti di inibizione molto basse.

2.2.2.3.2 Studio dell'interazione con il TAR tramite saggi di *melting*

Dato il potere intercalativo degli antrachinoni, è stato possibile studiarne il legame al TAR e ad una sequenza di DNA a doppio filamento effettuando dei saggi di *melting* tramite *Contact Quenching*, che permettono di valutare la capacità dei composti di alterare il profilo di denaturazione termica dell'acido nucleico.

Tali saggi sono stati effettuati sfruttando il fenomeno del trasferimento di fluorescenza (FRET), e si basano sulla valutazione della modificazione del profilo di denaturazione termica dell'acido nucleico, in seguito all'intercalazione da parte dei composti in esame ed in particolare il parametro scelto per descrivere la stabilità degli oligonucleotidi in esame è il valore della temperatura di *melting* (T_m). I saggi sono stati eseguiti utilizzando la sequenza corrispondente al TAR, marcata alle estremità 5' e 3' rispettivamente con il fluoroforo fluoresceina ed il *quencher dabcyI*, ed un oligonucleotide a doppio filamento, anch'esso marcato con fluoresceina all'estremità 5' del filamento *forward* e con il gruppo *dabcyI* all'estremità 3' del filamento *reverse*. In tal modo quando il TAR si trova nella sua forma strutturata, fluoroforo e *quencher* vengono a trovarsi spazialmente vicini e quindi si avrà il trasferimento di fluorescenza; in seguito all'aumento di temperatura si ha la denaturazione del TAR, con conseguente allontanamento delle due sonde. Allo stesso modo, per quanto riguarda il DNA a doppio filamento, quando si trova nella forma appaiata, *quencher* e fluoroforo vengono a trovarsi vicini e quindi si ha bassa emissione di fluorescenza; in seguito all'innalzamento della temperatura si ha la denaturazione con conseguente allontanamento del gruppo *dabcyI* dalla fluoresceina e relativa emissione.

Il profilo di denaturazione termica è stato quindi ottenuto misurando l'emissione di fluorescenza della fluoresceina in seguito all'innalzamento della temperatura, che

determina appunto una denaturazione dell'acido nucleico in esame e quindi un allontanamento del fluoroforo dal *quencher*.

Le reazioni di *melting* sono state effettuate all'interno di capillari di vetro utilizzando lo strumento *Light Cycler* della ditta Roche, che permette di applicare il protocollo termico voluto e misurare continuamente l'emissione di fluorescenza di ogni campione. Il valore della temperatura di *melting* (T_m) è il parametro scelto per descrivere la stabilità dell'RNA-TAR ed è stato assunto come valore di T_m la temperatura alla quale il profilo di *melting* presenta un punto di flesso. E' possibile ottenere il valore di T_m direttamente dal profilo di *melting* dell'oligonucleotide tramite il calcolo della derivata prima, calcolo che viene effettuato direttamente dal software dello strumento. In figura 2.56 è riportato, a titolo di esempio, il profilo di *melting* dell'RNA-TAR da solo ed in seguito all'aggiunta del composto Ametantrone, usato come antrachinone di riferimento. La sua capacità di intercalare nelle doppie eliche di acidi nucleici è infatti ben nota e collegata alla stabilizzazione alla denaturazione termica, che si riflette in un innalzamento della temperatura di *melting* direttamente correlato alla concentrazione di intercalante presente. Nel caso specifico la variazione di T_m (ΔT_m) per Ametantrone e TAR-RNA è pari a 7.1°C , per un rapporto 10:1 tra farmaco e acido nucleico. Questo rapporto molare è stato scelto per tutte le denaturazioni termiche effettuate con TAR o dsDNA e antrachinoni.

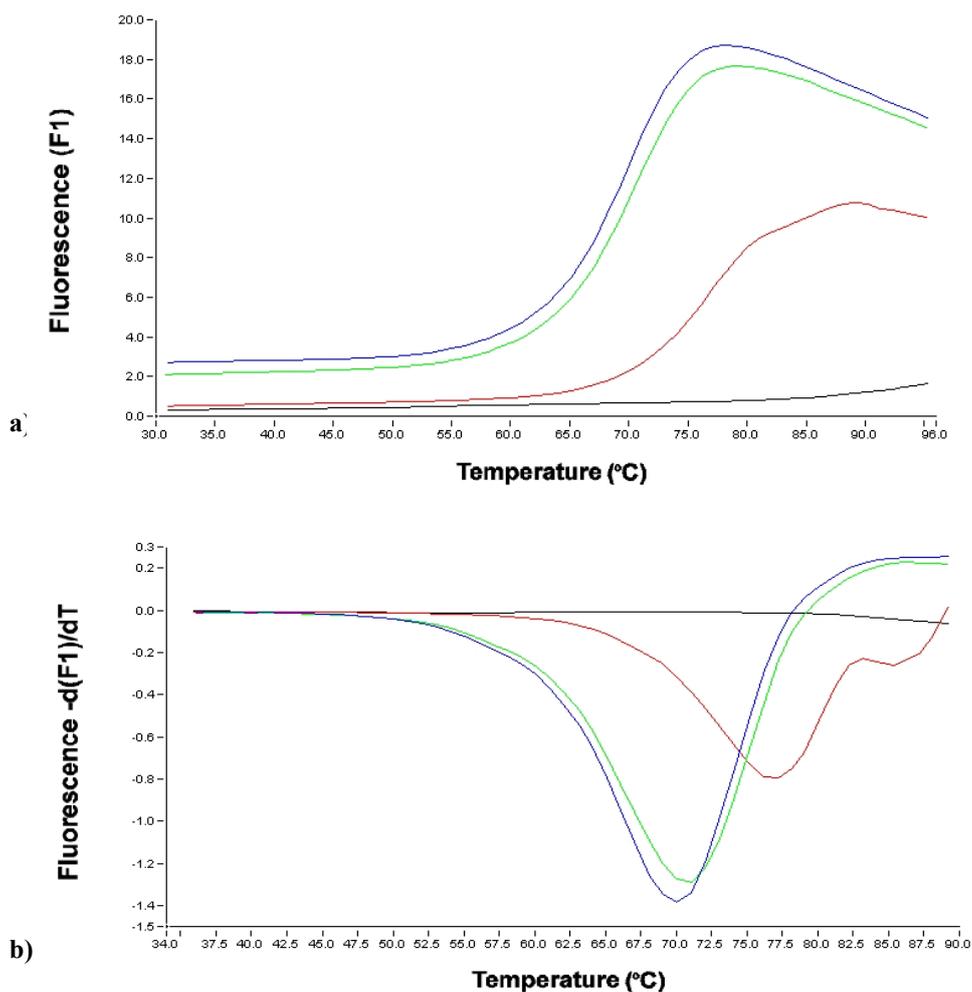


Fig. 2.56 a) Profilo di melting e b) la sua curva derivata dell'RNA-TAR in seguito all'aggiunta di Ametrantrone. Il saggio è stato condotto in tampone ETN (EDTA 1 mM, Tris 10 mM, NaCl 20 mM, pH 7.5). Linea blu = RNA-TAR in concentrazione 1 μ M; Linea verde = ametrantrone 1 μ M + TAR 1 μ M; linea rossa = ametrantrone 10 μ M + TAR 10 μ M; linea nera = ametrantrone 100 μ M + TAR 1 μ M.

In figura 2.57 sono riportate le variazioni delle temperature di *melting* del TAR e del DNA a doppio filamento, in seguito ad incubazione con i diversi antrachinoni.

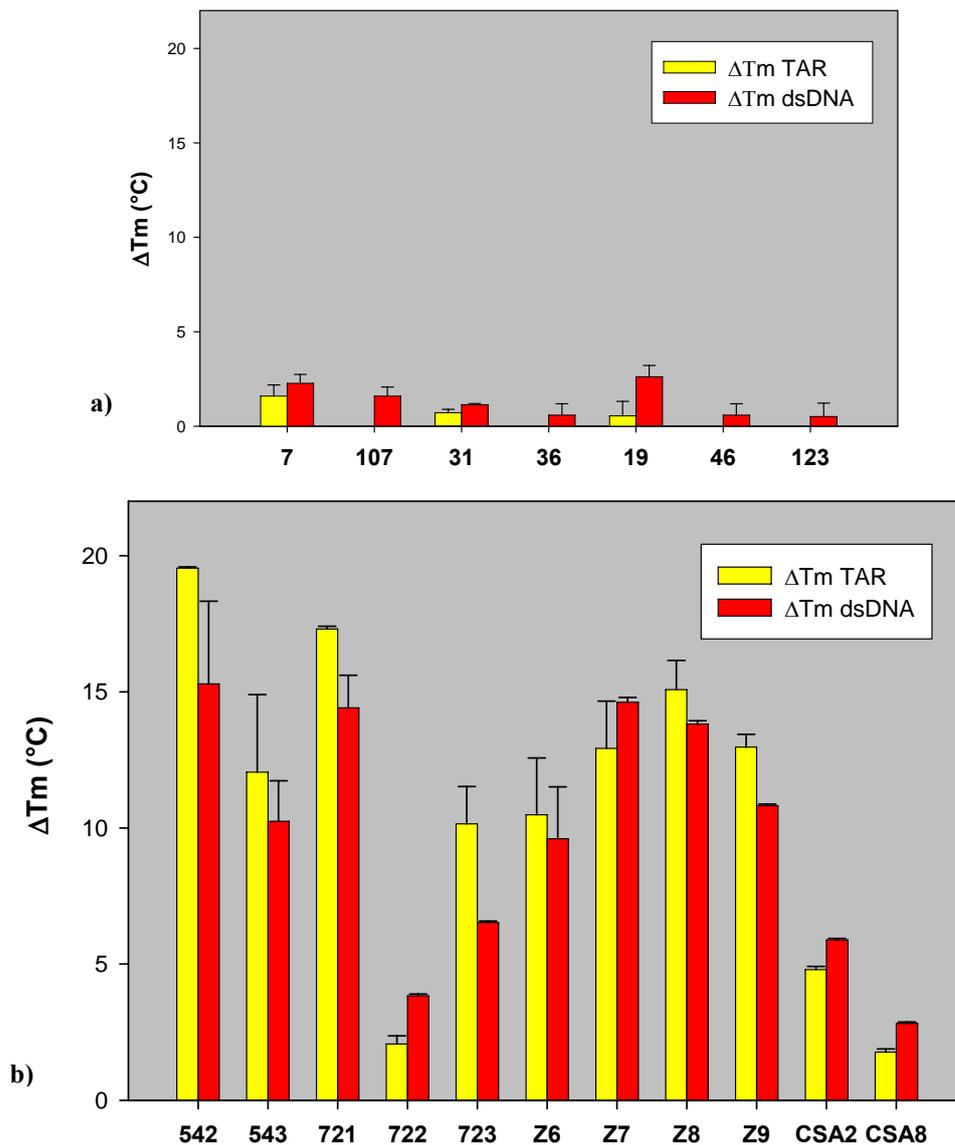


Fig. 2.57 Confronto ΔT_m del TAR, rispetto al dsDNA, in ETN20 (EDTA 1 mM, Tris 10 mM, NaCl 20 mM, pH 7.5), in presenza degli antrachinoni monosostituiti (a) e disostituiti (b) in concentrazione 10 μ M. [Farmaco]/[acido nucleico]=10

Si può notare come la capacità di legare il TAR sia più elevata per gli antrachinoni disostituiti, con correlazione positiva per quanto riguarda l'inibizione del complesso Tat/TAR. I composti disostituiti con amminoacidi carichi in catena laterale presentano valori di ΔT_m maggiori ed una debole preferenza di legame per l'RNA virale rispetto al DNA, in particolar modo evidente per il composto con l'arginina in catena (723). Per gli antrachinoni disostituiti non carichi invece il legame agli acidi nucleici è minore e comunque la preferenza è per il DNA a doppio filamento rispetto al TAR.

2.3 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo primo progetto ci si è occupati dello studio di composti con potenziale attività antivirale nei confronti del virus HIV-1, aventi come bersaglio terapeutico l'interazione Tat-TAR, evento primario del processo di trans-attivazione.

A tale scopo sono stati esaminati composti appartenenti a classi diverse, caratterizzati dalla presenza di motivi strutturali tali da ricondurli a potenziali inibitori Tat-TAR. In particolare sono state studiate due serie di 2-fenilchinoloni, alcuni 6-amminochinoloni, una serie di acridoni ed alcuni antrachinoni mono e di-sostituiti.

Per lo studio dell'attività nei confronti del complesso Tat-TAR è stato messo a punto un nuovo metodo di indagine, definito *Fluorescence Quenching Assay* (FQA), che rappresenta un utile approccio per testare velocemente librerie di composti con potenziale attività antivirale. Tale saggio è stato accuratamente ottimizzato e validato tramite il paragone dei dati ottenuti con i risultati ricavati tramite saggi EMSA (*Electrophoresis Mobility Shift Assay*), che rappresentano il tradizionale metodo di analisi.

Il protocollo FQA è stato messo a punto utilizzando sia un peptide lungo 10 amminoacidi, corrispondente alla regione compresa tra gli amminoacidi 48 e 57 di Tat, che rappresenta la regione sufficiente per il legame all'RNA-TAR (24, 33), sia servendosi di un secondo peptide, lungo 36aa, corrispondente alla sequenza di Tat compresa dall'amminoacido 37 al 72 che include quindi, oltre alla regione basica (rappresentata dal peptide di 10aa), 11 residui della regione "core" di Tat. Secondo dati di letteratura (24), quest'ultima sequenza (aa 37-72) è quella in grado di legare il TAR con specificità paragonabile a quella della proteina Tat completa. Con entrambi i peptidi si sono cercate le condizioni sperimentali ottimali per eseguire il saggio: con il peptide più corto si è scelto di lavorare a bassa concentrazione salina (20 mM di NaCl), mentre con il peptide di 36 amminoacidi è stato necessario lavorare in condizioni di concentrazione salina maggiore (80 mM di NaCl) ed in presenza di un RNA competitore rappresentato dalla sequenza del TAR a doppio filamento (dsTAR). Con questo secondo peptide, le titolazioni effettuate in queste condizioni riproducono le condizioni utilizzate in un lavoro simile riportato in letteratura (79).

La prima classe di composti esaminata in maggior dettaglio è stata quella dei 2-fenilchinoloni, molecole disegnate e sintetizzate sulla base di studi razionali per interferire con il complesso Tat-TAR. Tali composti possiedono una struttura eterociclica costituita dal nucleo chinolonico, sostituito in posizione 2 da un anello benzenico, che porta una o due catene laterali basiche.

In particolare sono state esaminate due serie di chinoloni: una prima serie (dal WRNA1 al WRNA8), di cui è stata studiata sia l'interferenza nei confronti del complesso, che la capacità di interagire con il TAR stesso e con altri tipi di acidi nucleici, ed una seconda serie di analoghi (dal WRNA9 al WRNA23 e il composto FQ1), sintetizzati in seguito, sulla base dei composti risultati più attivi dall'analisi del primo gruppo, per permettere di delineare una relazione struttura/attività.

L'attività di inibizione Tat-TAR della prima serie di composti è stata testata sia tramite saggi di *Gel Mobility Shift*, che con il nuovo saggio di *Fluorescence Quenching* e da tale esame si sono rivelati maggiormente attivi i chinoloni WRNA3 e WRNA5, cioè quelli caratterizzati dalla presenza di una sola catena carica positivamente legata all'anello benzenico. In particolar modo, l'analisi tramite saggi EMSA effettuati con diverse modalità di incubazione, ha rivelato come il composto WRNA3 presenti un'affinità superiore per il complesso rispetto al TAR da solo. Questa differenza può essere imputabile alla variazione conformazionale che l'acido nucleico subisce in seguito all'interazione con il Tat (35, 29). In presenza della proteina infatti il *bulge* viene disorganizzato e il TAR stesso assume una struttura caratterizzata da una maggiore rigidità, conformazione probabilmente preferita dal chinolone con la piperidina in catena laterale (WRNA3). La differenza tra WRNA3 e WRNA5 risiede nella natura dell'eterociclo, una piperidina rispetto ad una metilpiperazina. Nel secondo caso è plausibile che la carica positiva dell'azoto metilato permetta un'interazione elettrostatica favorevole al legame sia nella forma del TAR libero che legato, situazione che non si verifica nel caso della piperidina. Ulteriori analisi di *footprinting* sono richieste per determinare la posizione occupata dai due composti a livello di TAR.

Come già detto il saggio di *Fluorescence Quenching* è stato effettuato con entrambi i peptidi a disposizione; si è ritenuto quindi utile effettuare un confronto tra i valori delle costanti di inibizione ottenute nelle due diverse condizioni sperimentali, riportato graficamente in figura 2.58.

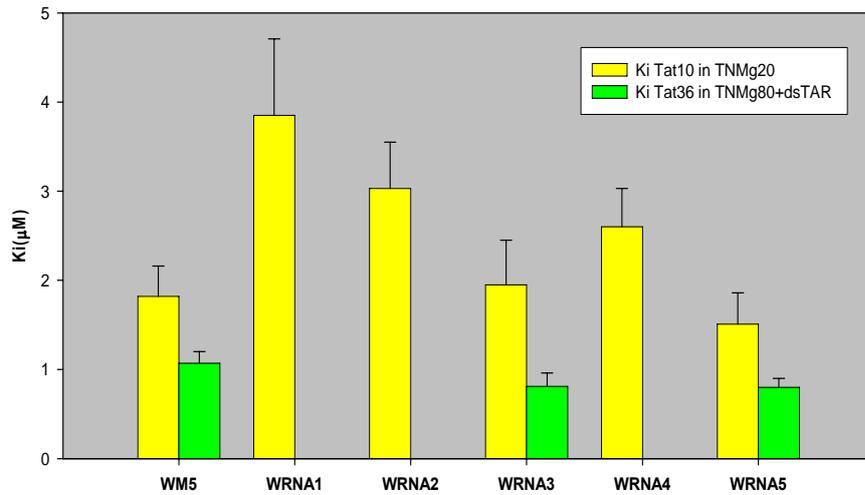


Fig. 2.58 Confronto dei valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa e del Tat36aa, marcati con fluoresceina, con TAR-*quencher*, rispettivamente in TNMg20 (TE 10 mM, NaCl 20 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM) e TNMg80 (TE 10 mM, NaCl 80 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 1 mM) + dsTAR 20 nM, pH 7.5, in presenza della prima serie di 2-fenilchinoloni alla concentrazione 10 μ M. Composti WRNA6 e WRNA8 non attivi.

Confrontando i risultati ottenuti con i due diversi peptidi possiamo innanzitutto notare come i valori di K_i per il Tat da 36aa siano più bassi rispetto a quelli ottenuti con il peptide lungo 10aa. Questa osservazione è importante perché il peptide da 36aa lega il TAR con la stessa affinità della proteina intera (24). In entrambi i saggi i chinoloni monosostituiti WRNA3 e WRNA5 si confermano essere i composti maggiormente attivi, con le K_i minori, mentre l'attività dei chinoloni WRNA1, WRNA2 e WRNA4, già bassa con il peptide da 10aa, diviene trascurabile con quello da 36aa. Nel saggio di *Fluorescence Quenching* con il peptide da 36aa è però presente anche il TAR mutante, non legante il Tat; è possibile che una frazione di chinolone possa essere interessata al legame con questo TAR. Se ciò fosse vero, le K_i per l'inibizione Tat-TAR sarebbero ancora minori. Infine i composti WRNA6 e WRNA8 risultano inattivi in entrambe le modalità di esecuzione del saggio.

Dal calcolo dei rapporti $K_i(\text{Tat10aa})/K_i(\text{Tat36aa})$ per i composti più attivi, possiamo ottenere indicazioni riguardo la specificità di legame; si può infatti osservare un rapporto leggermente minore per il WRNA5 (1.9) rispetto al WRNA3 (2.4); ciò potrebbe significare un maggior legame del WRNA5 con il TAR a doppio filamento. Tale osservazione è in accordo con il dato ottenuto nello studio del legame con il dsTAR tramite dialisi, effettuato per i composti più attivi. E' stata infatti utilizzata la metodica della dialisi all'equilibrio per valutare l'affinità dei chinoloni WRNA3 e

WRNA5 nei confronti di mutanti del TAR alle strutture *stem*, *loop* e *bulge*, evidenziando, innanzitutto, una minor capacità di entrambi i composti di legare i mutanti rispetto al TAR *wild-type*. L'affinità diminuisce maggiormente per il mutante dsTAR rispetto al TAR che presenta ancora il *bulge*, ad indicare l'importanza di tale zona a singola catena nell'interazione con il chinolone. L'affinità per il dsTAR è però molto minore per il chinolone WRNA3 rispetto al WRNA5, come già ricordato, indicando ancora una volta una maggiore specificità del WRNA3 per la struttura conformazionale attiva nell'acido nucleico bersaglio.

Il protocollo della dialisi all'equilibrio è stato inoltre utilizzato per valutare il legame di tutti i chinoloni appartenenti a questa prima serie nei confronti del loro bersaglio TAR-RNA, nonché per analizzare l'affinità per sequenze di RNA non correlate a TAR (tRNA) e per DNA a singola e a doppia catena.

Abbiamo potuto apprezzare una buona affinità di tutti i composti esaminati per il TAR *wild-type*, paragonabile a quella del controllo positivo WM5; non si sono però osservate particolari differenze nella capacità di legare l'RNA-TAR, tra i chinoloni risultati più attivi nei saggi di attività in vitro, rispetto a quelli risultati inattivi. L'elevata affinità al TAR è probabilmente dovuta alla forte carica positiva, a pH fisiologico, comune a tutti i chinoloni WRNA, mentre ciò che probabilmente differenzia i diversi composti è la loro capacità di riconoscere più o meno efficacemente il complesso Tat-TAR. È stato comunque appurato mediante dialisi che nessuno dei chinoloni è in grado di legare il Tat da solo.

Per quanto riguarda invece l'interazione dei composti con altri tipi di acidi nucleici (dsDNA, ssDNA, tRNA), i composti della serie WRNA si sono dimostrati in grado di legare il tRNA, a differenza del WM5 che non era in grado di legarlo, e parallelamente hanno evidenziato una minor affinità rispetto al WM5 per il dsDNA. Questo ultimo dato è piuttosto incoraggiante, in quanto una bassa affinità per il DNA evita possibili interferenze con i processi nucleari.

In figura 2.59 è riportato graficamente un confronto dei valori delle frazioni di farmaco legato ai diversi tipi di acido nucleico ed al TAR, dove è chiaramente evidente come tutti i chinoloni esaminati siano in grado di legare il TAR con un'affinità superiore rispetto agli altri acidi nucleici. Tale fenomeno è ancora più marcato se consideriamo che per il TAR la concentrazione è stata determinata per molecola e quindi abbiamo un

rapporto 1:1 tra le molecole di chinolone e le molecole di TAR; mentre per il DNA e il tRNA le concentrazioni sono determinate per residuo, per cui abbiamo un rapporto 1:1 tra una molecola di chinolone e un residuo di acido nucleico e siamo quindi in una situazione di eccesso di molecole di acido nucleico.

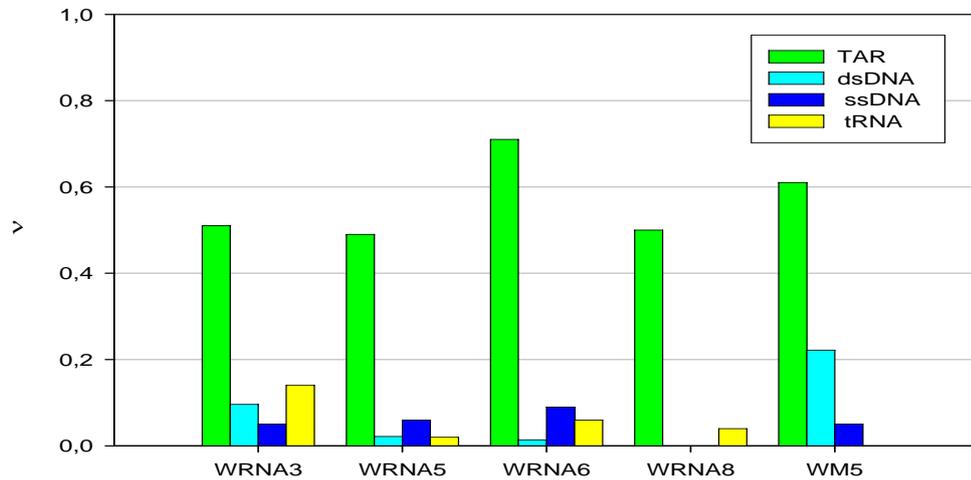


Fig. 2.59 Confronto tra i valori di v dei diversi chinoloni per il TAR e per i diversi tipi di acido nucleico, ottenute mediante dialisi *Mini Slide Tube*, a pH 7.5 T 25°C, in TNMg (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, Mg(ClO₄)₂ 1 mM). Tutti i valori fanno riferimento ad una concentrazione iniziale di chinolone pari a 30 μ M, in rapporti stechiometrici 1:1 con l'acido nucleico.

Il secondo aspetto di cui ci siamo occupati è stato investigare la capacità dei composti in studio di agire effettivamente da antivirali in vivo, valutando la loro potenzialità nell'attraversare le membrane cellulari e la loro citotossicità nei confronti della cellula ospite. Inoltre per i composti risultati più attivi nei saggi in vitro è stata valutata l'effettiva capacità di inibire la crescita virale di cellule infettate.

Gli studi di citotossicità ed in particolare la valutazione dell'*uptake* cellulare hanno messo in evidenza un'importante limitazione di tali composti come antivirali, rappresentata dalla loro difficoltà ad entrare nelle cellule a causa della forte carica positiva. In particolare i composti monosostituiti più attivi (WRNA3 e WRNA5) possiedono una capacità di penetrazione notevolmente inferiore rispetto a quanto evidenziato per il composto di riferimento WM5, attivo a concentrazioni micromolari in cellule infettate. Per quest'ultimo composto è infatti stata confermata una buona attività antivirale nei saggi in vivo, con una IC₅₀,a 11 giorni post-infezione di 0.5 μ M (figura 2.60, in accordo con quella già riportato in letteratura (IC₅₀=0.60 μ M) (87).

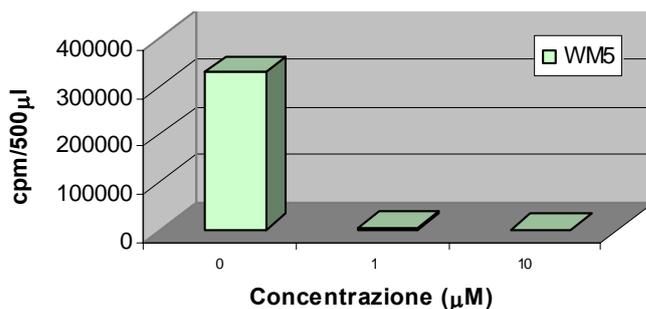


Fig 2.60 Attività antivirale del composto di riferimento WM5, 11 giorni post-infezione.

Per quanto riguarda i due composti attivi della nuova serie, i valori di attività di RT, ottenuti nei saggi antivirali dopo 11 giorni di infezione, sono riassunti graficamente in figura 2.61. Possiamo notare come in presenza del composto WRNA5 l'attività dell'enzima retrotrascrittasi inversa non diminuisca all'aumentare della concentrazione, ma piuttosto tenda leggermente ad aumentare. Tale dato indica un'incapacità del composto di inibire la crescita virale, probabilmente a causa della sua inability ad attraversare le membrane cellulari; il chinolone WRNA5 potrebbe piuttosto tendere a formare aggregati a livello della superficie cellulare, con l'effetto di facilitare in qualche modo l'entrata del virus, fenomeno che spiegherebbe l'incremento dell'attività di RT descritta sopra. Per quanto riguarda il composto analogo WRNA3 osserviamo invece un comportamento differente, in quanto abbiamo una significativa riduzione dell'attività virale alla concentrazione 100 µM di farmaco. Tale dato è anomalo data la bassa capacità di *uptake* da parte delle cellule osservata anche per il chinolone WRNA3 e necessita quindi di essere ulteriormente confermato.

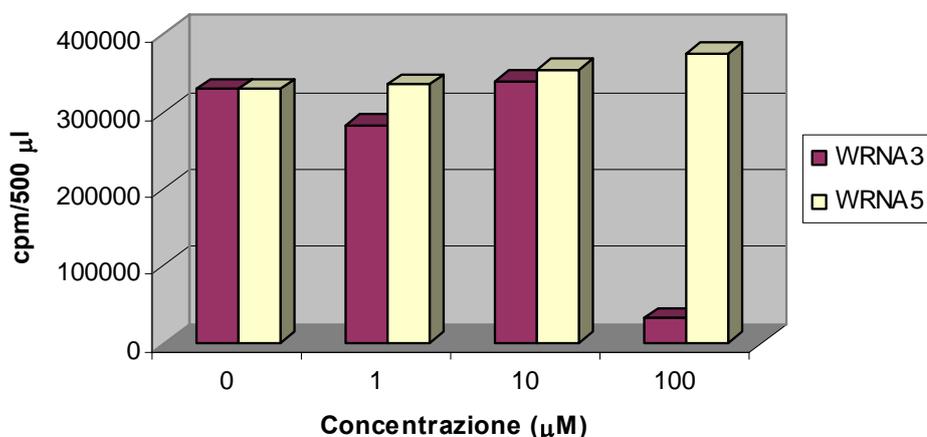


Fig 2.61 Attività antivirale dei chinoloni della I serie WRNA3 e WRNA5, 11 giorni post-infezione.

Per migliorare quindi le caratteristiche farmacocinetiche e identificare composti con migliore capacità di inibire la trans-attivazione, è stata disegnata, a partire dai 2-fenilchinoloni attivi WRNA3 e WRNA5, una seconda serie di analoghi, dal WRNA9 al WRNA23; assieme a questi composti è stato testato anche il chinolone FQ1.

In particolare i chinoloni di questa seconda serie presentano una sola catena laterale carica, in analogia con i composti risultati più attivi dall'analisi della prima serie. Sono quindi state effettuate modificazioni sia a livello della catena laterale, come sostituzioni bioisosteriche della piperidina o della N-metilpiperazina e allungamento o modificazioni della catena alchilica, sia modifiche a livello dell'anello chinolonico.

Lo studio della nuova serie di 2-fenilchinoloni ci ha permesso sia di identificare alcuni composti con una migliore capacità di inibire la trans-attivazione, ma soprattutto di delineare un primo piccolo studio relazione struttura/attività.

Dall'analisi dell'interferenza nei confronti del complesso Tat-TAR, tramite saggi di *Fluorescence Quenching*, ripetuti più volte e in diverse condizioni sperimentali, è emerso che l'allungamento della catena alifatica legata all'anello benzilico (WRNA20 e WRNA21), determina un leggero miglioramento dell'attività antivirale. La sostituzione della metil-piperazina in catena laterale con altri eterociclici azotati (WRNA13, WRNA14, WRNA15), così come la sostituzione bioisosterica dell'ossigeno a livello del *linker* con un atomo di zolfo (WRNA22), non portano ad un sostanziale miglioramento dell'attività con il peptide da 10aa, ma un discreto aumento di efficacia per il composto WRNA14 si osserva nel saggio con il peptide più lungo. L'eliminazione della catena laterale a livello dell'anello benzenico, sostituita con un gruppo idrossilico (WRNA23), causa una completa perdita dell'attività nei confronti del complesso, a confermare l'importanza della catena carica positivamente per l'interazione con il bersaglio TAR.

Infine, per quanto riguarda le sostituzioni a livello del nucleo chinolonico, l'eliminazione del metile in posizione N1 (WRNA16 e WRNA17), causa un notevole decremento dell'attività, rispetto agli analoghi WRNA3 e WRNA5, evidenziabile in particolar modo con i saggi con il peptide da 36aa; l'eliminazione dei metossili in posizione 5 e 7 (WRNA11 e WRNA12), porta ad una perdita di attività modesta. Infine per quanto riguarda il composto WRNA18, esso presenta una buona attività nel saggio con il peptide da 10aa, ma la K_i rimane praticamente costante con il peptide più lungo, ad indicare presumibilmente un legame aspecifico con il TAR a doppio filamento.

Con questa seconda serie è stata inoltre esaminata l'attività del 2-fenilchinolone FQ1, che presenta come catena laterale protonabile la 4-(2-piridil)-1-piperazina in analogia con il WM5 e tale composto dimostra mantenere una buona attività con entrambi i peptidi, paragonabile a quella del WRNA5.

Come già fatto per i composti della prima serie, anche in questo caso può esserci utile esaminare il confronto diretto tra i dati ottenuti con il peptide di 10 amminoacidi in TNMg20, con quelli ottenuti con il peptide più lungo (figura 2.62).

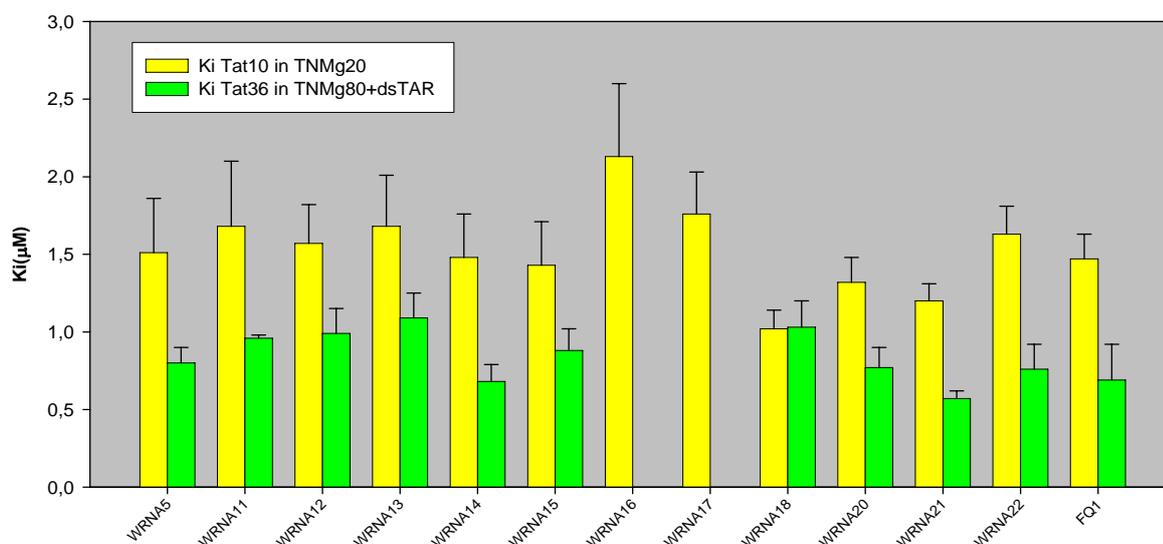


Fig. 2.62 Confronto dei valori di K_i ottenuti dalla titolazione del Tat10aa e del Tat36aa, marcati con fluoresceina, con TAR-*quencher*, rispettivamente in TNMg20 (Tris 10 mM, NaCl 20 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 10 mM) e TNMg80 (Tris 10 mM, NaCl 80 mM, $Mg(ClO_4)_2$ 10 mM)+dsTAR 20nM, pH 7.5, in presenza della seconda serie di 2-fenilchinoloni alla concentrazione 10 μ M.

Anche per questa serie monosostituita, eseguendo il saggio con il peptide più lungo si possono notare valori di K_i più bassi, con un andamento che rispecchia quello ottenuto lavorando con il Tat da 10aa; il valore di K_i con il peptide lungo permette anche di discriminare tra l'attività dei vari composti, che risulta appiattita dall'analisi con il peptide basico. In particolare, con il Tat da 36aa, i chinoloni WRNA16 e WRNA17 non risultano più in grado di spiazzare il complesso, sia perché inibitori deboli sia perché, presumibilmente, interagiscono con il dsTAR competitore presente oltre che con il TAR *wild-type*. Per quanto riguarda gli altri composti, essi sono tutti più o meno in grado di spiazzare il complesso con costanti di inibizione attorno all'1 μ M. I composti maggiormente attivi in queste condizioni, con attività pari o migliore rispetto al

WRNA5, sono i chinoloni WRNA14, WRNA15, WRNA20, WRNA21, WRNA22 e FQ1.

Anche per la maggior parte dei chinoloni di questa nuova serie è stata esaminata la tossicità e l'*uptake* a livello cellulare fornendoci, anche in questo caso, utili informazioni riguardanti i motivi strutturali preferibili per migliorare le caratteristiche farmacocinetiche dei composti.

In particolare le sostituzioni a livello del nucleo chinolonico descritte sopra, rendono i composti in grado di entrare nelle cellule e, a tale proposito, i più interessanti come potenziali antivirali sembrano essere i composti WRNA11 e WRNA12, in quanto non citotossici per le cellule. Invece, per quanto riguarda i composti più attivi come inibitori, cioè il WRNA14, WRNA18, WRNA20 e WRNA21, osserviamo che riescono in minima parte ad entrare nelle cellule (circa attorno al 5%) e difatti non sono particolarmente citotossici.

Data la discreta capacità dei chinoloni attivi WRNA11 e WRNA12 di venir captati dalle cellule, è stata testata la loro attività antivirale nei saggi in vivo, accanto a quella del composto WRNA13. Ancora una volta i valori di RT misurati dopo 11 giorni di infezione, sono riassunti graficamente in figura 2.63.

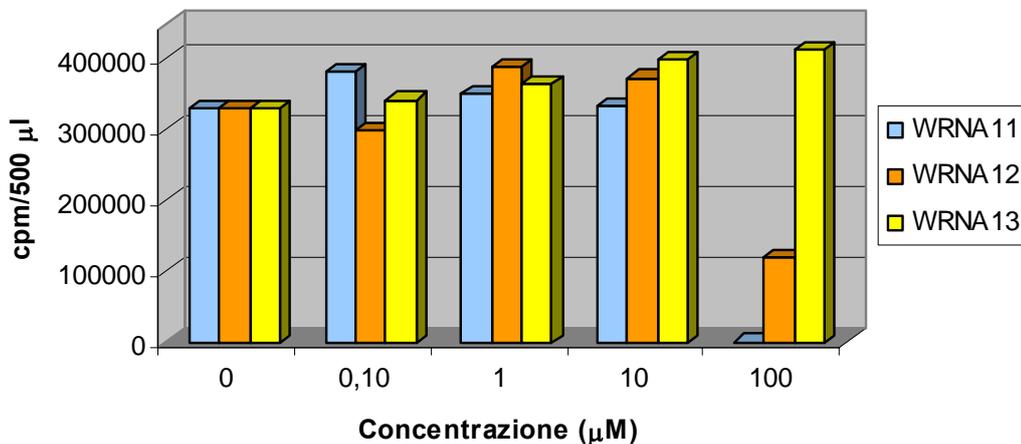


Fig 2.63 Attività antivirale dei chinoloni della II serie WRNA11, WRNA12 e WRNA13, 11 giorni post-infezione

Possiamo notare come i chinoloni WRNA11 e WRNA12 siano in grado di inibire significativamente l'attività virale alla concentrazione maggiore somministrata (100 µM), con delle IC₅₀ rispettivamente di 55 µM e 85 µM, a differenza del composto WRNA che non interferisce con la crescita del virus.

Tali dati sono in accordo con i risultati ottenuti nei saggi di *uptake*, secondo i quali il composto WRNA13 non attraversa le membrane cellulari, cosa che invece sono parzialmente in grado di fare i chinoloni WRNA11 e WRNA12, anche se in misura minore rispetto al composti di riferimento WM5.

L'analisi di queste due serie di chinoloni è quindi risultata utile per delineare le caratteristiche strutturali importanti al fine di preservare l'attività dei composti e di migliorarne la farmacocinetica. In particolare, le informazioni ottenute ci indicano l'importanza della presenza di una sola catena laterale protonabile a livello dell'anello benzilico, preferibilmente collegata tramite un *linker* più lungo a 4 o 5 atomi (come per i composti WRNA21 e WRNA22), rispetto ad un *linker* a 3 atomi. E' inoltre importante aumentare la lipofilia dei potenziali farmaci antivirali, per esempio mediante sintesi di composti con un nucleo chinolonico non sostituito con gruppi metossili, come osservato per il WRNA11 e WRNA12.

L'analisi di questa serie di 2-fenilchinoloni ci ha fornito inoltre il pretesto per mettere a punto un protocollo di analisi HTS (*High Throughput Screening*) che permette di analizzare velocemente librerie di piccole molecole in grado di competere con il complesso Tat-TAR, rappresentato appunto dal saggio di *Fluorescence Quenching*, descritto sopra.

E' stato quindi utilizzato tale metodo per iniziare uno *screening* su nuove classi di composti, allo scopo di identificare nuovi potenziali agenti antivirali e riconoscere i motivi strutturali fondamentali per la loro attività inibitoria.

Innanzitutto sono stati esaminati alcuni 6-amminochinoloni analoghi del WM5, che presentano alcune sostituzioni a livello dell'azoto in posizione 1 ed una piccola serie di acridoni, analizzati in quanto analoghi degli amminochinoloni con un nucleo a tre anelli più esteso rispetto al nucleo chinolonico.

Tutti i nuovi 6-amminochinoloni esaminati presentano attività nei confronti del complesso, con K_i migliori rispetto al riferimento WM5. Questo indica che le sostituzioni effettuate a livello dell'azoto in 1 non determinano una perdita di attività, ma al contrario hanno un effetto positivo e tale dato va ad integrare uno studio relazione/attività già riportato in letteratura (89). L'attività antivirale in cellule infettate di questi composti è già stata determinata (De Clercq, non pubblicato), evidenziando in particolar modo una buona efficacia dei composti W5AM e WP7-5, presumibilmente

riconducibile all'inibizione dell'interazione Tat-TAR. Il composto W5AM1 ha invece dimostrato una minor attività nei confronti del virus, pur essendo attivo nei nostri saggi di FQ, con un valore di K_i solo leggermente inferiore agli altri due composti. Per tale composto non riscontriamo quindi una diretta correlazione tra il dato in vitro e il comportamento a livello cellulare, ma rimane ancora da verificare se tutti e tre i composti siano effettivamente in grado di attraversare le membrane cellulari con la stessa efficacia.

Per quanto riguarda gli acridoni, si è potuto osservare come la presenza della 4-(2-piridil)-1-piperazina o della 4-(2-fenil)-1-piperazina in posizione 9, associata ad un'espansione da due a tre anelli porta ad una migliore capacità di interagire con l'RNA-TAR. Inoltre l'analisi di questi composti ha permesso di evidenziare l'importanza dell'ossidile in posizione 5, che risulta necessario per poter ripristinare la funzione cheto-enolica in 5-6, analoga alla funzione cheto-carbossilica 3,4 del WM5, interazione necessaria per il legame del WM5 al TAR (82).

Confrontando l'inibizione dei 6-amminochinoloni con quella degli acridoni attivi, possiamo supporre che l'estensione dell'anello da due a tre cicli non vari la geometria di legame nei confronti del TAR, in quanto l'attività non solo è mantenuta, ma addirittura migliorata.

A sostegno di tali ipotesi sono stati effettuati, per entrambe le classi di composti, saggi di *melting* per valutare la loro capacità di stabilizzare sia la struttura del TAR che quella del DNA a doppio filamento. In entrambi i casi nessun composto si è dimostrato in grado di determinare una variazione sostanziale della temperatura di *melting* (T_m), non evidenziando quindi un legame di tipo intercalativo; ciò fa presupporre che l'interazione possa avvenire proprio a livello del *bulge* analogamente a quanto presunto per i chinoloni; interazioni di tipo *stacking* con basi a livello del bulge sono infatti riportate in letteratura per derivati acridinici (78).

Oltre alle due classi appena descritte è stata esaminata l'attività anti Tat-TAR anche di alcuni antrachinoni mono e di-sostituiti, caratterizzati da elementi ritenuti necessari e sufficienti a garantire l'interazione con l'RNA, ovvero un nucleo intercalante e uno o più centri basici uniti da un opportuno *linker* (76).

L'analisi tramite saggio di *Fluorescence Quenching* ha evidenziato una buona attività per la maggior parte degli antrachinoni. In particolar modo i composti 2,6-disostituiti

hanno dimostrato valori di K_i minori rispetto ai composti monosostituiti, probabilmente grazie alla presenza delle due catene disposte in direzioni opposte che permettono a questi antrachinoni di comportarsi da *Threading Intercalators* a livello del TAR. Tale processo intercalativo prevede infatti l'inserzione della porzione eterociclica tra le basi del doppio filamento di acido nucleico, localizzando i due distinti sostituenti nei due solchi dell'elica; affinché tale processo intercalativo sia reso possibile è necessario il passaggio attraverso il *duplex*, che richiede una apertura transiente della doppia elica a livello del sito di legame. Tale processo può avvenire preferenzialmente in zone dinamiche dell'RNA *target* ed è questo il motivo per cui un buon bersaglio di tali composti potrebbe essere rappresentato dal TAR con la sua struttura flessibile *bulge-loop*. La maggior attività come inibitori Tat-TAR dei composti disostituiti rispetto ai monosostituiti è evidente se confrontiamo le K_i dei composti CSA8 e 19, caratterizzati dalle stesse catene legate al nucleo antrachinonico (Gly-Val): il composto monosostituito 19 presenta infatti una K_i doppia (1,39 μM) rispetto al suo analogo disostituito CSA8 ($K_i=0,60 \mu\text{M}$).

Tra gli antrachinoni disostituiti si sono dimostrati fortemente attivi i composti della serie Z, con delle costanti di inibizione molto basse. Tali composti sono caratterizzati dalla presenza dell'amminoacido lisina in posizione terminale e da due amminoacidi (Gly-Lys o Ala-Lys) legati al *linker* β -Ala o Gly. La presenza di un amminoacido basico in posizione terminale della catena laterale sembra quindi importante per ottenere forti inibitori (serie Z e composti 542, 721 e 723); si tratta sostanzialmente di composti che mimano gli amminoacidi basici del peptide da 10 amminoacidi del Tat, legandoli ad un nucleo capace di intercalare a livello di zone dinamiche della doppia elica. L'attività è comunque mantenuta anche quando l'amminoacido carico si trovi in altre posizioni (composto 543). Nel caso dei composti CSA2 e CSA8 in cui non è presente una seconda carica è però fondamentale il corretto posizionamento del gruppo amminico carico terminale; tale osservazione necessita di ulteriori approfondimenti tramite studi di *docking*.

Dato il potere intercalativo degli antrachinoni, è stato possibile valutare il legame al TAR e ad una sequenza di DNA a doppio filamento, osservando la variazione della temperatura di *melting* in seguito all'aggiunta dei composti in esame.

Questo studio ha evidenziato una capacità maggiore di legare il TAR e il dsDNA degli antrachinoni disostituiti rispetto ai composti monosostituiti ed in particolare i composti disostituiti con amminoacidi basici in catena laterale presentano i valori di ΔT_m più alti. Possiamo evidenziare tale fenomeno se confrontiamo le variazioni delle temperature di *melting* del TAR in presenza degli antrachinoni 722 e Z7, che differiscono unicamente per la presenza della lisina terminale: il composto Z7 ha una capacità di stabilizzare il TAR sei volte maggiore rispetto al composto 722. Tale dato ci indica l'importanza della presenza di una seconda carica in catena laterale per migliorare il legame agli acidi nucleici, anche se bisogna sottolineare che si tratta perlopiù di un legame aspecifico, in quanto la preferenza per il TAR rispetto al dsDNA è minima o nulla per gli antrachinoni disostituiti carichi. L'unico caso in cui osserviamo un miglior legame per l'RNA-TAR è quello del composto disostituito 723, che presenta l'amminoacido arginina in catena. La specificità per il TAR osservata per quest'ultimo composto è in linea con diversi lavori in letteratura che descrivono coniugati intercalanti-arginina disegnati per coniugare la capacità dell'agente intercalante a formare complessi stabili con l'RNA, con la capacità dell'arginina stessa di interagire a livello del *bulge* pirimidinico (74, 76). Il nostro composto 723 rappresenta quindi un ottimo coniugato di questo tipo, infatti presenta una buona capacità inibitoria nei confronti del complesso, con una K_i di un ordine di grandezza inferiore ($K_i=0.39 \mu\text{M}$) rispetto a quella osservata per l'arginina da sola in concentrazione $50 \mu\text{M}$ ($K_i=2.35 \mu\text{M}$). La buona capacità intercalativa del nucleo antrachinonico disostituito, accanto alla presenza dell'arginina che probabilmente viene opportunamente posizionata a livello del *bulge* grazie al linker β -Ala, rendono il composto 723 un'interessante molecola bifunzionale in grado di legare fortemente e specificatamente l'RNA-TAR, interferendo così con la formazione del complesso. Possiamo quindi considerare quest'ultimo composto un buon potenziale agente antivirale, il cui studio verrà approfondito con saggi di citotossicità e su cellule infettate. Inoltre sarà interessante proseguire l'esame, sia del composto 723 che degli altri antrachinoni attivi, con studi di *footprinting* per identificare le regioni del TAR implicate nel legame, presumibilmente distinte da quelle degli acridoni e dei chinoloni.

3. PARTE II

“NUOVI DERIVATI ANTRACHINONICI SEQUENZA SELETTIVI: STUDIO DELL’INTERAZIONE CON IL DNA”

3.1 INTRODUZIONE

3.1.1 IL TUMORE

Malgrado i progressi della medicina e della diagnostica, l'incidenza dei tumori è in continuo aumento. In Europa il cancro è una delle cause principali di morte, con 2,9 milioni di nuovi casi e 1,7 milioni di decessi all'anno e rappresenta un importante problema di salute pubblica sia dal punto di vista sociale che economico. Le tipologie di cancro a più elevata incidenza sono quello polmonare (13,3%), colon-rettale (13,2%) e toracico (13%); in particolare il tumore polmonare è responsabile del maggior numero di decessi (20%), seguito dal tumore colon-rettale (12%), da quello allo stomaco (8% ma in riduzione) e al torace (8%) (101).

Un tumore maligno o neoplasia è clinicamente definito come una massa in continuo accrescimento costituita da cellule anomale che si dividono in modo incontrollato e disordinato. In condizioni normali, le cellule continuano a riprodursi in relazione alle necessità fisiologiche del corpo, dopodichè intervengono meccanismi di controllo che inibiscono ulteriori divisioni di quella particolare linea cellulare rendendola quiescente; nella neoplasia questo controllo viene perso e le cellule tumorali acquisiscono la capacità di invadere tessuti circostanti e di formare tumori secondari o metastasi in corrispondenza di altre sedi dell'organismo. Il depositarsi delle cellule neoplastiche nei diversi organi e tessuti porta ad una alterazione della loro funzione e ad un disequilibrio nell'omeostasi dell'organismo, con conseguente patologia ed infine decesso.

Alla base dell'insorgenza del tumore vi è sempre e comunque la trasformazione maligna di una singola cellula, ma la progenie di questa cellula deve andare incontro ad ulteriori cambiamenti, che implicano probabilmente l'intervento di altre mutazioni, prima di diventare tumorale.

Una mutazione diretta o un'alterazione nel controllo della trascrizione dei geni che regolano l'accrescimento, la replicazione o l'apoptosi, può trasformare una cellula sana in tumorale (102, 103). Le cellule sono infatti costantemente oggetto di danni al patrimonio genetico, sia a causa di fattori endogeni o spontanei, che per cause ambientali come radiazioni, agenti chimici tossici e agenti virali. Normalmente, però, un danno non grave al patrimonio genetico viene riparato da meccanismi di controllo

cellulare, mentre un danno grave innesca il processo apoptotico. Affinché la cellula assuma caratteristiche neoplastiche sono invece necessarie da tre a sette mutazioni stabili a carico di porzioni sensibili del patrimonio genetico.

I farmaci attualmente in uso per la terapia antitumorale possono essere classificati in diverse famiglie: agenti alchilanti, agenti intercalanti, antimetaboliti, antibiotici antitumorali, prodotti naturali (in particolare di origine vegetale) ed ormoni. Solo pochi agenti antitumorali riescono però ad uccidere più del 50% delle cellule cancerose e l'eterogenità delle cellule neoplastiche, all'interno di un dato tumore, accanto alla pressione selettiva, che favorisce il rapido sviluppo della farmacoresistenza, giustifica il fallimento terapeutico spesso correlato all'uso di un singolo farmaco, spingendo quindi all'uso di combinazioni di più composti.

Numerosi farmaci oggi in uso nella chemioterapia antitumorale possiedono un meccanismo d'azione correlato alla capacità di interagire con gli acidi nucleici; il primo evento per l'azione di molti agenti chemioterapici è il legame, reversibile o irreversibile, all'acido nucleico. Tale legame può essere di tipo intercalativo, che prevede l'inserzione della molecola di farmaco tra le coppie di basi della doppia elica, oppure il farmaco può legare il solco maggiore o minore del DNA. Legami covalenti prevedono la capacità di alchilare una o più basi azotate.

3.1.2 GLI ANTRACHINONI COME ANTITUMORALI

Una classe di composti di cui è ben nota la capacità intercalante a livello del DNA è rappresentata dai derivati antracenedionici.

In particolare, la scoperta dell'attività antitumorale di composti 1,4-bis[(aminoalchil)amino]antracene-9,10-dioni, quali il Mitoxantrone ed il suo analogo Amentantrone (figura 3.1), ha spinto allo studio del meccanismo antitumorale di questi derivati (104).

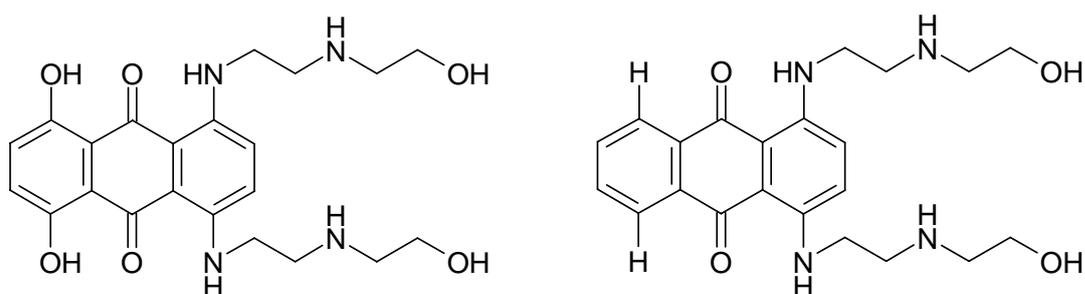


Fig. 3.1 Struttura chimica del Mitoxantrone (sinistra) e dell'Amentantrone (destra).

Il Mitoxantrone è usato clinicamente, da solo o assieme ad altri agenti chemioterapici, per il trattamento di diverse varietà di tumori, in particolare nella terapia del cancro al polmone, di leucemie, melanomi, linfomi, morbo di Hodgkin e cancro al seno (105). Inoltre tale composto è usato, per le sue proprietà immunosoppressive ed antinfiammatorie, nella terapia della sclerosi multipla, in particolare nei casi caratterizzati da recidive o in caso di sclerosi multipla secondaria progressiva nonostante una precedente terapia con interferone (106).

La planarità del sistema ciclico antrachinonico permette l'intercalazione tra le basi accoppiate del DNA in conformazione B (107), originando complessi farmaco-DNA stabili attraverso l'interazione del sistema π delle basi del DNA con quello del cromoforo planare del farmaco.

Il modello dell'intercalazione del Mitoxantrone a livello del DNA è illustrato in figura 3.2 e 3.3; possiamo appunto osservare il nucleo antrachinonico intercalato perpendicolarmente all'asse maggiore del DNA, mentre le sue catene laterali in posizione 1 e 4 sono disposte con orientazione antiparallela, interagendo ognuna con un filamento distinto del DNA (108).

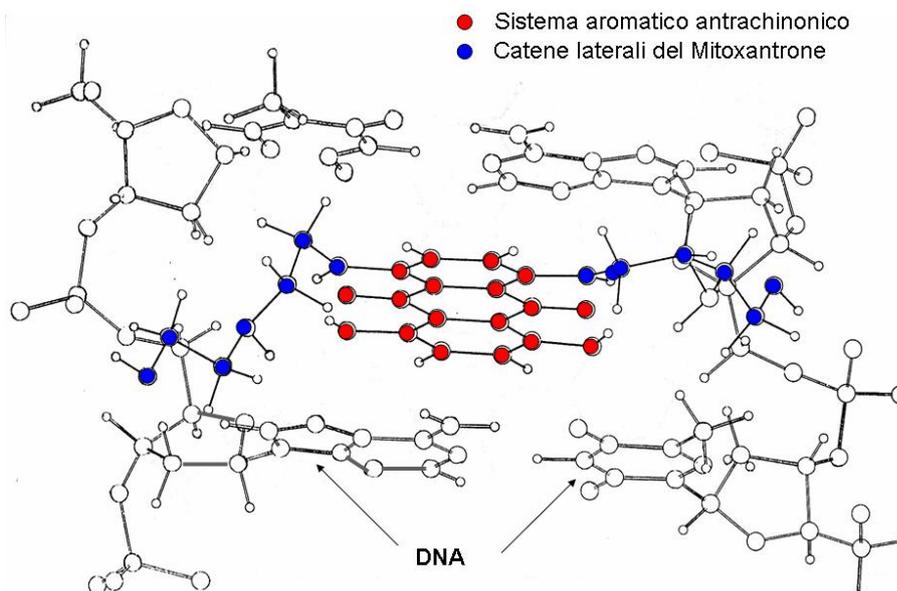


Fig. 3.2 Vista laterale del complesso DNA-Mitoxantrone (Pozzan A., non pubblicato).

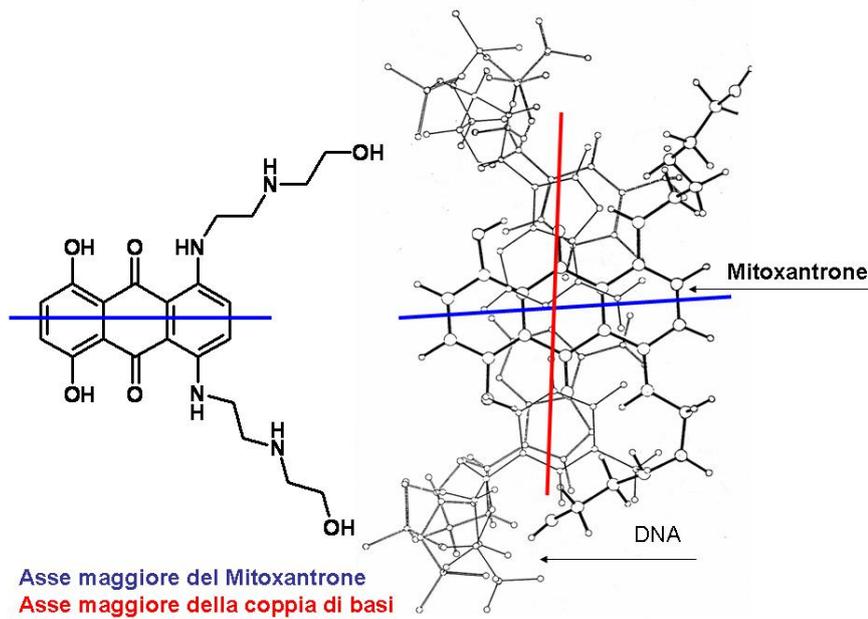


Fig. 3.3 Vista dall'alto del complesso DNA-Mitoxantrone (Pozzan A., non pubblicato).

Dal punto di vista strutturale, il processo intercalativo comporta un disavvolgimento parziale della doppia elica, al quale conseguono variazioni conformazionali che possono influire e modificare l'attività di proteine ed enzimi che agiscono a livello dell'acido nucleico. In particolare, l'attività antitumorale di questi intercalanti è correlata all'inibizione dell'enzima topoisomerasi II e, in qualche caso, della topoisomerasi I umana (109), enzimi deputati alla regolazione della topologia del DNA e fondamentali per la sopravvivenza della cellula. Questi enzimi sono infatti richiesti in ogni *step* metabolico che altera la topologia del DNA, come replicazione, trascrizione, condensazione e decondensazione della cromatina, ricombinazione, meccanismi di riparo e segregazione dei cromosomi. Le topoisomerasi sono in grado di interconvertire tra loro topoisomeri del DNA ed esplicano la loro funzione alterando il numero di legame del DNA nelle cellule viventi, attraverso una transiente rottura e risaldatura dei legami fosfodiesterici del doppio filamento. Il Mitoxantrone, una volta accumulato nel nucleo, agisce da veleno per la topoisomerasi, stabilizzando il “*cleavable complex*”, cioè il complesso tra enzima e DNA tagliato, che si forma appunto durante l'attività di taglio e risaldatura dei legami fosfodiesterici del doppio filamento.

Anche se l'azione enzima-mediata è ritenuta la più rilevante ai fini dell'attività citotossica, ci sono prove che i farmaci antrachinonici diano origine a specie radicaliche, che vanno a danneggiare l'acido nucleico, degradandolo (110).

E' noto infatti che il nucleo antrachinonico, comune sia alle antracicline che al Mitoxantrone, può essere oggetto di processi riduttivi con la successiva formazione di semichinoni o di idrochinoni (111, 112). In particolare i radicali semichinonici sono in grado di agire direttamente sul DNA alchilandolo, oppure di reagire con l'ossigeno molecolare per formare dei radicali superossido e, in seguito, H₂O₂ ed idrossi-radicali. Questi ultimi sono i veri responsabili del danno al DNA.

L'attività biologica e chimica degli antrachinoni è largamente influenzata dai sostituenti del sistema aromatico planare (104, 113), mentre solitamente le catene laterali portano una o due cariche positive per stabilizzare interazioni elettrostatiche con lo scheletro zucchero-fosfato dell'acido nucleico. In particolare, nel caso del Mitoxantrone e nei suoi derivati attivi, i sostituenti sono legati alla struttura antrachinonica attraverso legami amminici.

Il nostro gruppo, negli anni scorsi, ha studiato le proprietà fisico-chimiche e biologiche di antrachinoni che presentano un legame ammidico tra l'anello planare e i sostituenti in catena laterale (114-116). In particolare, il legame ammidico che lega la porzione planare alle catene laterali permette una semplice introduzione di residui peptidici nella struttura del farmaco. La presenza di una sequenza peptidica legata al farmacoforo potrebbe dimostrarsi molto utile in termini di specificità farmacologica. E' ben noto infatti che l'esatto riconoscimento di una particolare sequenza di DNA nei sistemi biologici, da parte di enzimi e proteine, è mediato dalla presenza di appropriati motivi strutturali; quindi l'introduzione a livello di farmaci già disponibili di specifici elementi di riconoscimento per oncogeni mutati potrebbe rappresentare un'importante vantaggio nella terapia del cancro, grazie al *targeting* selettivo verso le cellule antitumorali.

3.1.3 IMPORTANZA DELLE INTERAZIONI DNA-PROTEINA

Numerosi eventi che avvengono a livello del cromosoma, fra i quali la replicazione del DNA e la trascrizione in RNA, richiedono l'iniziale formazione di complessi proteine-proteine e/o proteine-acidi nucleici.

Le proteine deputate a questo scopo sono in grado di riconoscere specifiche sequenze nucleotidiche, legandosi a livello di determinate posizioni all'interno del genoma e rendendo quindi le interazioni DNA-proteine molto importanti nell'espressione dei geni. Ciò che determina la specificità è l'interazione fisica della proteina, che si

inserirsi nei solchi della doppia elica e prende contatto in modo diretto con la sequenza nucleotidica. Questa interazione è in genere accompagnata da interazioni superficiali a livello dell'interfaccia tra le molecole, che possono semplicemente stabilizzare il complesso DNA-proteina, ma anche permettere l'accesso ad informazioni indirette sulla sequenza nucleotidica fornite dalla conformazione della doppia elica.

Le proteine leganti il DNA sono classificabili in relazione alla struttura del frammento che interagisce con il DNA stesso ("*DNA-binding motifs*"); queste zone di riconoscimento sono presenti in proteine di organismi molto diversi tra loro, suggerendo che si siano specializzate già nei primi eventi del processo evolutivo.

Se, fino a pochi anni fa, si riteneva che solo interazioni specifiche tra DNA e proteine fossero efficaci e che solo le proteine svolgessero un ruolo attivo in questo riconoscimento, ora appare chiaro come tale processo di riconoscimento e l'interazione stessa siano eventi molto dinamici. Infatti, se da un lato le proteine possono interagire con le porzioni delle basi azotate esposte nei solchi maggiore e minore, dall'altro anche la sequenza nucleotidica influisce sulla precisa conformazione spaziale dell'elica e questo rappresenta un secondo modo, meno diretto, attraverso cui la sequenza nucleotidica del DNA influenza il legame con la proteina.

Per un riconoscimento sequenza-specifico, la proteina deve interagire a livello di uno o entrambi i solchi del DNA. Il solco maggiore del DNA in forma B permette un'interazione migliore tra basi azotate e sequenze amminoacidiche, tale per cui l'identità e l'orientazione delle basi è meno ambigua che nel solco minore, dove le basi azotate possono essere distinte solo tra puriniche e pirimidiniche. Per questa ragione le interazioni sequenza-specifiche avvengono prevalentemente nel solco maggiore, quando il DNA si trova nella forma B. In altre conformazioni, invece, come ad esempio nel DNA in forma A, il solco maggiore è più stretto e profondo e quindi meno accessibile, per cui le proteine interagiscono preferenzialmente con la sequenza esposta nel solco minore. Altra situazione ancora nel DNA in forma Z, in cui il solco maggiore è praticamente inesistente e il riconoscimento delle basi azotate può avvenire tranquillamente lungo una porzione anche abbastanza estesa del DNA, senza che la proteina si muova lungo la superficie dell'elica.

Le interazioni DNA-proteina possono anche non essere sequenza specifiche. Ad esempio, le desossiribonucleasi interagiscono con il DNA attraverso legami non covalenti con lo scheletro zucchero-fosfato.

I contatti specifici tra DNA e proteine sono di tipo non covalente e coinvolgono soprattutto legami a ponte idrogeno ed interazioni idrofobiche tra i nucleotidi e le catene laterali dei residui amminoacidici nella porzione di riconoscimento della proteina. Queste interazioni possono essere dirette o mediate da molecole di acqua. A livello della superficie della doppia elica, invece, le interazioni sono soprattutto elettrostatiche tra le cariche negative dei gruppi fosfato sullo scheletro della doppia elica e le catene laterali cariche positivamente di residui di lisina e arginina, presenti sulla porzione superficiale della proteina legante.

La capacità di una proteina di interagire con una sequenza specifica tra milioni di altri siti con i quali potrebbe legarsi in modo aspecifico, all'interno della sequenza nucleotidica, trova una spiegazione in termini di termodinamica. Un maggior numero di interazioni tra DNA e proteina determina un vantaggio termodinamico e questo spiega perché, in natura, si siano evoluti, e conservati, dei motivi *DNA-binding* che si adattano in modo specifico in profondità al solco dell'elica, dove le interazioni possono essere maggiori. Questo spiega anche le variazioni conformazionali che avvengono nella proteina durante l'interazione in modo da aumentare la complementarità tra i siti e la superficie dell'interazione, aumentando il numero di legami possibili.

La necessità di massimizzare i contatti tra DNA e proteine, per assicurare una maggiore specificità, è anche la ragione per cui molte proteine sono dimeri costituiti da monomeri identici, le cui porzioni di riconoscimento interagiscono in modo cooperativo con la doppia elica, ma le interazioni risultanti sono maggiori di quelle di un singolo monomero.

3.1.4 DERIVATI ANTRACHINONICI SEQUENZA SELETTIVI

La tossicità e gli effetti indesiderati che colpiscono i pazienti in cura antitumorale, rappresentano uno dei maggiori limiti della terapia chemioterapica. Per superare tali inconvenienti, la ricerca si è indirizzata verso il *design* di composti caratterizzati da un *targeting* selettivo verso le cellule tumorali.

La ricerca della specificità verso determinati geni o sequenze polinucleotidiche deriva dall'osservazione della presenza nelle cellule normali di geni, detti proto-oncogeni, critici per la sopravvivenza della cellula. L'espressione di tali geni è strettamente controllata da altri geni, detti oncosoppressori, e il delicato bilancio tra espressione e soppressione consente il corretto sviluppo cellulare. Mutazioni del codice genetico a livello di tali geni, causate da fattori chimici o fisici, possono causare uno sbilanciamento nell'espressione di tali geni rendendoli oncogeni. Di conseguenza lo sviluppo di agenti antitumorali capaci di colpire specifiche sequenze del genoma rappresenterebbe un'importante vantaggio nella terapia del cancro e l'idea è quella di introdurre, a livello di farmaci già disponibili, specifici elementi di riconoscimento per le sequenze oncogeniche.

La specificità di sequenza può essere a corto raggio, come per esempio per le antracicline (117), coinvolgendo composti a basso peso molecolare che riescono ad interagire con 2-5 coppie di basi, oppure a lungo raggio (118) con il vantaggio di riconoscere univocamente una sequenza nell'intero genoma. Questo secondo tipo di riconoscimento è esteso a 15-20 coppie di basi, ma ha lo svantaggio di richiedere composti ad alto peso molecolare.

Come descritto precedentemente l'interazione proteina-DNA, osservata in natura, è generalmente altamente specifica e determinata sia dalla sequenza amminoacidica, che dalla conformazione stessa assunta.

Allo scopo di mimare la stessa specificità di legame, il “*drug design*” si è indirizzato verso l'identificazione e la sintesi di composti caratterizzati dalla presenza di residui amminoacidici legati al farmacoforo. La coniugazione di farmaci antitumorali attivi nei confronti del DNA a peptidi in grado di interagire con l'acido nucleico, può quindi portare alla sintesi di nuovi composti sequenza specifici.

La maggior parte dei farmaci sequenza-specifici interagisce con il solco minore del DNA: i *groove binders* con proprietà non intercalanti (119), gli intercalanti in senso stretto (120) e i coniugati oligopeptide-intercalanti (121). La maggioranza delle interazioni proteina-DNA avvengono però nel solco maggiore e coinvolgono legami a ponte idrogeno con i siti O6/N7 della guanina, N6/N7 dell'adenina e O4 della timina. Ad eccezione degli oligonucleotidi antisense e dei PNA (*Peptide Nucleic Acids*), pochissime molecole ad oggi sono state disegnate e sintetizzate in modo specifico per

interagire con il solco maggiore del DNA; un esempio recente è fornito dai derivati del BAP, bis- e tris-arginil-coniugati di una porfirina tricationica (122).

Allo scopo di sviluppare nuovi composti appunto in grado di legare a livello del solco maggiore selettivamente specifiche sequenze oncogeniche, sono stati effettuati dal Prof. Nohad Gresh dell'Università di Parigi alcuni studi teorici computazionali, che indicano una elevata specificità di legame di una nuova serie di peptidil-antrachinoni verso sequenze palindromiche del DNA di particolare interesse farmacologico (123).

La particolarità di questi nuovi derivati intercalanti antrachinonici risiede nelle catene laterali, pensate per esplicitare un legame selettivo con le sequenze bersaglio: il tradizionale nucleo antrachinonico è stato quindi funzionalizzato con brevi catene amminoacidiche. In particolare, questi composti si sono ottenuti dal capostipite per esterificazione dei due bracci laterali con oligopeptidi di diverse lunghezze e sequenze.

In particolare, nello studio computazionale del Prof. Gresh, sono stati disegnati alcuni derivati del Mitoxantrone, funzionalizzati in catena laterale con il dipeptide Gly-Lys, che sembrano in grado di riconoscere selettivamente il “core” tetramericco d(CCGG)₂, e le loro energie di legame nei confronti della sequenza d(GGCGCC)₂ sono state comparate con quelle nei confronti di altre sequenze palindromiche: d(CGCGCG)₂, d(GCCGGC)₂ e d(CCCGGG)₂.

L'interazione con la sequenza palindroma d(GGCGCC)₂ è molto importante nel *design* di nuovi farmaci antitumorali, in quanto questa è molto frequente negli oncogeni (124), nel genoma di alcuni retrovirus, come nel riconoscimento del sito di restrizione di *NarI* punto ad elevata densità mutazionale nel DNA (125). In particolare, tale sequenza si ritrova a livello della sequenza LTR (*Long Terminal Repeats*) del retrovirus HIV (126, 127); si ritrova ripetuta due volte nel prototore dell'oncogene *c-onc* (128); una volta nella regione U3-R del cDNA del Virus della Leucemia Bovina (129); due volte nel promotore del gene del Retinoblastoma (130) e due volte in regioni altamente conservate del proto-oncogene *myb* (124).

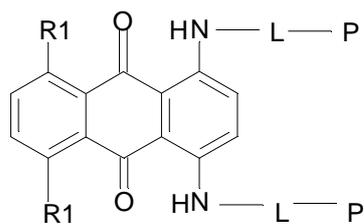
La scelta del Mitoxantrone è stata fatta sulla base delle sue proprietà antitumorali. Innanzitutto il nucleo antrachinonico presenta una preferenza di intercalazione nei confronti della sequenza d(Pyr-Pur)₂, piuttosto che per la sequenza d(Pur-Pyr)₂ o d(Pur-Pur).d(Pyr-Pyr) (131), e questo è il motivo per cui le sequenze scelte per gli studi teorici prevedono la presenza comune del dinucleotide centrale d(C3G4). Inoltre, la scelta di

sequenze palindromiche è riconducibile alla naturale simmetria dei bracci del Mitoxantrone stesso e l'estensione della lunghezza delle due catene in versi opposti favorirebbe la stereochimica di interazione con il DNA, per cui, sulla base di calcoli teorici, dovrebbero interagire ciascuno con un filamento distinto (123). Per queste ragioni, si è pensato di estendere simultaneamente la lunghezza delle catene in modo da ottenere un riconoscimento migliore e selettivo per una base purinica e questo dovrebbe risultare nell'estensione della specificità di sequenza a due basi successive. Inoltre, una ulteriore previsione di questi calcoli teorici è stata l'interazione reciproca delle due catene che avrebbero formato l'una sull'altra una doppia elica antiparallela. Infine, un'altra importante caratteristica di questi derivati è la presenza di un azoto libero a livello del *linker*, nelle catene laterali; studi precedenti (112, 113) dimostrano infatti che esso ha un ruolo fondamentale e nessuna attività è osservabile quando viene sostituito da un gruppo metilico o da un altro atomo come zolfo.

I composti in esame sono stati sintetizzati dal gruppo del Prof. Zagotto del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova ed è stata esaminata la loro attività intercalante al DNA, la capacità di interferire con enzimi che agiscono sul DNA stesso, la loro citotossicità ed in particolare l'affinità per le specifiche sequenze di acido nucleico indicate dal Prof. Gresh.

Il farmaco capostipite della serie è rappresentato dall'Ametantrone, analogo del Mitoxantrone, privo di due gruppi idrossilici in posizione 5 e 8 del sistema aromatico, ugualmente in grado di legare il DNA attraverso un processo intercalativo, ma con un'attività circa 10 volte meno potente in vivo e 100 volte meno potente in vitro rispetto al Mitoxantrone. Allo stesso tempo però, il Mitoxantrone esibisce un'elevata genotossicità (132). Un ulteriore motivo che ha spinto alla scelta di sintetizzare derivati dell'Ametantrone, è che questa molecola, mancando i due gruppi idrossilici nel sistema aromatico, rende più semplice la sintesi di peptidil-derivati. Secondo il Professor Gresh (corrispondenza personale) l'uso dell'Ametantrone al posto del Mitoxantrone, come capostipite, non provocherebbe alcuna variazione nel legame selettivo alle specifiche sequenze bersaglio di DNA. Accanto ai peptidil-derivati dell'Ametantrone, sono stati sintetizzati diversi altri composti con sostituzioni bioisosteriche a livello del *linker*, allo scopo di ottenere una serie preliminare per studi di relazione struttura-attività.

Le strutture chimiche degli antrachinoni in esame sono illustrate in tabella 3.1.



Composto	R1	L	P
Ametantrone	H		No
Mitoxantrone	OH		No
1002	H		
1008	H		
1010	H		
1013	H		
1015	H		
1019	H		

Tab. 3.1 Strutture dei nuovi antrachinoni: R = residuo, L = linker; P = catena peptidi.

3.2 RISULTATI

3.2.1 PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE DEGLI ANTRACHINONI ESAMINATI

Le soluzioni di antrachinoni sono state preparate sciogliendo una piccola quantità di composto cristallizzato in DMSO, la concentrazione della soluzione ottenuta è stata poi determinata per via spettrofotometrica utilizzando il coefficiente di estinzione molare dell'ametantrone, determinato sperimentalmente, a 25°C in acqua mQ. Il suo valore in queste condizioni, alla lunghezza d'onda di 626 nm, è risultato essere di $5400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; abbiamo quindi assunto lo stesso valore di ϵ per tutti gli altri derivati alla stessa lunghezza d'onda. La determinazione del coefficiente di assorbimento molare dell'ametantrone è stata eseguita in duplicato e in figura 3.4 è mostrata una delle rette di taratura ottenute.

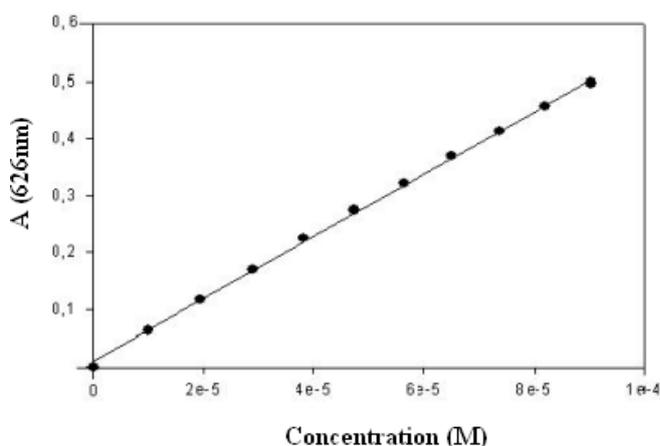


Fig. 3.4 Retta di taratura dell'ametantrone per la determinazione del coefficiente di estinzione molare, a 25°C in acqua mQ.

Tutti i composti sono stati caratterizzati sia spettroscopicamente che fluorimetricamente a 25°C in acqua mQ. Esaminando gli spettri di assorbimento, abbiamo notato che tutti i composti presentano un profilo di assorbimento simile a quello del composto di riferimento ametantrone. Generalmente, tutti gli anthrachinoni mostrano due massimi di assorbimento: il primo tra 570-590 nm e l'altro compreso tra i 630-640 nm. In figura 3.5 sono illustrati gli spettri di assorbimento dei composti esaminati.

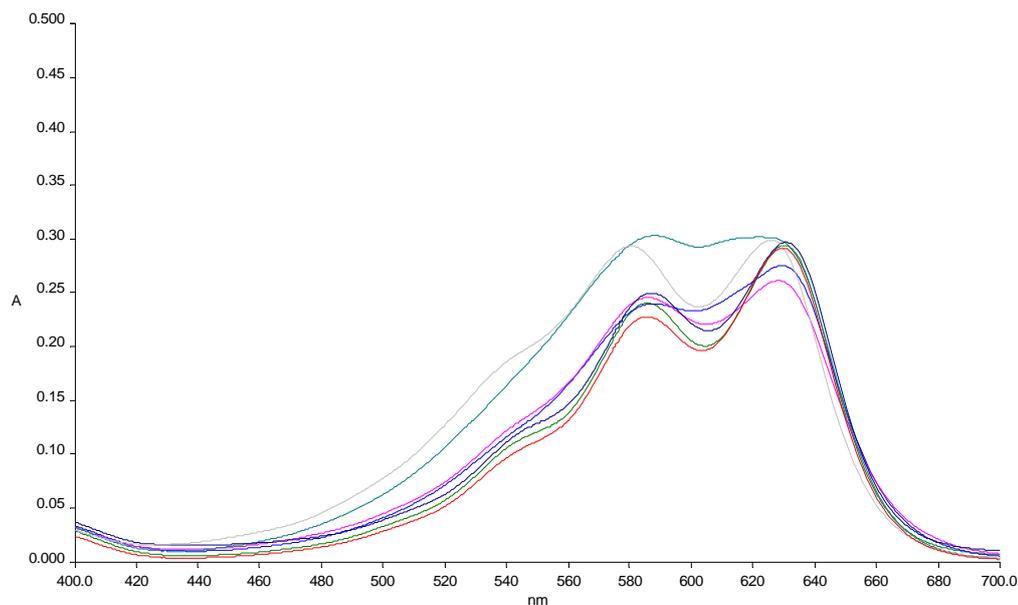


Fig. 3.5 Spettri di assorbimento degli antrachinoni esaminati a concentrazione di 60 μ M, a 25°C, in acqua mQ. grigio=ametantrone; blu=1002; rosso=1008; fucsia=1010; verde=1013; verde scuro= 1015; blu scuro=1019.

3.2.2 STUDIO DEL LEGAME AL DNA

3.2.2.1 Saggi di *unwinding*

La mobilità elettroforetica delle diverse forme topologiche del DNA offre un metodo di investigazione per analizzare il potere intercalante dei nuovi composti. Generalmente, un DNA a doppia catena circolare si trova in una forma superavvolta, a formare una superstruttura compatta, piuttosto mobile in un sistema elettroforetico, dato il modesto volume idrodinamico occupato. Il DNA a doppia elica è caratterizzato da tre parametri topologici (133): il numero di legame Lk (*linking number*), definito come il numero di coppie di basi per ogni giro di elica, il *twisting number* Tw, che rappresenta il numero di avvolgimenti del DNA e il numero di superavvolgimento Wr (*writhing number*), cioè le rivoluzioni dell'asse del duplex nello spazio. Questi parametri sono correlati insieme dall'equazione di Fuller:

$$Lk = Wr + Tw$$

Il numero di legame Lk subisce variazioni solamente in seguito a rotture dello scheletro zucchero-fosfato del DNA, mentre il numero di avvolgimento Tw può variare in seguito ad intercalazione. Nel processo intercalativo l'inserzione di un cromoforo planare tra le coppie di basi provoca uno svolgimento (*unwinding*) del superavvolgimento del DNA; l'effetto dell'intercalazione ottenuto con aggiunte crescenti di farmaco provoca quindi il

disavvolgimento progressivo della doppia elica, fino a raggiungere una struttura circolare rilassata ($W_r=0$), con incremento del volume idrodinamico del DNA, che si traduce in una diminuzione della mobilità elettroforetica. Ulteriori aggiunte di intercalante provocano un'ulteriore diminuzione di T_w e, come compensazione, il riavvolgimento della forma rilassata nel senso opposto a quello iniziale. Anche questa forma di DNA superavvolto positivamente è molto compatta e caratterizzata quindi da un incremento della mobilità nel gel.

La mobilità elettroforetica del plasmide varierà pertanto in dipendenza della concentrazione di farmaco intercalato e dal grado di disavvolgimento delle coppie di basi al sito di intercalazione. Come mostrato in figura 3.6, la mobilità elettroforetica è massima a basse e alte concentrazioni di composto, e minima alle concentrazioni intermedie, con un andamento a campana.

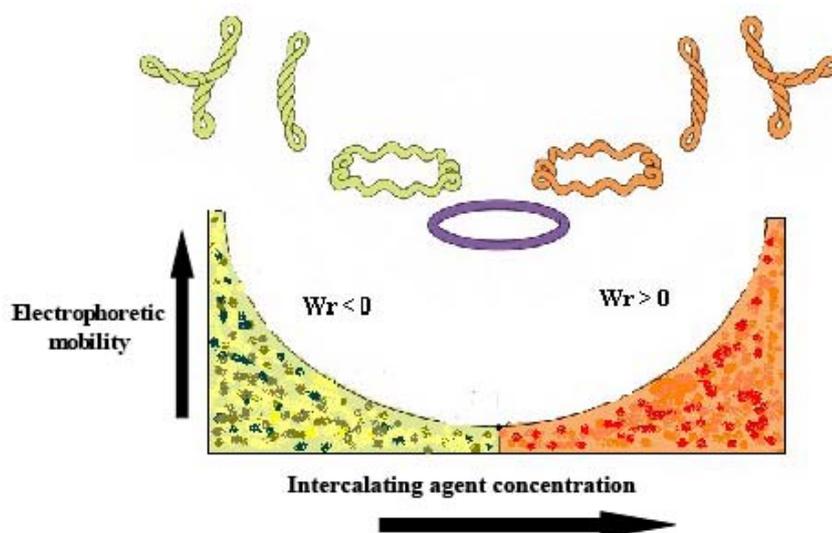


Fig. 3.6 Interconversione dei diversi topoisomeri del DNA in seguito all'aggiunta di crescenti quantità di agente intercalante.

In questo lavoro, è stata investigata la mobilità elettroforetica del plasmide pBR322 in seguito all'incubazione con gli antrachinoni in esame; la migrazione del DNA rifletterà infatti la capacità intercalativa dei composti aggiunti. Nella corsa elettroforetica sono stati aggiunti due controlli: il plasmide pBR322 superavvolto (SC) e in assenza di composti (P) e il plasmidi in forma *open-circular* (OC), cioè con un taglio ad un solo filamento, il quale presenta una mobilità elettroforetica comparabile con quella del plasmide rilassato ($W_r=0$).

L'Ametantrone (Am) è stato utilizzato come controllo positivo, presentando un elevato potere intercalativo, che ci permette di osservare il fenomeno di *unwinding* che inizia già ad una concentrazione 1 μM e molto evidente con 10 μM di composto (figura 3.7). I nuovi antrachinoni testati, tutti derivati dell'ametantrone presentano comportamenti differenti: lo svolgimento del plasmide è evidente in presenza del composto 1019, per cui si osserva un evidente effetto *unwinding* a 10 μM , mentre i composti 1013 e 1015 non mostrano invece effetto a 10 μM . Questi due sono in grado di svolgere il DNA con effetto apprezzabile solo alla concentrazione più alta esaminata (100 μM). Il composto 1010 dimostra una debole abilità intercalativa alla concentrazione più alta presa nell'esame (100 μM), mentre il 1008 non sembra modificare particolarmente lo stato topologico del plasmide pBR322 a nessuna delle concentrazioni testate. L'effetto mostrato dal composto 1002 è particolare, possiamo osservare infatti un trascurabile effetto di ritardo elettroforetico alla concentrazione di 10 μM , mentre a 100 μM l'effetto è maggiormente pronunciato. Comunque bisogna osservare come la colorazione con l'etidio bromuro nel campione contenente il composto 1002 a 100 μM è ridotta: l'etidio è un intercalante e per creare un complesso con il DNA deve "spiazzare" altri eventuali intercalanti dal DNA.

Di conseguenza la mancata colorazione del DNA da parte dell'etidio ad elevate concentrazioni di 1002 ci indica che questo composto compete con l'etidio bromuro per lo stesso sito di legame.

Inoltre si può notare che il 1002 a concentrazione 100 μM , precipita in parte il DNA nel pozzetto. I risultati descritti sono tutti evidenti nelle figure 3.7 e 3.8.

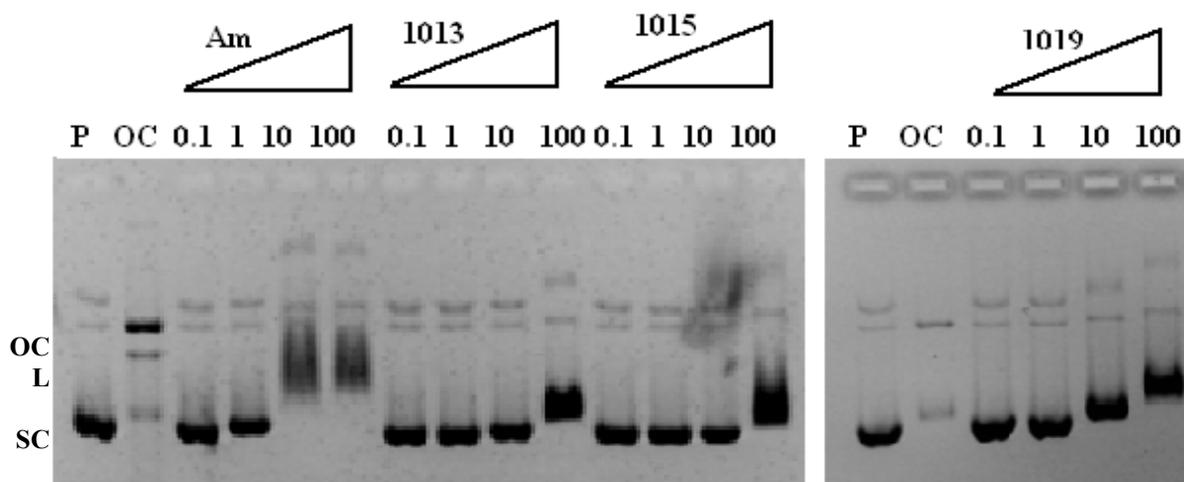


Fig. 3.7 Saggio di *unwinding*. Gel agarosio all'1% in TBE 1X (Tris 89 mM, Acido borico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0). P = 0.25 μ g di plasmide pBR322 superavvolto (SC). OC = 0.1 μ g di plasmide in forma *OpenCircular*. Am = Ametantrone a 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M; composto 1013 a 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M; composto 1015 a 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M; composto 1019 a 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M. L: plasmide linearizzato formatosi in seguito al trattamento con l'enzima DNAsi. Corsa elettroforetica *overnight* a 15 mV/cm.

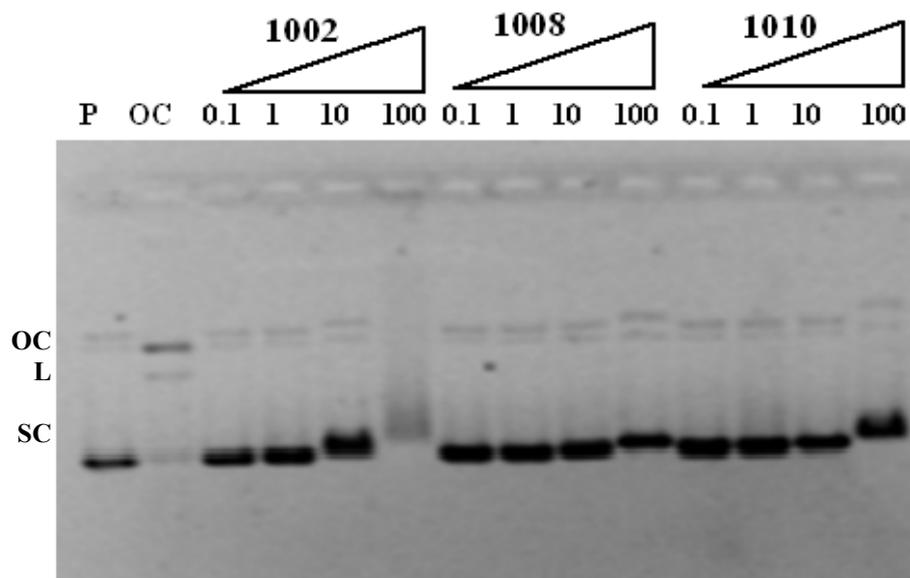


Fig. 3.8 Saggio di *unwinding*. Gel agarosio all'1% in TBE 1X (Tris 89 mM, Acido borico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0). P = 0.25 μ g di plasmide pBR322 superavvolto. OC = 0.1 μ g di plasmide in forma *OpenCircular*. Composto 1002 a 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M; composto 1008 a 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M; composto 1010 a 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M. L: plasmide linearizzato formatosi in seguito al trattamento con l'enzima DNAsi. Corsa elettroforetica *overnight* a 15 mV/cm.

Per comprendere meglio il comportamento del composto 1002 sono stati effettuati degli studi di *dicroismo circolare*, descritti più avanti.

3.2.2.2 Studio del legame al DNA sequenza-specifico: saggi di *melting* tramite *Contact-Quenching*

A questo punto per esaminare la capacità dei nuovi antrachinoni di legare specifiche sequenze di DNA è stato messo a punto un saggio di *melting* che sfrutta il fenomeno del *Contact-Quenching*.

Come già descritto per il saggio di *Fluorescence Quenching* messo a punto per l'analisi degli inibitori Tat-TAR (prima parte di questa tesi), anche questo saggio consiste in una modificazione del protocollo di FRET (*Fluorescence Resonant Energy Transfer*), utilizzando come accettore di fluorescenza, non un secondo fluoroforo, ma una molecola in grado di fungere da "dark quencher".

Per gli esperimenti di *melting* sono state utilizzate alcune coppie di corti oligonucleotidi appaiati a DNA: all'estremità 5' del filamento *forward* è legato covalentemente il fluoroforo fluoresceina (FAM), mentre il quencher *Dabcyl* (DAB) è legato all'estremità 3' del filamento complementare. In seguito all'appaiamento di questi due filamenti complementari otteniamo un oligonucleotide a doppio filamento *blunt-end*, come mostrato in figura 3.9.

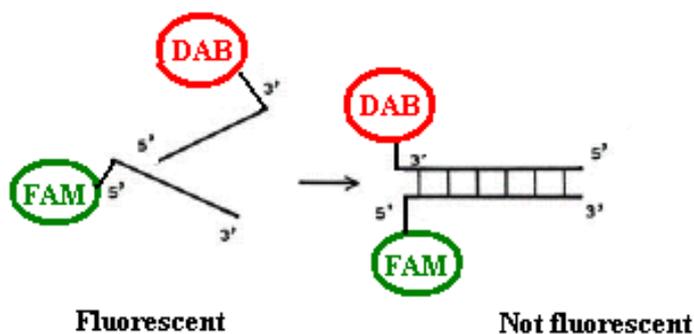


Fig. 3.9 Processo di *annealing* per ottenere l'oligonucleotide *blunt-end* a doppio filamento.

In seguito all'appaiamento dei due oligonucleotidi, il fluoroforo ed il quencher vengono a trovarsi vicini, per cui si avrà il trasferimento di fluorescenza dal donatore all'accettore, con conseguente mancata o ridotta emissione di fluorescenza da parte della fluoresceina. In figura 3.10 sono infatti riportati gli spettri di fluorescenza degli oligonucleotidi marcati a singolo filamento e una volta appaiati. L'oligonucleotide DAB non emette fluorescenza, mentre l'oligonucleotide che presenta legato il fluoroforo FAM mostra un'apprezzabile emissione di fluorescenza in seguito ad eccitazione a 494

nm. L'oligonucleotide appaiato a doppio filamento a temperatura ambiente è molto meno fluorescente rispetto alla forma libera.

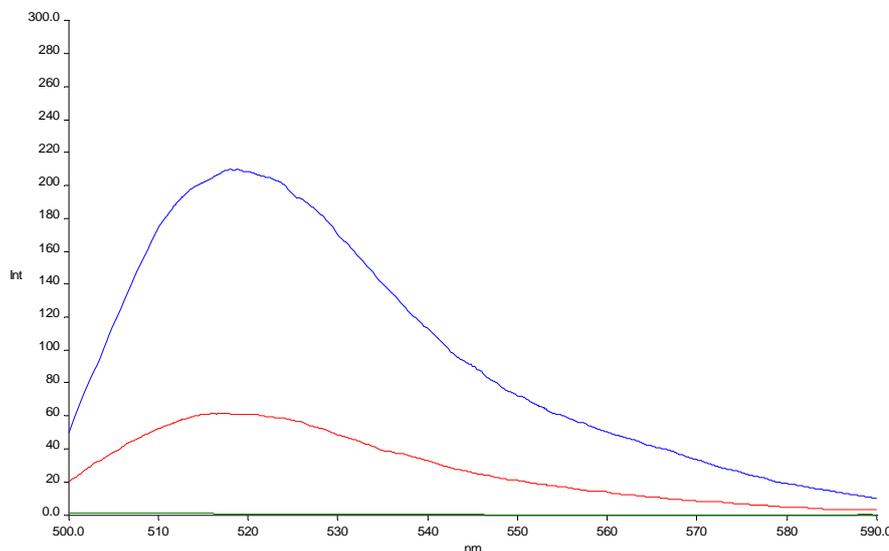


Fig. 3.10 Spettri di emissione di fluorescenza dell'oligonucleotide Z1 marcato con FAM (linea blu), dell'oligonucleotide marcato con DAB (linea verde) e della forma appaiata a doppio filamento (linea rossa). Le misure sono state effettuate a 25°C in TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), ad una concentrazione di 0.09 μ M per ogni oligonucleotide.

Le reazioni di melting sono state effettuate all'interno di capillari di vetro utilizzando lo strumento Light Cycler della ditta Roche, che permette di applicare il protocollo termico voluto e misurare continuamente l'emissione di fluorescenza di ogni campione.

I campioni sono stati preparati come descritto in "Materiali e Metodi", facendo prima appaiare i due oligonucleotidi complementari e successivamente impostando nello strumento il seguente protocollo termico composto di tre fasi: una prima rampa da 30 °C a 95 °C (la vera e propria fase di *melting*); 10 minuti a 95 °C; una fase finale di riappaiamento nella quale la temperatura viene abbassata a 30 °C; la temperatura viene variata di 1 °C/min.

Man mano che si ha l'aumento di temperatura, con conseguente denaturazione del doppio filamento, si ha un rilascio dell'oligonucleotide marcato con il fluoroforo FAM e di conseguenza si osserverà un incremento del segnale di fluorescenza per allontanamento dal *quencher* DAB.

Il valore della temperatura di *melting* (T_m) è il parametro scelto per descrivere la stabilità delle diverse coppie di oligonucleotidi all'aumentare della temperatura. Tale valore viene calcolato seguendo la variazione del segnale di fluorescenza in funzione

della temperatura. In particolare è possibile ottenere il valore di T_m direttamente dal profilo di *melting* dell'oligonucleotide in esame, tramite il calcolo della derivata prima, che viene effettuato direttamente dal software dello strumento.

In figura 3.11a sono riportati, a titolo di esempio, i profili di *melting* dell'oligonucleotide a doppio filamento appaiato Z1 e dell'oligonucleotide a singolo filamento Z1 5'FAM; in figura 3.11b abbiamo invece le relative curve di derivata prima.

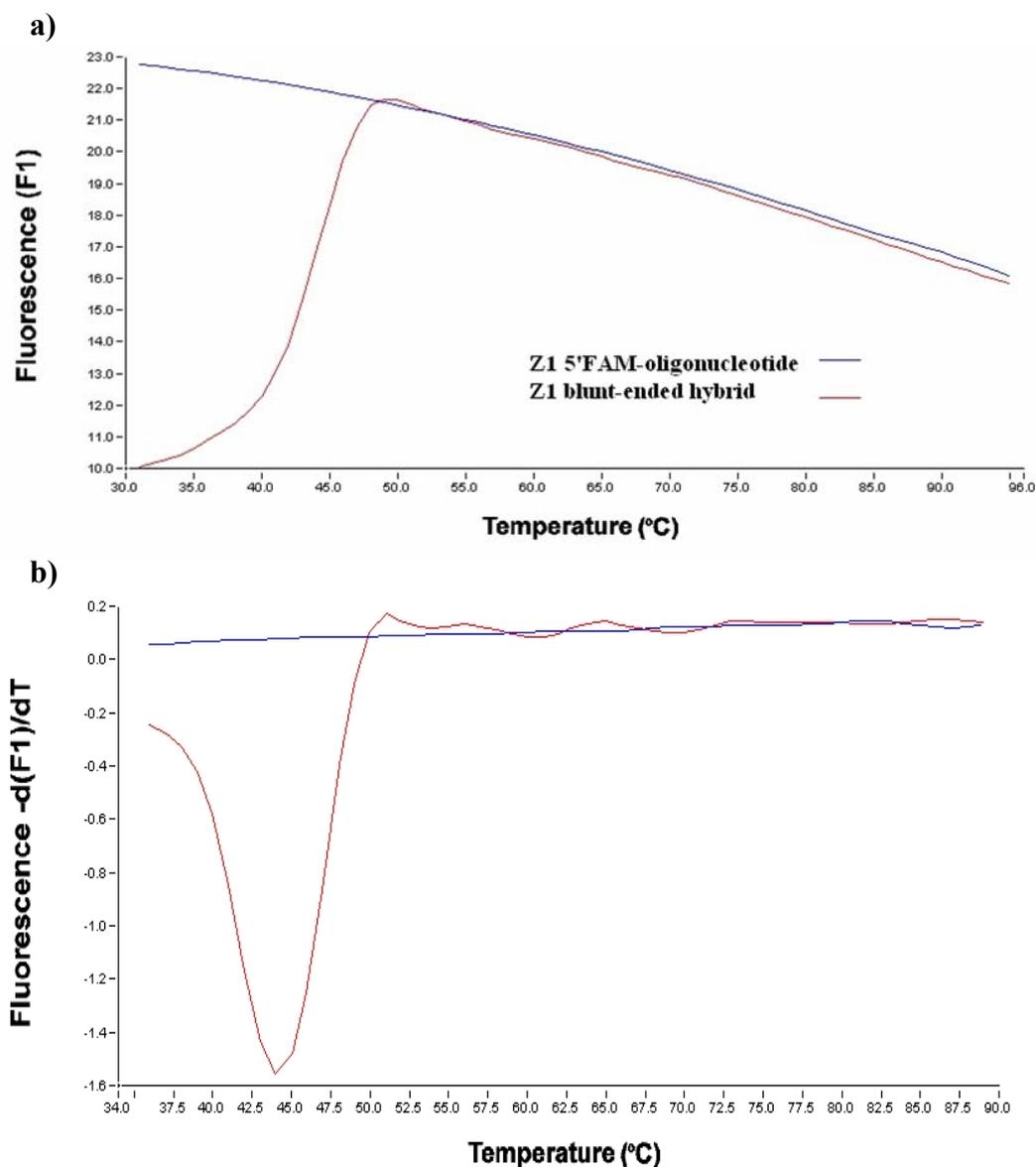


Fig. 3.11 a) Confronto dei profili di *melting* dell'oligonucleotide a singolo filamento marcato con fluoresceina e dell'oligonucleotide appaiato a doppio filamento, in tampone ETN (EDTA 1 mM, Tris 10 mM, NaCl 20 mM, pH 7.5). **b)** Derivate dei profili di *melting*.

Come si era già visto con gli spettri di fluorescenza riportati in figura 3.11, all'inizio del *melting* si nota una notevole differenza tra l'oligonucleotide a singolo filamento (fluorescente) e il suo ibrido appaiato (non fluorescente). Al procedere del saggio l'aumento di temperatura determina la denaturazione dell'oligonucleotide a doppio filamento con conseguente incremento di fluorescenza fino a raggiungere la stessa intensità dell'oligonucleotide a singolo filamento, e da questo punto in poi le due curve sono sovrapponibili. Come si può notare però il segnale di fluorescenza tende a diminuire all'aumento di temperatura. Tale fenomeno non è inaspettato, in quanto è noto che la fluorescenza varia in funzione della temperatura ed inoltre abbiamo anche un contributo della variazione di pH del tampone: il tampone Tris mostra un $\Delta pK_a/^\circ C = -0.03$ e nel saggio di *Contact Quenching* un ΔT di $65^\circ C$ significa un decremento del valore di pH da 7.5 a 5.5. Lo spettro di emissione delle fluoresceina in funzione della variazione di pH è mostrato in figura 3.12, mentre in figura 3.13 sono riportati i diversi stati di ionizzazione pH-dipendenti.

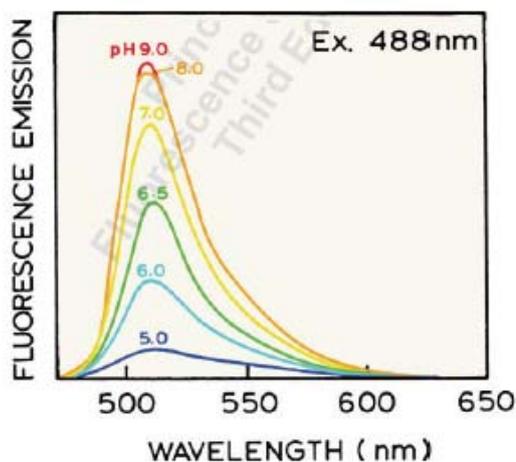


Fig. 3.12 Spettri di emissione della fluoresceina in seguito a cambio del pH.

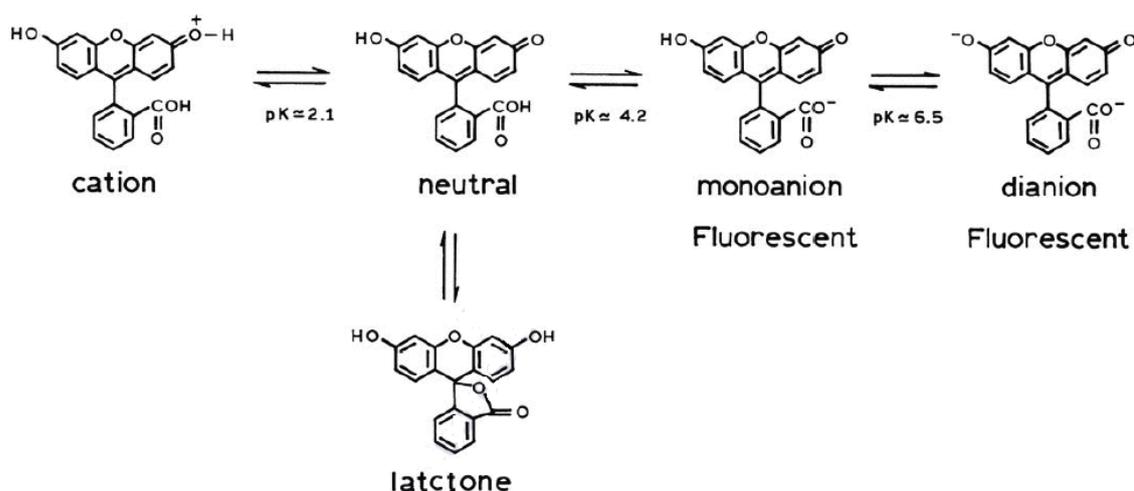


Fig. 3.13 Diversi stati di ionizzazione della fluoresceina in funzione del pH. Solo le forme dianioniche e monoanioniche sono fluorescenti.

A questo punto possiamo quindi valutare il legame selettivo a specifiche sequenze di DNA da parte dei composti in esame, studiando la variazione della temperatura di *melting* (ΔT_m) dei tre diversi oligonucleotidi presi in considerazione, in seguito all'aggiunta di concentrazioni crescenti di antrachinone.

In particolare le sequenze di DNA scelte sono state le seguenti:

- un oligonucleotide *random*, senza specifiche sequenze interne
- l'oligonucleotide Z1, che presenta al suo interno la sequenza CCCGGG
- l'oligonucleotide Z2, che presenta al suo interno la sequenza GGCGCC

Tali sequenze sono emerse essere siti riconoscibili con elevata specificità dagli antrachinoni in esame, secondo studi di "*molecular modelling*" (131).

E' importante sottolineare come nessuno degli antrachinoni esaminati ha mostrato una fluorescenza rilevante, mentre appunto il fluoroforo FAM mostra emissione di fluorescenza quando eccitato a 490 nm, per cui non abbiamo problemi di interferenza da parte della fluorescenza degli antrachinoni.

A titolo di esempio il profilo di melting dell'oligonucleotide Z1, in presenza di diverse concentrazioni di Ametantrone è riportato in figura 3.14.

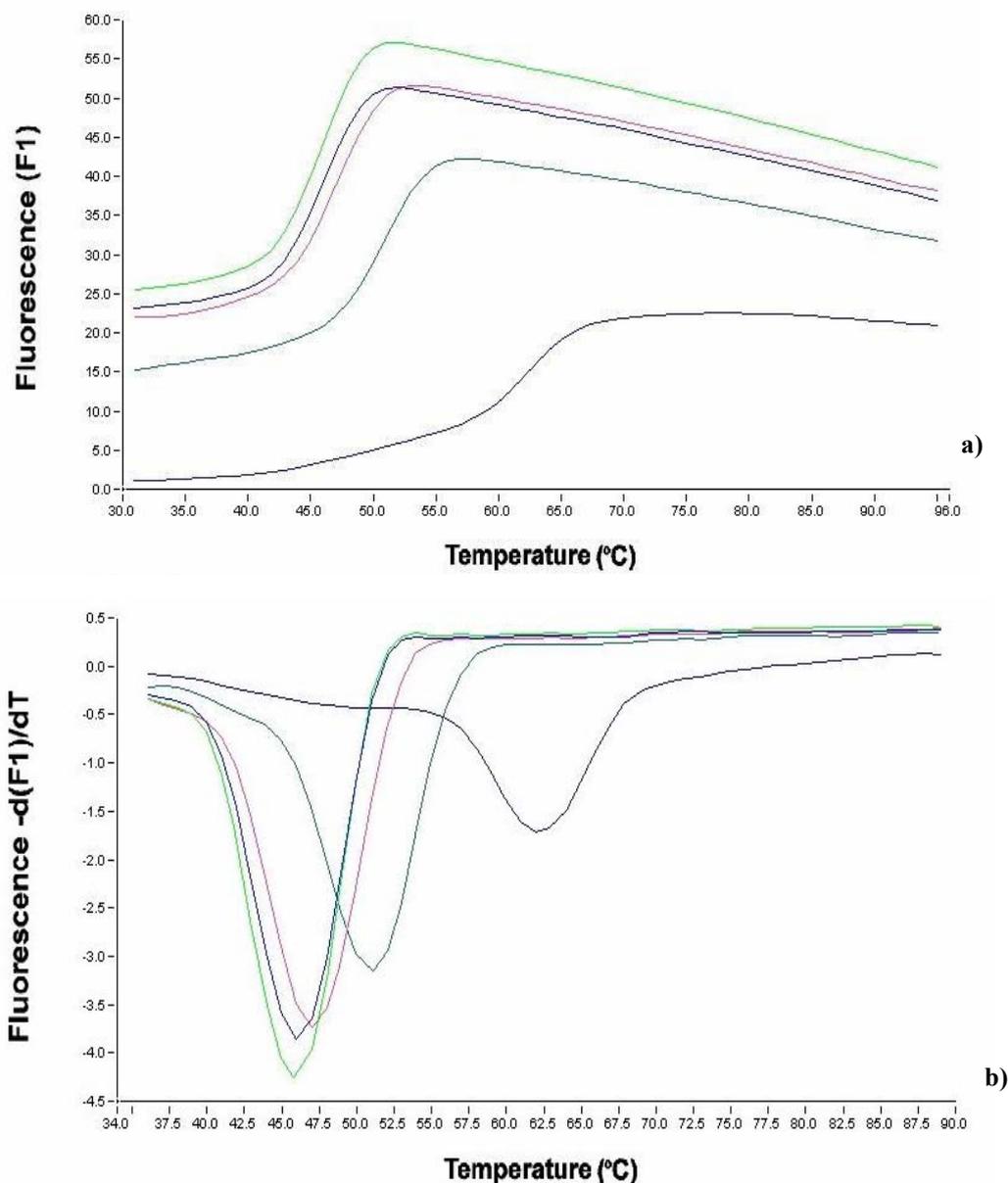


Fig. 3.14 a) Profilo di *melting* e b) la sua curva derivata dell'oligonucleotide a doppio filamento Z1 in seguito all'aggiunta di Ametrantrone. Il saggio è stato condotto in tampone ETN20 (EDTA 1 mM, Tris 10 mM, NaCl 20 mM, pH 7.5). Linea blu e verde brillante = oligonucleotide Z1 in concentrazione 0.25 μM; Linea rosa = ametrantone 1 μM + oligo Z1 0.25 μM; linea verde scuro = ametrantone 10 μM + oligo Z1 0.25 μM; linea marrone = ametrantone 100 μM + oligo Z1 0.25 μM.

E' stato assunto come valore di T_m la temperatura alla quale il profilo di *melting* (fluorescenza verso temperatura) presenta un punto di flesso e sono stati misurati i valori di T_m dei tre diversi filamenti oligonucleotidici in presenza degli antrachinoni a tre diversi rapporti [farmaco]/[oligonucleotide] (4, 40, 400).

Inoltre, per valutare l'influenza della forza ionica sul legame al DNA, i saggi di *Contact Quenching* sono stati eseguiti per tutti i composti a diverse concentrazioni di NaCl,

rispettivamente in tampone ETN20 (EDTA 1mM, Tris 10 mM, NaCl 20 mM, pH 7.5), ETN150 (EDTA 1mM, TRIS 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5), ETN500 (EDTA 1mM, Tris 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5).

Come già detto precedentemente sono state applicate tre fasi di temperature: una prima rampa da 30°C a 95°C (fase di *melting*), poi la temperatura è stata mantenuta a 90 °C ed una seconda rampa da 95°C a 30°C (fase di *annealing*), tutte effettuate alla velocità di 1 °C/min. In tal modo si ottengono due punti di flesso e quindi due T_m, una relativa alla fase di *melting* e la seconda relativa alla fase di *annealing*.

In figura 3.15 sono riportati i grafici dei valori di ΔT_m calcolati, in funzione della concentrazione di composto aggiunto, in tampone ETN 20 mM NaCl.

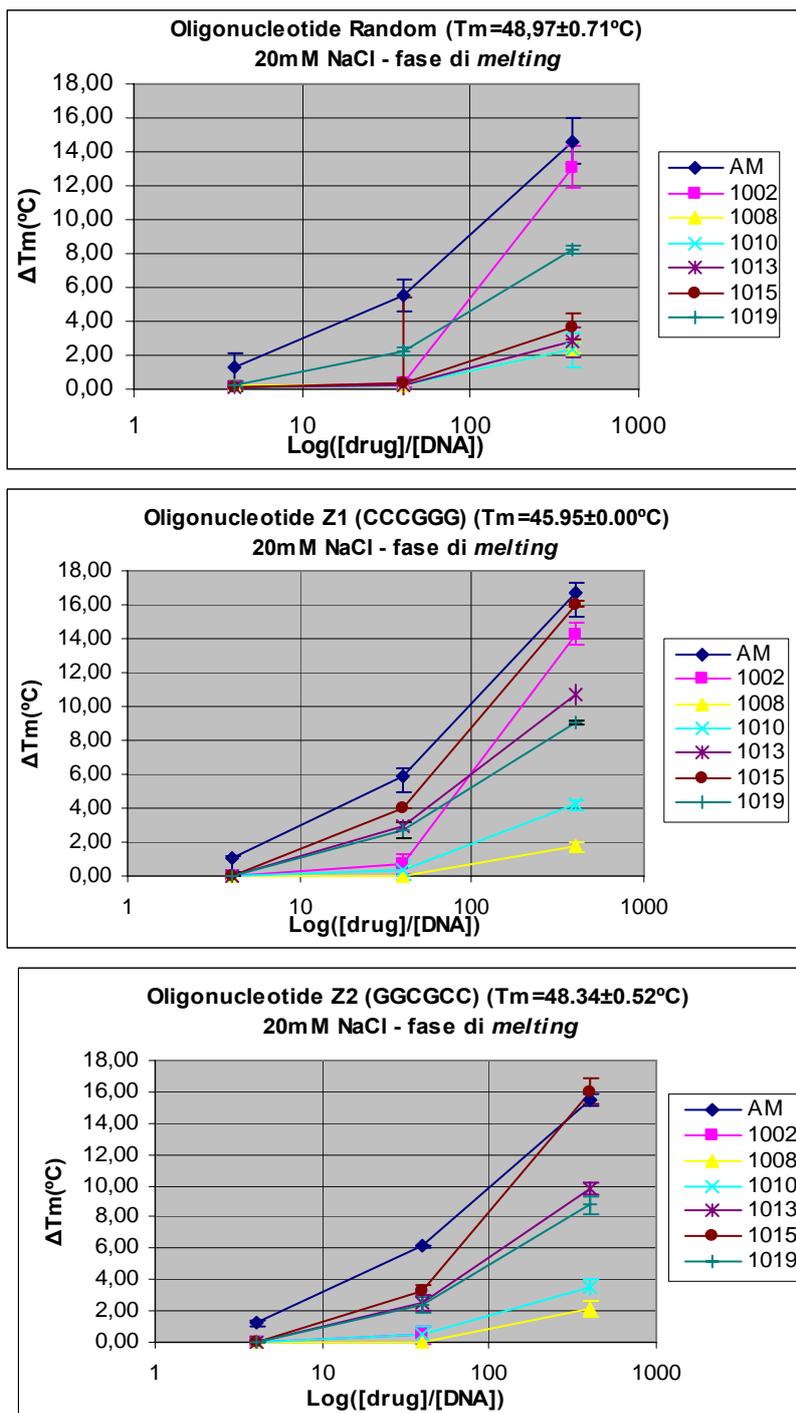


Fig. 3.15 ΔT_m (fase di *melting*) dei 3 diversi oligonucleotidi, in presenza dei composti in esame in ETN20.

E' subito evidente come gli antrachinoni si comportano in modo differente nei confronti delle diverse sequenze oligonucleotidiche. Abbiamo deciso di conseguenza di dividere i composti in esame in tre differenti famiglie: Ametantrone, 1002 e 1019 (leganti non-

selettivi), 1008 e 1010 (leganti deboli), 1013 e 1015 (leganti selettivi). Inoltre bisogna considerare come il 1002 presenti caratteristiche peculiari.

Il primo gruppo (leganti non-selettivi) lega appunto le tre diverse sequenze oligonucleotidiche in modo non selettivo. Il valore di ΔT_m risulta infatti essere elevato e comparabile per le diverse sequenze: da 14.6°C a 16.6°C per l'ametantrone e da 7.6°C a 9.1°C per il 1019, considerando le differenze al rapporto [farmaco]/[oligonucleotide] più alto testato (400). Anche il composto 1002 presenta un elevato valore di ΔT_m per l'oligonucleotide *random* e per l'oligonucleotide Z1. Nella seconda famiglia (leganti deboli), formata dai composti 1008 e 1010, il valore di ΔT_m è sempre basso e non supera mai i 4 °C al più alto rapporto [farmaco]/[oligonucleotide]. La terza famiglia di composti (leganti selettivi), comprendente il 1013 e 1015, mostra una chiara preferenza di sequenza: infatti il ΔT_m per l'oligonucleotide *random*, al più alto rapporto [farmaco]/[oligonucleotide] testato (400), è basso e paragonabile al valore ottenuto con i leganti deboli 1008 e 1010; dall'altra parte, l'alto valore di ΔT_m osservato con gli oligonucleotidi Z1 e Z2, ci indica che queste sequenze sono ben riconosciute da questi due antrachinoni.

Considerando la fase di *melting*, nel caso della sequenza Z2 a 100 μ M di composto 1002, non è riportato alcun valore di ΔT_m , in quanto non è stato rilevato il segnale di fluorescenza a 30 °C. Abbiamo ipotizzato che questo sia dovuto al fatto che, ad elevata concentrazione, il 1002 lega fortemente la sequenza GGCGCC: il complesso probabilmente origina una forma compatta del DNA (forma Ψ) che precipita e tale fenomeno è stato confermato da studi di dicroismo circolare, riportati di seguito.

Il composto 1002 è un legante forte di tutte le sequenze, ma la sua caratteristica è particolare anche quando analizziamo la fase di *annealing* della curva: mentre la fase di *annealing* di tutte tre le famiglie è simile alla fase di *melting*, per il 1002 il valore di ΔT_m della fase di *annealing* è trascurabile (figura 3.16).

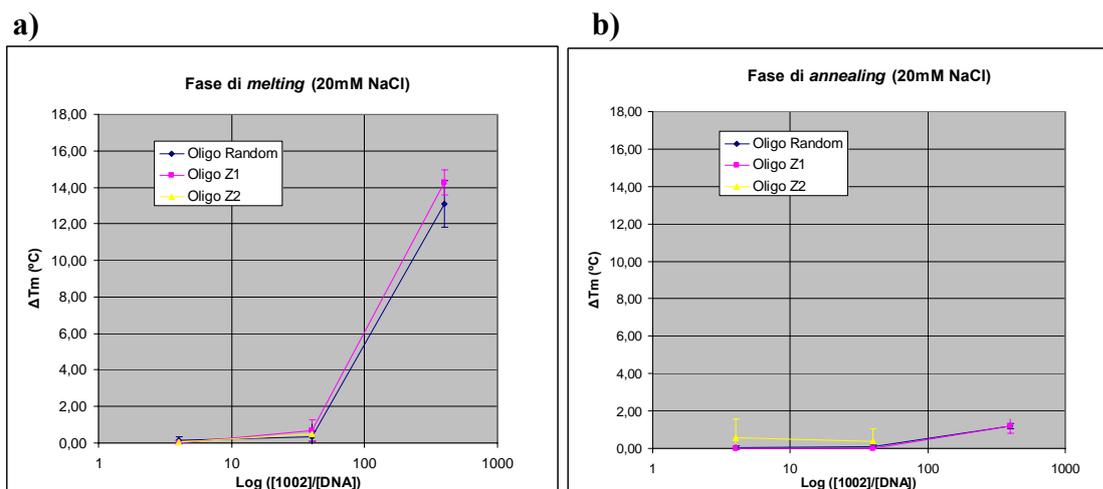


Fig. 3.16 ΔT_m della fase di *melting* (a) e di *annealing* (b) dei tre oligonucleotidi in presenza di 1002: oligo *random* (linea blu); oligo Z1 $d(\text{CCCGGG})_2$ (linea rosa), oligo Z2 $d(\text{GGCGCC})_2$ (linea gialla) in ETN20.

Il saggio di *Contact Quenching* è stato anche effettuato ad una concentrazione salina più elevata (NaCl 150 mM), come mostrato in figura 3.16. Come atteso, i valori delle temperature di *melting* dei tre oligonucleotidi sono più elevati e le variazioni in funzione della concentrazione (ΔT_m) più basse, in particolar modo per i leganti non selettivi (AM, 1002, 1019). A questa forza ionica infatti il contributo elettrostatico delle catene cariche degli antrachinoni è meno importante. I leganti selettivi, al contrario mostrano un comportamento simile in tampone a concentrazione salina di 20mM e 150mM, per l'oligonucleotide *random*; a questa concentrazione salina la ΔT_m dei composti 1013 e 1015 nei confronti dell'oligonucleotide *random* e delle sequenze specifiche è bassa, ma in tutti i casi è mantenuta una maggiore preferenza (anche se solo di pochi gradi) di questi composti per le sequenze specifiche.

L'alta concentrazione salina rende possibile valutare l'effetto per l'oligonucleotide Z2 del composto 1002 al rapporto [farmaco]/[oligonucleotide] più alto (400), in quanto con una più bassa affinità l'effetto di compattazione del DNA non avviene e di conseguenza non si ha precipitazione.

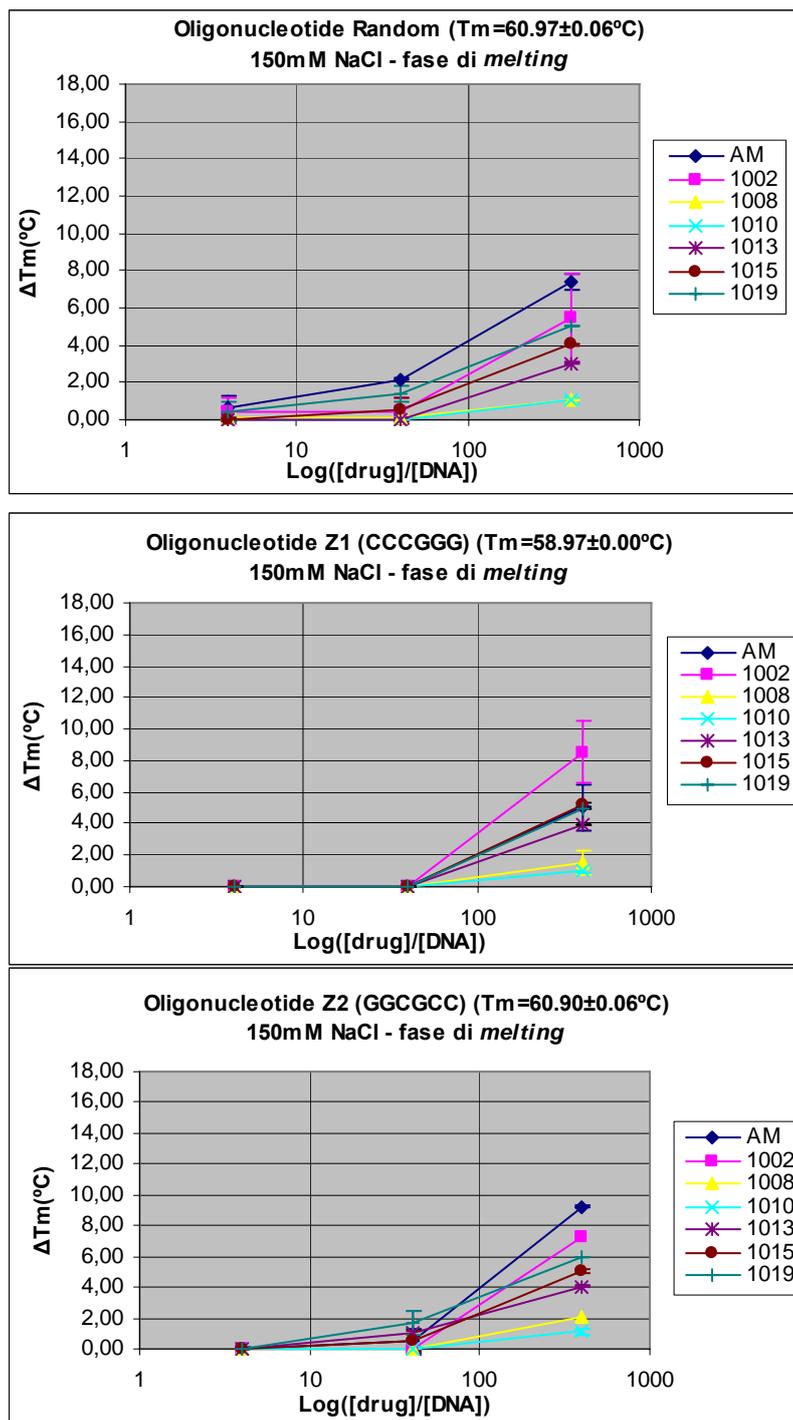


Fig. 3.17 ΔT_m (fase di *melting*) dei tre oligonucleotidi in presenza dei composti in esame, in ETN150.

Anche in queste condizioni (150 mM di NaCl) è stato confrontato il comportamento del composto 1002 nella fase di *melting*, rispetto quella di *annealing*. Come si può notare dai grafici in 3.18, anche in questo caso nella fase di *annealing* la variazione della T_m in presenza del composto diventa trascurabile, rispetto a quanto osservato nella fase di *melting*.

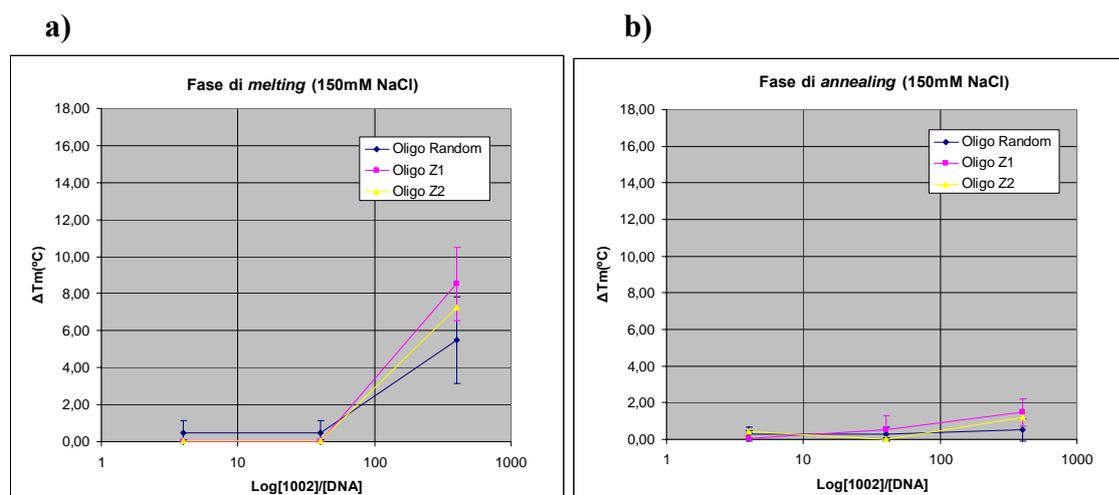


Fig. 3.18 ΔT_m della fase di *melting* (a) e di *annealing* (b) dei tre oligonucleotidi in presenza di 1002: oligo *random* (linea blu); oligo Z1 $d(\text{CCCGGG})_2$ (linea rosa), oligo Z2 $d(\text{GGCGCC})_2$ (linea gialla) in ETN150.

La ΔT_m dei leganti forti non selettivi, Ametantrone e composto 1002, è stata determinata anche a concentrazione salina ancora più elevata (500 mM NaCl) e i risultati ottenuti sono riportati in figura 3.19.

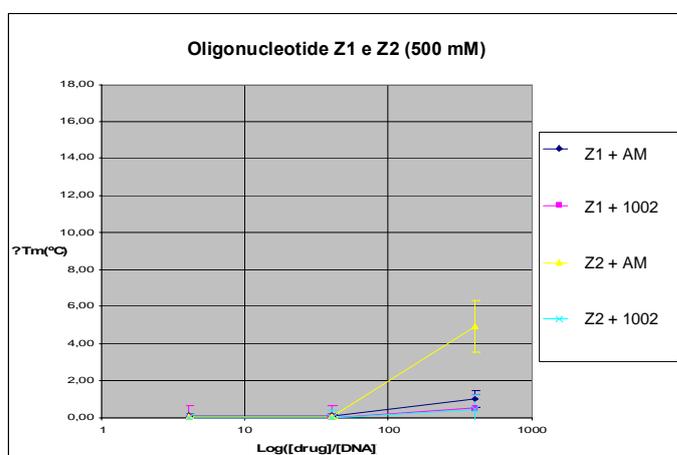


Fig. 3.19 ΔT_m (fase di *melting*) dell'oligonucleotide Z1 $d(\text{CCCGGG})_2$ e Z2 $d(\text{GGCGCC})_2$ in presenza di Ametantrone e 1002 in ETN500: Z1 e Ametantrone (linea blu); Z1 e 1002 (linea rosa); Z2 e Ametantrone (linea gialla); Z2 e 1002 (linea blu chiaro). T_m (oligo Z1) = $63.99 \pm 0.0^\circ\text{C}$; T_m (oligo Z2) = $66.45 \pm 0.93^\circ\text{C}$.

Come atteso aumentando ulteriormente la concentrazione di sale otteniamo valori di T_m ancora più alti; inoltre in queste condizioni le variazioni delle temperature di *melting* non sono significative ad alta concentrazione salina, solamente l'Ametantrone mostra ancora un'apprezzabile effetto nello stabilizzare la sequenza GGCGCC (Z2).

3.2.2.3 Studio dell'interazione del composto 1002 con il DNA tramite dicroismo circolare

Nei saggi di *melting* effettuati a concentrazione salina 20 mM, abbiamo potuto notare come il segnale di fluorescenza dell'oligonucleotide Z2 scompare in presenza di elevate concentrazioni del composto 1002, ad indicare una probabile precipitazione dell'acido nucleico. Per confermare tale fenomeno sono quindi stati effettuati alcuni studi di dicroismo circolare con tale composto.

Innanzitutto sono state eseguite delle titolazioni usando concentrazioni fisse di DNA a doppio filamento, di timo di vitello, con il composto 1002, in due diverse condizioni sperimentali: in tampone ETN contenente 20 mM e 150 mM di sale.

A titolo di esempio sono riportati in figura 3.20 gli spettri registrati nella titolazione effettuata in tampone ETN150.

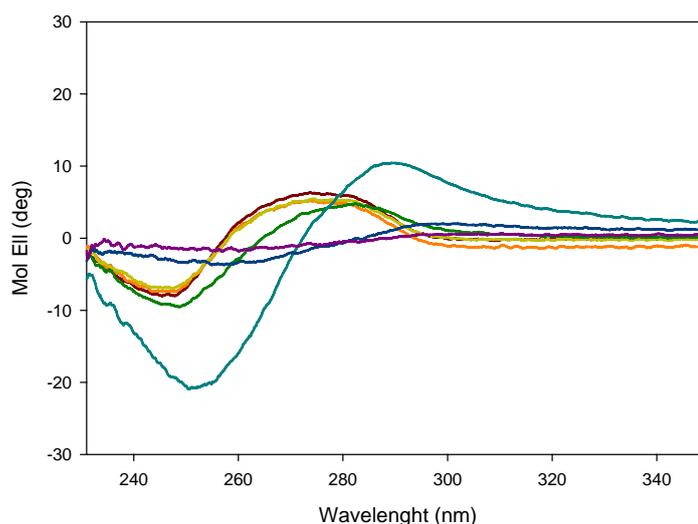


Fig. 3.20 Titolazione del DNA di timo di vitello con il composto 1002 in ETN150 (Tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM). Curva rossa: DNA 95 μ M; curva arancio: DNA 95 μ M + 1002 12 μ M; curva gialla: DNA 95 μ M + 1002 24.3 μ M; curva verde: DNA 95 μ M + 1002 49.6 μ M; curva azzurra: DNA 95 μ M + 1002 94.9 μ M; curva blu: DNA 95 μ M + 1002 166.1 μ M; curva viola: DNA 95 μ M + 1002 190.7 μ M.

Osservando gli spettri in figura 3.19, possiamo notare come la banda a circa 250 nm, diventi man mano più negativa all'aumentare della concentrazione di composto, ad indicare la formazione della forma Ψ del DNA. Abbiamo quindi costruito dei grafici correlando i valori di elitticità molare alla lunghezza d'onda relativa al minimo (250 nm) con i rapporti farmaco/DNA, in entrambe le condizioni sperimentali, riportati in figura 3.21.

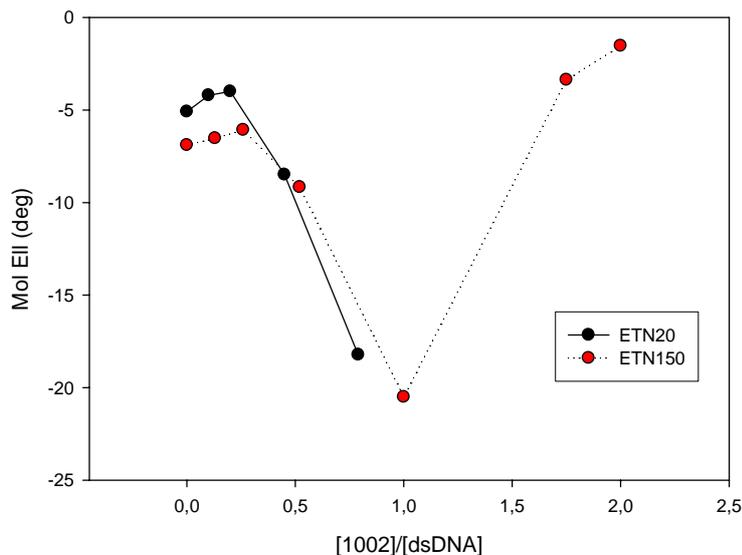


Fig. 3.21 Rappresentazione grafica dei valori di ellitticità molare a 250 nm, in funzione dei rapporti $[1002]/[dsDNA]$, misurati nella titolazione del dsDNA di timo di vitello ($95 \mu\text{M}$), con concentrazioni crescenti del composto 1002, in ETN20 e in ETN150.

Osservando i grafici ottenuti notiamo come ad entrambe le concentrazioni saline il segnale di ellitticità molare diminuisce all'aumentare della concentrazione di farmaco aggiunto, fino ad arrivare al valore minimo relativo al rapporto 1:1 farmaco/DNA. Inoltre, lavorando a concentrazioni saline maggiori (ETN150) abbiamo una parziale dissociazione del complesso, che ci permette di proseguire la titolazione, continuando ad aggiungere composto 1002 all'acido nucleico. Ai rapporti maggiori di 1 di farmaco/DNA è evidente un appiattimento dello spettro dicroico, con conseguente aumento del valore di ellitticità molare; tale fenomeno è probabilmente correlato alla precipitazione del DNA che avviene in seguito ad aggiunte elevate del composto in esame.

A questo punto si è passati ad apprezzare l'effetto del composto 1002 con l'oligonucleotide Z2 (sequenza palindromica "core": GGCGCC), che precipitava in seguito all'aggiunta di alte concentrazioni di 1002, negli esperimenti di *melting* effettuati in concentrazione salina 20 mM. Anche in questo caso è stata effettuata una titolazione a concentrazione fissa di oligonucleotide ($5 \mu\text{M}$), con concentrazioni crescenti di farmaco ed in figura 3.21 sono riportati i valori di ellitticità molare a 250 nm in funzione dei rapporti $[1002]/[\text{oligo Z2}]$. Al termine della titolazione si è inoltre registrato lo spettro dopo aver portato la concentrazione salina a 500 mM (punto giallo).

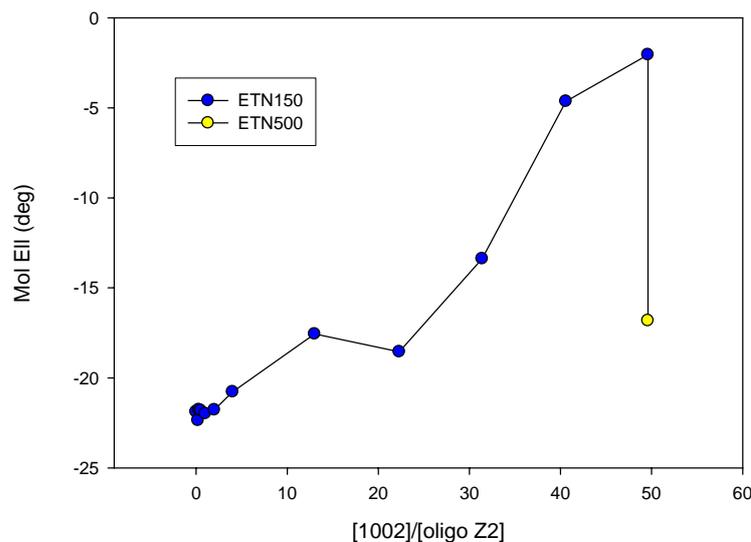


Fig. 3.22 Rappresentazione grafica dei valori di ellitticità molare a 250 nm, in funzione dei rapporti [1002]/[oligo Z2], misurati nella titolazione dell'oligonucleotide Z2 (5 μ M), con il composto 1002 a concentrazioni crescenti, in ETN150.

Come possiamo notare dal grafico in figura 3.22, non si riscontrano notevoli variazioni del segnale dicroico fino ad un rapporto [1002]/[oligonucleotide] di 4:1, ma a rapporti maggiori il segnale della banda negativa a 250 nm aumenta. Tale fenomeno ci indica chiaramente la precipitazione dell'acido nucleico, che inizia appunto ad un rapporto [farmaco]/[oligonucleotide] maggiore rispetto a quanto osservato per il dsDNA di timo di vitello, in quanto con un corto oligonucleotide abbiamo meno siti di legame a disposizione per il composto.

In seguito all'aggiunta di una quantità di NaCl tale da far salire la concentrazione salina fino a 500 mM, lo spettro dicroico ritorna a presentare un picco di massimo intorno ai 275 nm ed uno di minimo a 250 nm, probabilmente in seguito ad uno spostamento dell'equilibrio di complessazione del DNA.

I dati ottenuti con questi studi ci confermano quindi la capacità del composto 1002 di compattare il DNA nella forma ψ poco solubile, con evidente precipitazione del complesso, fenomeno osservato sia nei saggi di *unwinding*, che nei saggi di *melting* a bassa concentrazione salina.

3.2.3 STUDIO DELL'INTERFERENZA NEI CONFRONTI DI ENZIMI CHE AGISCONO SUL DNA

3.2.3.1 Saggi di inibizione dell'enzima Topoisomerasi II

Le Topoisomerasi sono enzimi ubiquitari, essenziali per la sopravvivenza degli organismi procariotici ed eucariotici, richiesti in ogni step metabolico che altera la topologia del DNA (replicazione, trascrizione, meccanismi di riparo, etc.). Questi enzimi sono infatti capaci di interconvertire tra loro topoisomeri del DNA ed esplicano la loro funzione alterando il numero di legame del DNA nelle cellule viventi, attraverso una transiente rottura e risaldatura dei legami fosfodiesterici del doppio filamento. In particolare la Topoisomerasi II umana è un enzima essenziale per la proliferazione delle cellule eucariotiche e costituisce il bersaglio di molti farmaci antineoplastici.

Si possono utilizzare due diversi tipi di saggio per valutare la capacità dei composti di interferire con l'enzima: il saggio di inibizione della decatenazione e l'inibizione del superavvolgimento.

3.2.3.1.1 Saggi di inibizione dell'attività di decatenazione dell'enzima Topoisomerasi II

E' possibile valutare in vitro l'attività dell'enzima, fornendogli come substrato del DNA kinetoplast (kDNA), che consiste in un elevato numero di *minicircles* di DNA, chiusi covalentemente, interconnessi o catenati tra loro; ogni gruppo consiste in circa 5000 *minicircles* di 2.5 kbasi ognuno. La Topoisomerasi catalizza, in presenza di ATP, la rottura del doppio filamento di un *minicircle*, permettendo il passaggio del DNA duplex di una seconda molecola attraverso la rottura; in tal modo si ottiene la loro successiva liberazione. I *minicircles* rilasciati dal kDNA, ad opera della Topo II, possono essere facilmente visualizzati attraverso elettroforesi in gel d'agarosio, infatti a causa delle sue dimensioni, il DNA nella forma catenata non può entrare in un gel d'agarosio all'1%, quindi rimarrà nei pozzetti, mentre i *minicircles* rilasciati dall'enzima, possono migrare nel gel originando una banda distinta.

In figura 3.23 sono riportati i gel ottenuti, dal saggio effettuato per tutti i composti in esame.

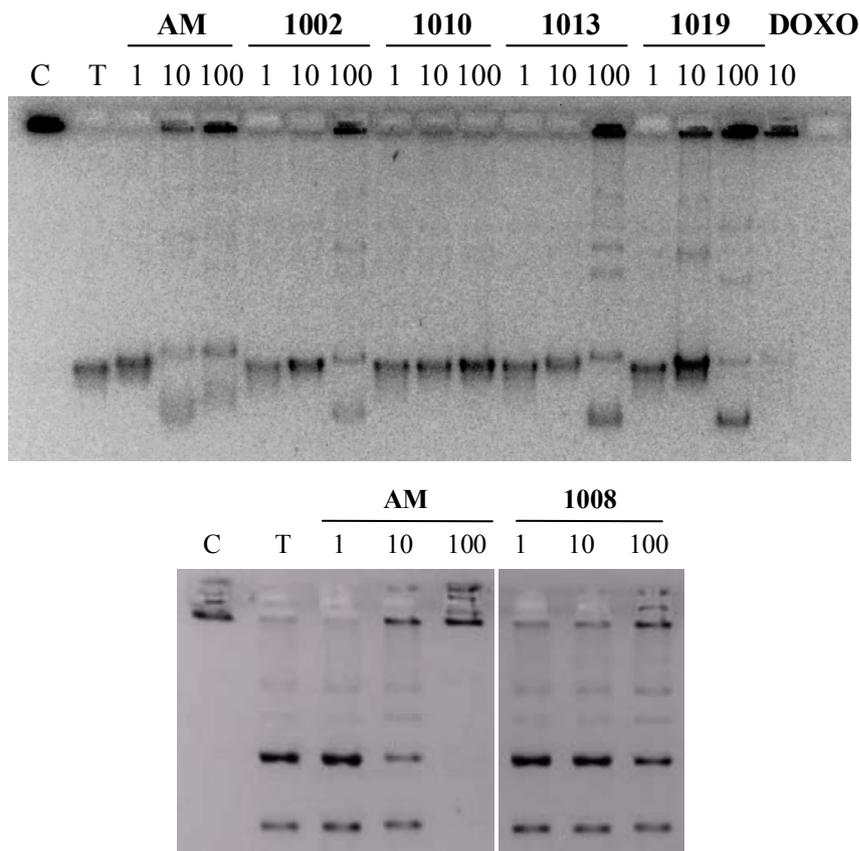


Fig. 3.23 Saggio di inibizione della decatenazione del kDNA da parte dell'enzima Topoisomerasi II, da parte dei composti in esame. Gel di agarosio all'1% in TBE1X (Tris 89 mM, Acido borico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0), corso a 2V/cm ON. C=0.18 μ g di kDNA; T= 0.18 μ g di kDNA+ 0.01 Udi enzima Topo II.

Osservando i gel ottenuti, ripetuti più volte per alcuni composti, possiamo osservare come il controllo Ametantrone inizi ad inibire parzialmente l'attività enzimatica alla concentrazione 10 μ M e totalmente a 100 μ M. Anche il 1019 ha un comportamento simile, i composti 1013 e 1002 inibiscono sostanzialmente la decatenazione, ma solo alla concentrazione più elevata, mentre il 1008 inibisce l'enzima solo parzialmente a 100 μ M. Infine il composto 1010 non sembra interferire con l'attività della Topoisomerasi II.

In questo tipo di saggio non è stato possibile esaminare il 1015, per mancanza di sufficiente composto.

3.2.3.1.2 Saggi di inibizione dell'attività di rilassamento dell'enzima Topoisomerasi II

Il secondo tipo di saggio per studiare l'inibizione della Topoisomerasi II è quello di rilassamento, nel quale viene valutata la capacità dell'enzima di rilassare il plasmide pBR322 superavvolto in presenza di concentrazioni crescenti di farmaci. Per tutti i composti gli esperimenti sono stati effettuati parallelamente in presenza e assenza di enzima (figura 3.23), allo scopo di discriminare l'effetto dell'inibizione dell'enzima dal rilassamento dovuto al fenomeno di intercalazione stessa del composto (*unwinding*).

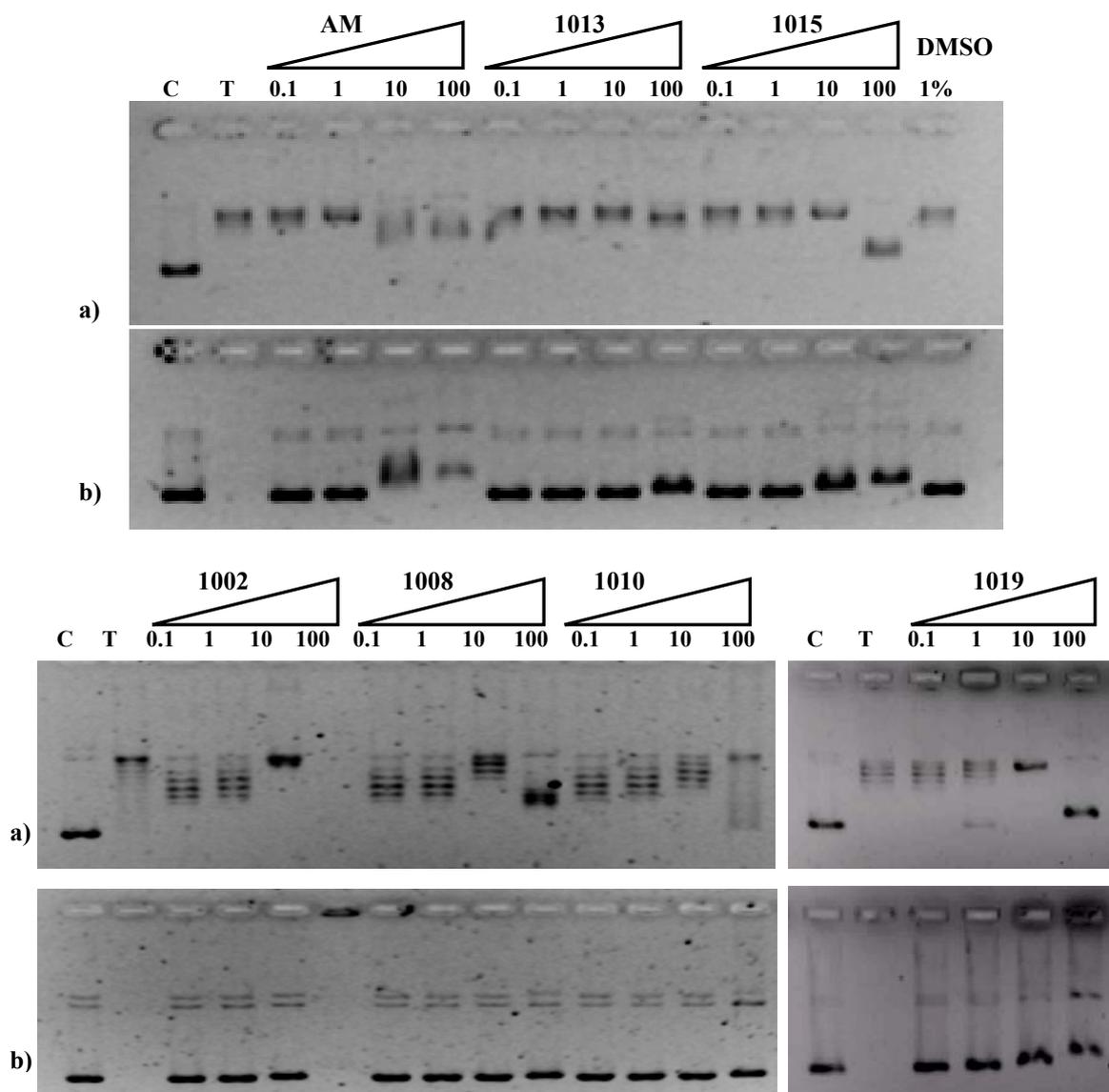


Fig. 3.24 Saggio di inibizione del rilassamento del pBR322 da parte dell'enzima Topoisomerasi II, da parte dei composti in esame. Gel di agarosio all' 1% in TBE1X (Tris 89 mM, Acido borico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0), corso a 2V/cm ON. C = 0.10 μg di plasmide pBR322 linearizzato; T = 0.10 μg di plasmide pBR322 rilassato+ 0.01 U di enzima Topo II. **a)** Reazione con TopoII; **b)** Reazione senza TopoII (*unwinding assay*).

Come si può osservare nei gel riportati, anche in questo tipo di saggio, in presenza di una concentrazione 10 μM del nostro composto di riferimento Ametantrone, abbiamo un'inibizione della capacità di rilassamento dell'enzima; tale inibizione probabilmente è maggiore rispetto a quanto emerge dal gel e sarebbe ancor più evidente a 100 μM di composto, se non intervenisse a tali concentrazioni l'effetto intercalativo dell'Ametantrone stesso che determina uno svolgimento della doppia elica (effetto già osservato nei precedenti saggi di *unwinding* e qui confermato).

Tra i nuovi composti esaminati, quelli che sono maggiormente in grado di inibire l'enzima alla concentrazione più elevata (100 μM), sono il 1008, 1015 e 1019; in particolar modo per il 1015 e 1019, come per l'Ametantrone, l'effetto è in parte "mascherato" dall'intercalazione del composto, altrimenti l'inibizione potrebbe iniziare già ad una concentrazione minore. Per quanto riguarda il 1013 invece, l'effetto sull'enzima è molto debole e in questo caso anche la componente intercalativa è minore; mentre il composto 1010 non sembra inibire il rilassamento. Infine, un fenomeno particolare viene osservato per il composto 1002, come già emerso nei precedenti saggi di *unwinding*: alla concentrazione di 100 μM non osserviamo più una banda relativa al DNA corso nel gel, in quanto il composto fa precipitare l'acido nucleico nel pozzetto.

3.2.4 SAGGI DI CITOTOSSICITÀ

La citotossicità degli antrachinoni in esame è stata testata su tre diverse linee cellulari a disposizione: cellule Jurkat, cellule HL60 e cellule Hela. Anche in questo caso, la vitalità cellulare in presenza dei composti è stata stimata attraverso il saggio colorimetrico dell'MTT, ripetuto in triplicato, utilizzando come controllo positivo tossico per le cellule il composto di riferimento ametantrone. Nelle tabelle 3.2, 3.3 e 3.4 sono riportati i valori di EC_{50} misurati a due diversi tempi di incubazione, per le tre diverse linee cellulari.

Cellule Jurkat		
Composto	EC₅₀(48h) μM	EC₅₀(72h) μM
AM	4.0 \pm 1.4	0.4 \pm 0.2
1002	51.8 \pm 6.4	43.0 \pm 15.5
1008	36.3 \pm 7.3	33.0 \pm 9.7
1010	100.0	74.5 \pm 12.4
1013	>100	64.0 \pm 2.8
1019	>100	>100

Tab. 3.2 Valori di EC₅₀ degli antrachinoni in esame nei confronti delle cellule Jurkat, dopo 48 e 72 ore di incubazione.

Cellule HL60	
Composto	EC₅₀(72h) μM
AM	0.3 \pm 0.1
1002	29.3 \pm 4.6
1008	32.5 \pm 7.8
1010	89.0 \pm 12.7
1013	75.0 \pm 14.1
1015	44.7 \pm 10.9

Tab. 3.3 Valori di EC₅₀ degli antrachinoni in esame nei confronti delle cellule HL60, dopo 72 ore di incubazione.

Cellule HeLa		
Composto	EC₅₀(48h) μM	EC₅₀(72h) μM
AM	3.7 \pm 1.3	0.9 \pm 0.1
1002	93.7 \pm 6.5	83.0 \pm 17.0
1008	97.0 \pm 14.7	66.5 \pm 14.5
1010	>100	>100
1013	>100	>100
1019	>100	>100

Tab. 3.4 Valori di EC₅₀ degli antrachinoni in esame nei confronti delle cellule HL60, dopo 48 e 72 ore di incubazione.

Nessuno dei nuovi antrachinoni esaminati sembra avere una elevata citotossicità per le linee cellulari considerate. I composti che comunque sembrano avere una maggiore citotossicità residua sono il 1002 e 1008, in particolar modo nei confronti della cellule Jurkat e HL60. Per motivi di disponibilità il composto 1015 è stato testato solo su questa ultima linea cellulare, presentando anch'esso una tossicità residua.

3.2.5 DETERMINAZIONE SPERIMENTALE DEL COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE

Data la non fluorescenza dei composti in esame, non è stato possibile effettuare saggi di *uptake* cellulare, per cui si sono determinati i valori di logP sperimentali allo scopo di avere un indice della loro potenzialità di attraversare le membrane cellulari. I valori di logP determinati sono riportati in tabella 3.5.

Composto	LogP sperimentale
AM	0.36 ± 0.07
1002	0.30 ± 0.15
1008	1.30 ± 0.08
1010	0.78 ± 0.11
1013	-0.41 ± 0.13
1019	-1.08 ± 0.05

Tab. 3.5 Valori di logP sperimentali dei diversi composti.

Dai valori di logP in tabella possiamo considerare potenzialmente in grado di attraversare le membrane cellulari, i composti Ametantrone, 1002, 1008 e 1010, che effettivamente sono gli antrachinoni tossici (nel caso del controllo Ametantrone) o comunque con una tossicità residua. I composti 1013 e 1019, presentano un logP negativo e quindi probabilmente a causa delle loro caratteristiche strutturali non sono in grado di entrare nelle cellule e questo potrebbe giustificare la loro non tossicità. Purtroppo non è stato possibile effettuare la misura per il 1015, per mancanza di composto, ma è ipotizzabile che anch'esso presenti un logP negativo.

3.3 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questa seconda parte del progetto ci siamo occupati dello studio di alcuni peptidil-antrachinoni opportunamente disegnati per interagire con sequenze specifiche di DNA, allo scopo di ottenere un *targeting* selettivo verso sequenze oncogeniche, che rappresenterebbe quindi un'importante vantaggio nella terapia del cancro grazie ad una diminuzione della tossicità e degli effetti indesiderati.

In particolare l'esame di questi nuovi composti è stato focalizzato sulla verifica della loro specificità di sequenza, per confermare gli studi teorici effettuati dal Prof. Gresh dell'Università di Parigi, che indicano una elevata specificità di legame di una nuova serie di peptidil-antrachinoni derivati del Mitoxantrone, verso sequenze palindromiche del DNA di particolare interesse farmacologico. E' stata quindi testata la loro capacità di riconoscere preferenzialmente le sequenze palindromiche (GGCGCC)₂ e (CCCGGG)₂, frequenti in molti oncogeni.

L'analisi dell'intercalazione al DNA tramite saggi di *unwinding* ha permesso di dividere i composti in tre famiglie: intercalanti forti, intercalanti medi ed intercalanti deboli. I composti 1002 e 1019 appartengono alla prima famiglia, i composti 1013 e 1015 alla seconda ed infine il 1008 ed il 1010 sono compresi nella terza famiglia. Il composto 1002 presenta un effetto particolare alle elevate concentrazioni testate; infatti esso lega il DNA causandone la precipitazione, fenomeno evidente sia nei saggi di *unwinding* che nei saggi di *Contact Quenching* e confermato tramite studi di dicroismo circolare. E' ipotizzabile che la configurazione del 1002 attivo nel legame al DNA sia molto diversa dalla configurazione attiva del suo bioisostere 1015. Questa differenza è attribuibile ai lunghi *linker* alchilici che possono interagire l'uno con l'altro in soluzione, così come nel complesso con DNA.

I saggi di *unwinding* sono in grado di descrivere il comportamento dei composti nei confronti del DNA a doppio filamento caratterizzato dalla presenza di diverse sequenze, ma non ci fornisce informazioni riguardo la specificità di sequenza. La specificità di sequenza è stata invece valutata con saggi di *Contact Quenching*, i quali sono stati effettuati a tre differenti forze ioniche per valutare il contributo elettrostatico al legame. A titolo riassuntivo in figura 3.25 sono riportate graficamente le variazioni delle temperature di *melting* (ΔT_m) per i tre oligonucleotidi (gli oligonucleotidi Z1 e Z2

contenenti le sequenze di interesse e l'oligonucleotide *random*), in tampone TE (EDTA 1 mM, Tris 10 mM, pH 7.5) contenente rispettivamente una concentrazione salina di 20 mM (figura a) e 150 mM (figura b), al rapporto [farmaco]/[oligonucleotide]=400.

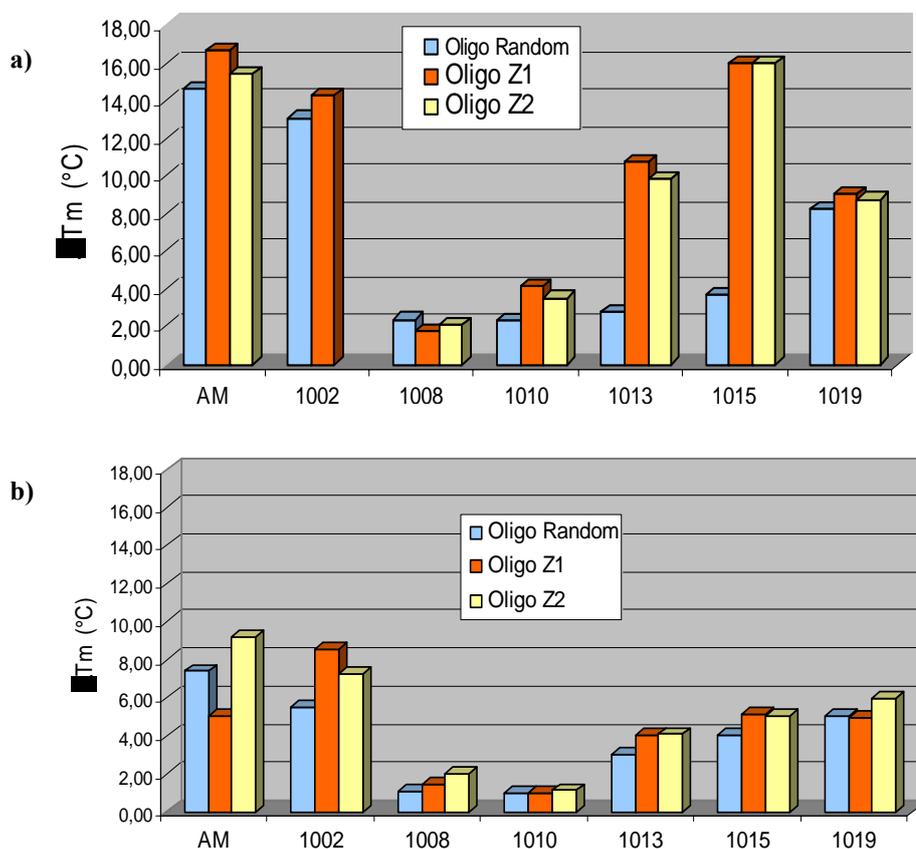


Fig. 3.25 Variazioni delle temperature di *melting* dei 3 diversi oligonucleotidi, in presenza dei composti in esame al rapporto [farmaco]/[oligonucleotide]=400, in ETN20 (a) e in ETN150 (b).

E' evidente come gli antrachinoni si comportino in modo differente rispetto le diverse sequenze oligonucleotidiche e i dati ottenuti ci hanno permesso di raggruppare i nuovi derivati antrachinonici in tre famiglie diverse: leganti non-selettivi (Ametantrone, 1002 e 1019), leganti selettivi (1013 e 1015) e leganti deboli (1008 e 1010).

Tenendo presente le strutture dei composti (tabella 3.1), possiamo notare che l'azoto libero in catena laterale dei nuovi derivati peptidici conferisce la selettività verso la sequenza $(GGCGCC)_2$ come atteso. Infatti 1013 e 1015, leganti selettivi, che portano un'ammina secondaria in catena laterale sembrano preferire le sequenze Z1 e Z2 in tutte le condizioni saline testate. Infatti, possono essere classificati come forti leganti riguardo le loro specifiche sequenze, ma leganti poveri quando viene esaminato il legame nei confronti di una sequenza casuale. Questa differenza spiega anche il loro

comportamento da *intercalanti medi* verso il DNA plasmidico. La famiglia dei leganti deboli presenta un atomo di ossigeno in catena laterale: possiamo dedurre perciò che un atomo di ossigeno in catena laterale non favorisce l'intercalazione in queste condizioni per nessuna sequenza considerata. Infine i leganti non-selettivi mostrano caratteristiche chimiche strutturali diverse sia nella catena *linker*, sia per quanto riguarda la catena peptidica. Infatti l'Ametantrone presenta l'azoto in catena laterale libero, senza alcun peptide coniugato, mentre il composto 1002 presenta una catena *linker* alchilica (no azoto) e il dipeptide Gly-Lys. La catena alchilica conferisce quindi un'abilità significativa di legare il DNA *random*. In altre parole, può essere dedotto che, l'azoto libero nel *linker* è necessario per la specificità quando il peptide Gly-Lys è coniugato alla catena laterale (confronto 1002 con 1015). Infine il composto 1019 mostra due residui di glicina: uno è esterificato, formando la così detta catena peptidica come il 1013, mentre l'altro è collegato all'azoto in catena laterale attraverso un legame ammidico: in questo caso l'azoto non è libero e la specificità viene persa (confronto 1019 e 1013).

Come già accennato, il saggio è stato effettuato in differenti condizioni di forza ionica per comprendere meglio il contributo della carica della catena laterale degli antrachinoni.

Osservando questi ultimi grafici è evidente, come atteso, che la variazione della temperatura di melting in ETN150 sia più bassa rispetto a quanto osservato in ETN20; tuttavia, per quanto riguarda i leganti selettivi, la variazione di T_m per l'oligonucleotide *random* è simile ad entrambe le concentrazioni saline ed il valore è molto basso, come già osservato. Invece, il ΔT_m per Z1 e Z2 è ridotto a metà (1013) o a un terzo (1015) quando viene usato il tampone con 150 mM di sale ed il valore è simile a quanto trovato per le sequenze oligonucleotidiche *random*. Questo significa chiaramente che il contributo elettrostatico della glicina ed in particolar modo della lisina nel solco maggiore del DNA giocano un ruolo importante nel conferire la specificità di sequenza, come predetto dai calcoli teorici del Prof. Gresh.

Infine è stato testato l'effetto dei composti su un enzima che agisce sul DNA, la Topoisomerasi II, bersaglio di molti antitumorali. In particolare sono stati valutati due diversi tipi di attività enzimatica: la decatenazione ed il rilassamento plasmidico. In entrambi i casi il composto che si è rivelato maggiormente in grado di interferire con

l'enzima è il 1019, con attività paragonabile al controllo Ametantrone per quanto riguarda l'effetto sulla decatenazione enzimatica. Anche il 1013 e il 1015 inibiscono in maniera significativa l'enzima alle concentrazioni più elevate, mentre l'attività è un po' inferiore, ma ancora presente, per il 1008. Per quanto riguarda il composto 1002, anch'esso inibisce la decatenazione a 100 μM , ma nel saggio di rilassamento precipita il DNA plasmidico nel pozzetto. Infine il composto 1010 non si è rivelato in nessun caso attivo sull'enzima.

Per concludere, possiamo affermare come l'incoraggiante specificità di legame per sequenze specifiche, riscontrata per i composti 1013 e 1015, in accordo con le predizioni teoriche, renda questi nuovi peptidil-antrachinoni nuovi potenziali antitumorali. E' importante sottolineare però le deludenti caratteristiche farmacocinetiche, riscontrate negli studi cellulari, che rendono i composti poco citotossici probabilmente a causa della loro bassa capacità di attraversare le membrane. Per migliorare tali proprietà sarà importante trovare sistemi di *delivery* adatti per tali composti, nonché approfondire gli studi per cercare nuovi derivati ancor più attivi, mantenendo la selettività di sequenza.

4. PARTE SPERIMENTALE

4.1 MATERIALI

4.1.1 MATERIALI PER GEL ELETTROFORESI

Per i gel di poliacrilammide, l'acrilammide e la N,N bisacrilammide utilizzate sono state fornite dalla Fluka, mentre ammonio persolfato e TEMED, utilizzati per accelerare la polimerizzazione dell'acrilammide, sono forniti rispettivamente dalla Sigma e dalla Fluka.

Per i gel di agarosio è stato utilizzato agarosio fornito dalla ditta BioRad.

Il *gel loading buffer* utilizzato come tracciante nella corsa elettroforetica è costituito da glicerolo al 30% (Sigma), Tris 50 mM, EDTA1 mM, 0.2% di blu di bromofenolo (Amersham) e 0.2% di xilene cianolo (Amersham).

I gel di poliacrilammide sono stati colorati alla fine della corsa con il colorante Sybr Green II (Sigma), utilizzando una soluzione ottenuta diluendo 1:10000 lo stock commerciale.

L'immagine delle bande di acido nucleico nel gel vengono quindi rilevate analizzando il gel al *Phosphoimager* (Amersham).

Alla fine della corsa i gel di agarosio sono stati trattati con il colorante etidio bromuro in concentrazione 50 µg/ml, oppure aggiunto direttamente al tampone di corsa e nel gel stesso alla stessa concentrazione; questo permette di rilevare la presenza di DNA, in quanto il complesso che forma intercalandosi al DNA a doppia elica è molto più fluorescente rispetto al colorante libero e viene facilmente rivelato illuminando il gel con una lampada UV a 302 nm: il colorante intercalato emette luce a 590 nm. L'immagine del DNA nel gel viene acquisita utilizzando l'apparato Gel Doc 1000 della BioRad.

4.1.2 REAGENTI GENERALI

- *Acido borico*: H_3BO_3 , PM=61.83, fornito dalla Sigma
- *Acido cloridrico*: HCl , PM=36.461, fornito dalla Carlo Erba
- *APS (Ammonio persolfato)*: $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, PM=228.20, fornito dalla Sigma
- *ATP (Adenosin 5' Trifosfato)*: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2$, PM=551.1, fornito dalla Sigma
- *Blu di bromofenolo*: $\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{BrO}_4\text{S}$, PM=669.99, fornito dalla Sigma
- *BSA (Albumina sierica bovina)*: proteina con PM=66000, fornita dalla Sigma
- *Cloruro di magnesio esaidrato*: $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, PM=203.03, fornito dalla Fluka
- *Cloruro di potassio*: KCl , PM=74.55, fornito dalla Prolabo
- *Cloruro di sodio*: NaCl , PM=58.44, fornito dalla Fluka
- *DMSO (dimetile solfossido)*: $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$, PM=78.13, fornito dalla Riedel-de Haen
- *DTT (1.4-ditio-treitolo)*: $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{S}_2\text{O}_2$, PM=154.25, fornito dalla Sigma
- *EDTA (Etilendiamminatetracetato disodiidrato)*: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2\text{H}_2\text{O}$, PM=372.24, fornito dalla Fluka
- *Etidio bromuro*: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}_3$, PM=94.3, fornito dalla Sigma
- *Glicerolo*: $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, PM=92.10, fornito dalla Fluka
- *Glicina*: $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, PM=75.07, fornito dalla Fluka
- *Idrossido di sodio*: NaOH , PM=40.00, fornito dalla Sigma
- *Magnesio perchlorato*: $\text{Mg}(\text{ClO}_4)$, PM=223.21, fornito dalla Sigma
- *MTT (3,(4,4-dimetiltiazolo)-2,5 difenil-tetrazolo bromuro)*: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrN}_5\text{S}$, PM=414.32, fornito dalla Sigma
- *SDS (Sodio dodecil solfato)*: $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$, PM=288.03, fornito dalla Fluka
- *TEMED (N,N,N',N'Tetrametiletildiammina)*: $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, PM=116.2, fornito dalla Fluka
- *Tris (Idrossimetilamminometano)*: $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, PM=121.1, fornito dalla Sigma
- *Xilene cianolo*: $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}_2$, PM=538.6, fornito dalla Sigma.

4.1.3 SOLUZIONI TAMPONE

- TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, NaCl 20mM), pH 7.4
- TNMg20 (Tris 10mM, NaCl 20mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM), pH 7.4
- TNMg150 (Tris 10mM, NaCl 150mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM), pH 7.4
- TNMg80 (Tris 10mM, NaCl 80mM, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ 1 mM), pH 7.4

- Buffer glicina 0.1 M, pH 3.0
- Buffer glicina 0.1 M, pH 7.5
- TBE (Tris 89 mM, Acido Borico 89 mM, EDTA 2 mM a pH 8.0)
- ETN20 (EDTA 1 mM, TRIS 10 mM, NaCl 20 mM), pH 7.5
- ETN150 (EDTA 1 mM, TRIS 10 mM, NaCl 150 mM), pH 7.5
- ETN500 (EDTA 1 mM, TRIS 10 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5

4.1.4 COMPOSTI

4.1.4.1 Chinoloni

I 2-fenilchinoloni (prima serie: WRNA1, WRNA2, WRNA3, WRNA4, WRNA5, WRNA6, WRNA8; seconda serie: WRNA9, WRNA10, WRNA11, WRNA12, WRNA13, WRNA14, WRNA15, WRNA16, WRNA17, WRNA18, WRNA19, WRNA20, WRNA21, WRNA22, WRNA23, FQ1 e il controllo WM5) e i 6-amminochinoloni (WP7-5, W5AM1, W5AM) esaminati sono stati sintetizzati dal gruppo della Prof.ssa Cecchetti e Prof.ssa Tabarrini del Dipartimento di Chimica e Tecnologia del farmaco dell'Università di Perugia. Tali composti sono stati forniti in forma non idrata, sottoforma di basi.

Le soluzioni dei farmaci sono state preparate sciogliendo una piccola quantità dei composti, sotto forma di polvere, in un volume di H₂O o DMSO (nel caso del WRNA1, dei chinoloni della seconda serie e dei 6-amminochinoloni). Si sono quindi determinate le concentrazioni degli stocks per via spettrofotometrica (spettrofotometro UV/VIS Spectrometer Lambda 20, Perkin Elmer), previa costruzione di opportune rette di taratura, per determinare i coefficienti di estinzione molare, che sono riportati in tabella 2.7 e tabella 2.13.

Le soluzioni di lavoro dei farmaci, alle concentrazioni desiderate, sono state quindi ottenute diluendo gli stocks in acqua, eccetto per i 6-amminochinoloni che sono stati diluiti in Tris 10 mM, pH 7.5.

Le strutture chimiche dei 2-fenilchinoloni sono riportate in tabella 2.2, mentre quelle dei 6-amminochinoloni sono riportate in tabella 2.3.

4.1.4.2 Acridoni

Gli acridoni esaminati (composti W4e, W4i, W4g14, W4h, W4g13, W4g, W4g12, W4g19, W4g3) sono stati sintetizzati dal gruppo della Prof.ssa Cecchetti e Proff.ssa Tabarrini del Dipartimento di Chimica e Tecnologia del farmaco dell'Università di Perugia.

Le soluzioni dei farmaci sono state preparate sciogliendo una quantità nota dei composti, sotto forma di polvere, in un determinato volume di DMSO, pesando le esatte quantità di polvere e solvente utilizzate, per poter calcolare così la concentrazione della soluzione ottenuta. Per il composto W4i è stata anche costruita l'opportuna retta di taratura, che ha permesso di determinare il coefficiente di estinzione molare ($\epsilon_{422\text{nm}} = 4762 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Le soluzioni di lavoro dei farmaci, alle concentrazioni desiderate, sono state quindi ottenute diluendo gli stocks in acqua.

Le strutture chimiche dei composti in esame sono riportate in tabella 2.4.

4.1.4.3 Derivati antrachinonici

I derivati antrachinonici 1002, 1008, 1010, 1013, 1015, 1019 sono stati sintetizzati dal gruppo del Prof. Zagotto del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova. Le soluzioni dei farmaci sono state preparate sciogliendo una piccola quantità dei composti, sotto forma di polvere, in un volume di DMSO. Si sono quindi determinate le concentrazioni degli stocks per via spettrofotometrica (spettrofotometro UV/VIS Spectrometer Lambda 20, Perkin Elmer), utilizzando come coefficiente di estinzione molare quello dell'Ametantrone ($\epsilon_{626\text{nm}} = 5400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Le soluzioni di lavoro dei farmaci, alle concentrazioni desiderate, sono state quindi ottenute diluendo gli stocks in acqua.

Le strutture chimiche dei composti in esame sono riportate in tabella 3.1.

I derivati peptidil-antrachinonici della serie mono-sostituita (composti 7, 19, 31, 36, 46, 107 e 123) e della serie di-sostituita (composti 542, 543, Z6, Z7, 721, 722, 723, CSA2, CSA8, Z8 e Z9) sono stati sempre sintetizzati dal gruppo del Prof. Zagotto del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Padova. Le soluzioni dei farmaci sono state preparate sciogliendo una quantità nota dei composti, sotto forma di polvere, in un determinato volume di DMSO (per i composti 19, 31, 36, 46, 107, 123,

542, 543, 721 722, 723, CSA2 e CSA8) o di acqua (per i composti 7, Z6, Z7, Z8 e Z9), pesando le esatte quantità di polvere e solvente utilizzate, per poter calcolare così la concentrazione della soluzione ottenuta.

Le soluzioni di lavoro dei farmaci, alle concentrazioni desiderate, sono state quindi ottenute diluendo gli stocks in acqua.

Le strutture chimiche dei composti in esame sono riportate in tabella 2.5 e in tabella 2.6.

4.1.5 ACIDI NUCLEICI

4.1.5.1 TAR-RNA

Le sequenze nucleotidiche corrispondenti al TAR, utilizzate per i saggi EMSA e per gli studi di dialisi, sono state fornite dalla ditta Metabion (Germania), in forma non protetta, e dalla ditta Dharmacon Research Inc. (USA), in una forma protetta in posizione 2' da un gruppo 2'-bis(acetossietossi)-metil etere (2'ACE). La protezione in 2' serve a stabilizzare la struttura del RNA in modo che la sua integrità risulti molto elevata sia in soluzione, che nello stato liofilizzato.

Per quanto riguarda il TAR protetto, prima di effettuare gli esperimenti è stato necessario deproteggere l'acido nucleico, come indicato dal fornitore, ovvero usando un tampone acido acetico-tetrametiletilendiamina (TEMED) a pH 3.8, ad una temperatura di 60°C per 30'. Le componenti volatili vengono poi evaporate in SpeedVac e l'RNA deproteetto risospeso successivamente in una soluzione di TE a pH 8.

In alcuni casi l'RNA è stato purificato attraverso un gel denaturante di poliacrilammide al 16% con urea; estraendo la banda relativa all'oligonucleotide purificato dopo la corsa e determinandone la concentrazione allo spettrofotometro.

Le sequenze di RNA-TAR utilizzate sono state:

1. Sequenza **T1**: 5'- GGC AGA UCU GAG CCU GGG AGC UCU CUG CC-3'

(29 basi; PM=9291.6; $\epsilon_{260nm} = 268900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Questa sequenza in soluzione si organizza strutturalmente per dare il TAR *wild type* (figura 2.5).

Prima dell'uso il TAR *wild-type* viene fatto strutturare correttamente scaldando la soluzione ad 85 °C per 5' (denaturazione) e lasciandola poi raffreddare a temperatura ambiente, in modo da far appaiare correttamente le basi complementari (*annealing*).

2. Sequenza T2: 5'-GGC AGA UCU GAG CCU G-3'

(16 basi; PM=5137.2; $\epsilon_{260nm} = 154900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Questa sequenza rappresenta le prime 16 basi del TAR *wild type*, comprendenti la regione del *bulge*, disegnate affinché l'appaiamento con la sequenza T3 dia origine ad una struttura del TAR priva del *loop*.

3. Sequenza T3: 5'-CAG GCU CUC UGC C-3'

(13 basi; PM=4053.5; $\epsilon_{260nm} = 111200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Questa sequenza rappresenta il TAR dalla base 18 alla base 29, con una sostituzione della G in posizione 18 con una C. Tale sequenza è stata disegnata affinché l'appaiamento con la sequenza T2 dia origine ad una struttura del TAR priva del *loop*.

4. Sequenza T4: 5'-CAG GCU CAG AUC UGC C-3'

(16 basi; PM=5057.1; $\epsilon_{260nm} = 147900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Questa sequenza rappresenta il TAR dalla base 18 alla base 29, con una sostituzione della G in posizione 18 con una C; inoltre sono presenti i tre nucleotidi AGA che vanno ad appaiarsi a livello del *bulge*. Tale sequenza è stata disegnata affinché l'appaiamento con la sequenza T2 dia origine ad una struttura del TAR priva sia del *loop* che del *bulge*.

Per ottenere le strutture di interesse, le sequenze sono state opportunamente miscelate in concentrazione equimolare, in tampone TNMg20, denaturate scaldando la soluzione ad 85°C per 5' e poi lasciate strutturare correttamente mediante lento raffreddamento. L'appaiamento delle sequenze T2 e T3 permette di ottenere l'RNA TAR *bulge*, analogo alla struttura del TAR *wild type* senza il *loop*. L'appaiamento di T2 con T4 permette invece di ottenere la struttura dsTAR, ovvero l'analogo del TAR *wild type* privo sia del *bulge* che del *loop* (figura 4.1).

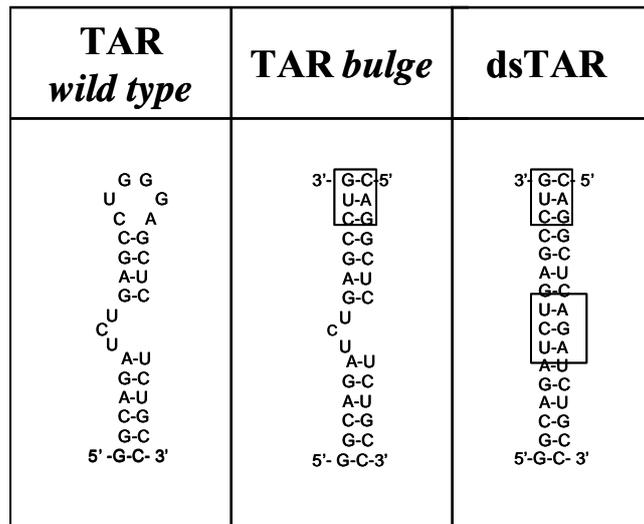


Fig. 4.1 Strutture del TAR *wild type* e dei mutanti TAR *bulge* e dsTAR.

Per i saggi di *Fluorescence Quenching* è stata utilizzata una sequenza di RNA corrispondente al TAR *wild type*, marcata all'estremità 3' con il gruppo Dabcyl (N-4'-carbossi-4-(dimetilamino)-azobenzene) fornita dalla ditta Operon (29 basi; PM=9753; $\epsilon_{260\text{nm}} = 272678.2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La molecola Dabcyl (DAB), la cui struttura chimica è riportata in figura 5.2, si comporta come un "dark quencher", per cui è in grado di smorzare la fluorescenza emessa da fluorofori nel *range* delle lunghezze d'onda comprese tra il blue e il rosso. La lunghezza d'onda del massimo di assorbimento del DAB è 478 nm e l'effetto "quencher" sembra essere in parte indipendente dalla sovrapposizione degli spettri. Il motivo dell'effetto "quencher" universale del DAB non è completamente conosciuto e potrebbe essere il risultato della formazione di un complesso tra il fluoroforo ed il *quencher* (134). Questo eccellente potere di spegnimento della fluorescenza potrebbe rendere il gruppo DAB disponibile per un vasto *range* di fluorofori.

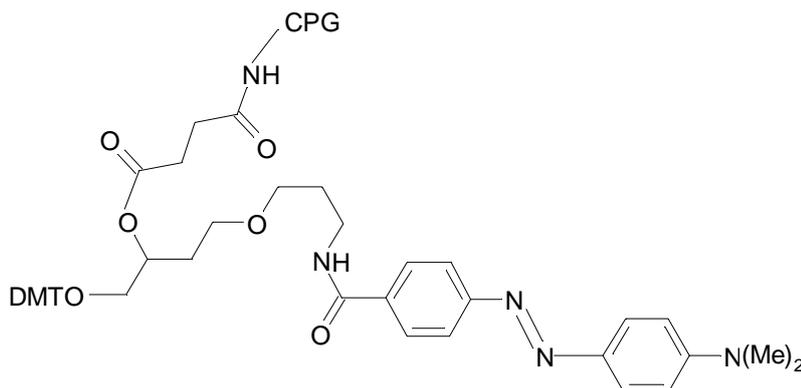


Fig. 4.2 Struttura del gruppo DAB (dabcyl, N-4'-carbossi-4-(dimetil-amino)-azobenzene) legato a colonna (CPG) tramite il linker 1-dimetossitritilossi (DMTO)-3-(3-aminopropil)-propil-succinoil.

Per gli studi di interazione del TAR tramite saggi di *melting* è stata utilizzata una sequenza di RNA corrispondente al TAR, marcata all'estremità 5' con Fluoresceina ed all'estremità 3' con il gruppo Dabcyl, fornita dalla ditta Metabion (29 basi; PM = 10213.62; $\epsilon_{260\text{nm}} = 268900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.1.5.2 dsDNA e ssDNA

Come DNA a doppio filamento è stato utilizzato DNA di timo di vitello, prodotto dalla Sigma. Il coefficiente d'estinzione molare per residuo, a 260 nm, è $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Come DNA a singolo filamento si è utilizzato un prodotto depolimerizzato e denaturato proveniente da timo o polmone di vitello (DEF 572), fornito dalla ditta Gentium S.p.A. Il coefficiente d'estinzione molare per residuo, a 260 nm, è $8350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Come DNA plasmidico è stato utilizzato il plasmide pBR322 è stato fornito dalla ditta MBI Fermentas, in tampone TrisHCl 10 mM (pH 7.6) e EDTA 1 mM a concentrazione $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Per i saggi di *melting* tramite *Contact-Quenching* sono stati utilizzate tre diverse paia di oligonucleotidi, lunghi 18 paia di basi.

Gli oligonucleotidi sono marcati all'estremità 5' del filamento *forward* con il fluoroforo FAM (6-carbossifluoresceina), la cui struttura chimica è riportata in figura 4.3, legato alla base azotata tramite uno spaziatore aciclico di 6 atomi di carbonio; mentre il filamento *reverse* presenta il *quencher* DAB (figura 4.2) all'estremità 3'.

L'oligonucleotide a doppio filamento si forma quando i due filamenti complementari vengono fatti appaiare ed in questo modo il fluoroforo ed il *quencher* vengono a trovarsi

vicini e non si ha emissione di fluorescenza del FAM, osservabile solamente quando il doppio filamento è denaturato.

Per valutare le possibili strutture secondarie che i singoli filamenti possono originare, è stato utilizzato il sito www.idtdna.com, che permette appunto di valutare le strutture possibili per ogni oligonucleotidi e i relativi valori di ΔG .

Le sequenze delle tre coppie di basi sono di seguito riportate e tutte le sequenze nucleotidiche sono state tutte acquistate dalla ditta Metabion (Germania).

1. Oligonucleotide *Random*:

FAM-5'-GTG-AGA-TAC-CGA-CAG-AGG-3' (**FAM-random**); $\epsilon_{260\text{nm}} = 212200 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$
 DAB-3'-CAC-TCT-AGT-GCT-GTC-TCC-5' (**DAB-random**); $\epsilon_{260\text{nm}} = 165883 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

2. Oligonucleotide CCCGGG (Z1):

FAM-5'-ACT-ATT-CCC-GGG-TAA-TGA-3' (**FAM-Z1**); $\epsilon_{260\text{nm}} = 199500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$
 DAB-3'-TGA-TAA-GGG-CCC-ATT-ACT-5' (**DAB-Z1**); $\epsilon_{260\text{nm}} = 184384 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

3. Oligonucleotide GGCGCC (Z2):

FAM-5'-ACT-ATT-GGC-GCC-TAA-TGA-3' (**FAM-Z2**); $\epsilon_{260\text{nm}} = 196500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$
 DAB-3'-TGA-TAA-CCG-CGG-ATT-ACT-5' (**DAB-Z2**); $\epsilon_{260\text{nm}} = 183183 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Per gli studi di dicroismo circolare sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi, della ditta Metabion, fatti appaiare per ottenere il DNA a doppio filamento:

Oligonucleotide ZAG2 *forward*:

5'-ACT-ATT-GGC-GCC-TAA-TGA-3'; $\epsilon_{260\text{nm}} = 175500 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

Oligonucleotide ZAG2 *reverse*:

3'-TGA-TAA-CCG-CGG-ATT-ACT-5'; $\epsilon_{260\text{nm}} = 175900 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$

4.1.5.3 tRNA

È stato utilizzato tRNA estratto da lievito prodotto dalla Sigma. Il numero di residui per molecola è di circa 90 nucleotidi. Il coefficiente d'estinzione molare per residuo, a 260 nm, è $8000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.1.6 PEPTIDI

L'intera proteina Tat è risultata particolarmente instabile in soluzione, quindi tutti gli studi sono stati condotti con peptidi di sintesi corrispondenti a domini specifici di cui è nota la capacità di interagire con l'acido nucleico.

Per i saggi di *Fluorescence Quenching* sono stati utilizzati due peptidi marcati all'estremità N terminale con 6-carbossifluoresceina:

- un peptide lungo 10 aa, corrispondente alla regione basica (aa 48-57) della proteina Tat, ⁴⁸GRKKRRQRRR⁵⁷; questo peptide rappresenta la sequenza minima responsabile del legame all'RNA (24, 33).

- un peptide lungo 36 aa, corrisponde alla regione compresa tra gli aminoacidi 38 e 72 della proteina Tat. Tale peptide di 36aa include, oltre alla regione basica (rappresentata dal peptide di 10aa), 11 residui della regione "core" di Tat e, secondo dati di letteratura (24), tale sequenza (aa37-72) risulta essere quella in grado di legare il TAR con una costante di legame paragonabile a quella della proteina Tat completa. La sequenza di tale peptide è: ³⁷CFTTKALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQ⁷²

Entrambi i peptidi sono marcati all'estremità N-terminale con il fluoroforo 6-carbossifluoresceina (FAM), la cui struttura chimica è riportata in figura 4.3.

La 6-carbossifluoresceina (FAM) è una molecola fluorescente con massimo di emissione alla lunghezza d'onda di 517 nm, in seguito ad eccitazione a 494 nm, mentre presenta un coefficiente di estinzione molare a 494 nm di $83000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

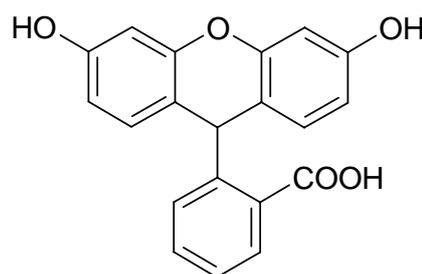


Fig. 4.3 Struttura del fluoroforo FAM (6'-carbossifluoresceina)

Lo stesso Il peptide lungo 36aa, corrispondente alla regione compresa tra gli aminoacidi 38 e 72 della proteina Tat di HIV-1, non marcato con fluoresceina è stato utilizzato per i saggi EMSA.

4.1.7 CELLULE

Per i diversi saggi si sono utilizzate le seguenti linee cellulari:

- cellule Jurkat (cellule di leucemia a cellule T acuta)
- cellule CEM (cellule di leucemia linfoblastica acuta)
- cellule HL60 (cellule di leucemia promielocitica acuta)
- cellule HeLa (cellule di cancro della cervice uterina).

Le linee cellulari Jurkat, CEM e HL60 sono state mantenute in coltura con terreno RPMI1640, mentre le cellule HeLa sono state mantenute in coltura con terreno DMEM, entrambi addizionati di FBS (*Fetal Bovine Serum*) inattivato al 10%, penicillina (100 U/ml), streptomicina (100 µg/ml), a 37°C e 5% di CO₂.

Tutti i terreni e supplementi sono stati acquistati dalla ditta Gibco.

4.1.8 VIRUS

Lo stock virale HIV-1 è stato prodotto tramite transiente trasfezione delle cellule Jurkat con il plasmid pSVC21 contenente il clone infettivo HXB2 di HIV-1 (135).

4.1.9 ENZIMI

L'enzima topoisomerasi II umana è stato acquistato dal laboratorio della Proff.ssa Caroline Austin dell'Institute for Cell and Molecular Biosciences dell'Università di Newcastle (UK).

Il buffer di reazione per la topoisomerasi II è costituito da Tris 40 mM a pH 7.5, KCl 80mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, BSA 15 µg/ml e ATP 1 mM, aggiunta al momento dell'uso.

Per ottenere la forma open circular del plasmide pBR322, da caricare come riferimento insieme ai campioni ottenuti dai saggi di unwinding, è stato utilizzato l'enzima RQ1 DNase RNase-Free (Promega) in concentrazione 1 U/µl. Il buffer di reazione di tale enzima è costituito da Tris 10 mM, CaCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM a pH 8.0. La stop solution per l'enzima è costituita da EGTA 20 mM, pH 8.0.

4.2 METODI

4.2.1 PREPARAZIONI DELLE SOLUZIONI DI FARMACI

Per preparare gli stocks iniziali di farmaci, quantità pesate di composto sono state disciolte in pochi microlitri dell'opportuno solvente (acqua per i chinoloni WRNA2, WRNA3, WRNA4, WRNA5, WRNA6 e WRNA8; DMSO per tutti gli altri composti esaminati).

Per i 2-fenilchinoloni, dopo dissoluzione, le concentrazioni degli stocks sono state determinate per via spettrofotometrica previa costruzione delle opportune rette di taratura per determinare i relativi valori dei coefficienti di estinzione molare, riportati in tabella 3.7.

Per i derivati antrachinonici dell'Ametantrone, dopo dissoluzione, le concentrazioni degli stocks sono state determinate sempre per via spettrofotometrica, utilizzando il coefficiente di estinzione molare sperimentale dell'Ametantrone ($\epsilon_{626\text{nm}}=5400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Invece per tutti gli altri derivati peptidil-antrachinonici, i 6-amminochinoloni e gli acridoni non sono state costruite le rette di taratura per determinare i coefficienti di estinzione molare; in questo caso la concentrazione dello stock iniziale è stata calcolata teoricamente, in seguito a pesata precisa delle polveri e delle quantità di solvente utilizzate per dissolverle.

Le soluzioni di lavoro dei farmaci, alle concentrazioni desiderate, sono state quindi ottenute diluendo gli stocks iniziali in acqua.

4.2.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI DI ACIDI NUCLEICI

Soluzioni di dsDNA di timo di vitello

Le soluzioni di dsDNA di timo di vitello vengono preparate sciogliendo una piccola quantità di DNA liofilizzato in una beuta contenente la soluzione tampone, che viene poi lasciato rigonfiare *overnight* alla temperatura di 4°C. Successivamente, per permettere il completo scioglimento del DNA, la soluzione viene posta sotto agitazione per circa 30 minuti, quindi filtrata e ne viene determinata la concentrazione tramite misurazione all'UV.

Soluzioni di ssDNA

Questo tipo di soluzione è preparata più semplicemente: una piccola quantità di liofilizzato (ssDNA) viene sciolta nella soluzione tampone. La solubilizzazione è veloce e il campione è subito pronto per l'esperimento, dopo che ne è stata determinata la concentrazione allo spettrofotometro.

Soluzioni di oligonucleotidi

Le soluzioni degli oligonucleotidi sono state preparate dissolvendo l'acido nucleico liofilizzato in un appropriato volume di tampone TE, per ottenere una soluzione stock 1 mM.

Soluzioni di tRNA

La soluzione di tRNA è preparata con la medesima procedura utilizzata per il DNA a singolo filamento.

Soluzioni di TAR *wild type* e mutanti

Le quattro catene oligonucleotidiche (T1-T4), se necessario, sono state deprotette dai gruppi 2'ACE (2'-bis(acetossietossi)-metil etere), usando un tampone acido acetico-tetrametiletildiamina a pH 3.8, ad una temperatura di 60°C per 30'. Le componenti volatili vengono poi fatte evaporare in *speed-vac* e l'RNA deprotetto ripreso successivamente in una soluzione di TE in DEPC a pH 8. Successivamente sono purificate attraverso un gel denaturante di poliacrilammide al 16% con urea. Viene poi estratta la banda relativa all'oligonucleotide purificato e successivamente viene determinata la concentrazione allo spettrofotometro.

La sequenza nucleotidica corrispondente al TAR *wild type* deve essere fatta strutturare prima di eseguire i diversi saggi, per cui la soluzione di TAR in TNMg20 viene scaldata ad 85°C per 5' e lasciata poi raffreddare lentamente in modo da far appaiare correttamente le basi complementari (*annealing*).

Anche le sequenze oligonucleotidiche mutate sono state appaiate in forma di doppia elica: dopo le opportune purificazioni sopradescritte, sono state diluite in soluzioni equimolari in tampone TNMg20, mescolate e denaturate scaldando la soluzione ad 85°C per 5' e poi lasciate strutturare correttamente mediante lento raffreddamento.

Le soluzioni di TAR marcato ad un'estremità con il *quencher* dabcy1 o ad entrambe le estremità con dabcy1 e fluoresceina, sono state sempre denaturate (85°C, 5') e lasciate strutturare a temperatura ambiente, prima dell'uso.

4.2.3 ANALISI DELLE CARATTERISTICHE SPETTROFOTOMETRICHE E FLUORIMETRICHE

Per tutti i chinoloni esaminati, per il composto Ametantrone sono state effettuate delle titolazioni spettrofotometriche per costruire le opportune rette di taratura. Per fare ciò sono state fatte piccole aggiunte in cuvetta, in TNMg20, del composto in esame, registrando poi lo spettro di assorbanza da 200 a 450 nm (chinoloni I serie), da 290 a 450 nm (chinoloni II serie) e da 400 a 700 nm per l'Ametantrone.

Per i 2-fenilchinoloni si sono inoltre registrati gli spettri di emissione di fluorescenza ed è stata valutata la stabilità del segnale nel tempo.

Per registrare gli spettri di fluorescenza, sono state preparate soluzioni ad una concentrazione nota dei composti sia in TNMg20 a pH7.4, che in tampone glicina 0.1 M a pH 3.0; tali soluzioni sono state poste quindi in cuvetta ed eccitate alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento per ogni composto e ne è stato registrato lo spettro di emissione.

Per valutare la stabilità dei chinoloni nel tempo, una soluzione di farmaco è stata incubata, in tampone TNMg20 a pH 7.4, T 25°C, per 12 ore, registrando lo spettro di emissione di fluorescenza ogni 5 minuti.

4.2.4 DETERMINAZIONE SPERIMENTALE DEL COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE

Per calcolare sperimentalmente i valori di logP dei diversi composti in esame, abbiamo preparato una soluzione di 1-ottanolo satura di tampone TNMg20 ed una soluzione di TNMg20 satura di 1-ottanolo, nella quale viene disciolto il farmaco ad una concentrazione nota.

Per preparare le soluzioni sature, un ugual volume di 1-ottanolo e di TNMg20 sono state miscelate in un imbuto separatore; quindi si lasciano ripartire le due fasi e separate le due soluzioni e il procedimento viene ripetuto 4-5 volte.

Una volta preparate le soluzioni sature, si miscela un ugual volume di 1-ottanolo e tampone, nel quale è stato disciolto il farmaco e la miscela ottenuta è mantenuta sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente.

Trascorso tale tempo, si lasciano separare le due fasi a temperatura ambiente e si misura spettrofotometricamente la concentrazione di farmaco nella fase acquosa, mentre la concentrazione nella fase oleosa viene determinata per differenza dalla concentrazione iniziale.

Il valore di logP si calcola quindi nel seguente modo:

$$\log P = \log([F]_{\text{ottanolo}}/[F]_{\text{TNMg}})$$

4.2.5 DIALISI ALL'EQUILIBRIO

Le dialisi sono state effettuate con un metodo da noi messo a punto che prevede l'utilizzo di *Mini Slide Tube* della ditta Pierce, tubini dotati di una membrana semipermeabile con cut off di 3500 Da, in grado quindi di permettere il passaggio tra un compartimento e l'altro di molecole con $PM < 3500$ Da.

Inizialmente sono state eseguite delle prove preliminari con l'intento di ottimizzare i modi ed i tempi di allestimento delle dialisi.

Le membrane vengono lasciate equilibrare nel tampone di reazione per alcune ore, viene poi rimosso l'eccesso di tampone ed allestito il sistema utilizzando piastre da 48 pozzetti (Falcon).

Nella camera inferiore vengono introdotti 350 μ l di tampone TNMg, mentre in quella superiore 350 μ l del campione in esame; in particolare, per ogni esperimento sono state caricate nelle camere di dialisi le seguenti combinazioni di soluzioni:

- tampone/tampone
- acido nucleico/tampone
- farmaco/tampone
- complesso farmaco-acido nucleico/tampone in rapporto 1:1

L'esperimento di dialisi è stato condotto per 20 ore sotto lenta agitazione, a 25°C e ciò che avviene è rappresentato schematicamente in figura 4.4. Trascorso il tempo necessario per l'equilibratura del sistema, è stata prelevata la soluzione dalla camera B ed analizzata mediante fluorimetria.

Per aumentare l'intensità di fluorescenza, in particolare per i chinoloni che risultano essere poco fluorescenti (chinoloni dispari della prima serie), le soluzioni dopo la dialisi sono state diluite 1:2 in buffer glicina 0.1 M a pH 3.0. Infatti, per tutti i chinoloni, a valori di pH acido si assiste ad un effetto batocromico associato ad un marcato aumento dell'intensità di fluorescenza. Tale fenomeno avviene probabilmente perché assistiamo a stati di protonazione diversi delle molecole: a pH acido viene impedita l'aggregazione delle molecole che, a valori di pH maggiori, opera un effetto *quencher* con conseguente

diminuzione dell'intensità di fluorescenza. In particolar modo questo è dimostrato per i chinoloni WRNA1, WRNA3 e WRNA5.

Dall'intensità di fluorescenza si è quindi risalito alla concentrazione di composto, tramite opportune rette di taratura della fluorescenza dei chinoloni a pH3, precedentemente costruite.

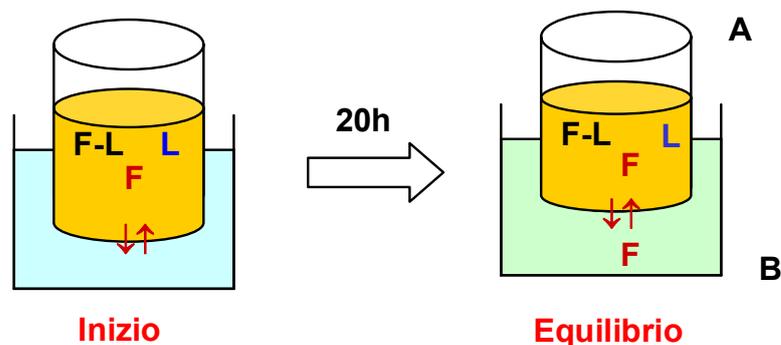


Fig . 4.4 Rappresentazione schematica dell'esperimento di dialisi. All'inizio nella camera A sono presenti le due specie, il chinolone F e l'acido nucleico L. All'equilibrio parte del chinolone che non ha legato l'acido nucleico attraversa la membrana a si distribuisce nella camera B.

La quantificazione della concentrazione di chinolone libero e legato ha permesso il calcolo della frazione legata secondo l'equazione: $v = \text{moli } F_{\text{leg}} / \text{moli } F_{\text{tot}}$

4.2.6 STUDIO DELL'INTERFERENZA DEI COMPOSTI SUL COMPLESSO TAT-TAR TRAMITE FQA

Durante questa tesi di dottorato è stato messo a punto un metodo alternativo ai saggi EMSA, rapido e non radioattivo per valutare l'interferenza dei composti nei confronti del complesso Tat-TAR, tramite FQA (*Fluorescence Quenching Assay*).

La competizione del legame Tat-TAR da parte dei composti in esame dovrebbe portare ad un aumento del peptide fluorescente libero in soluzione, evidenziabile quindi come un incremento dell'intensità di fluorescenza del donatore.

In questo saggio sono stati utilizzati:

- il peptide Tat marcato all'estremità N-terminale con fluoresceina;
- l'RNA-TAR marcato all'estremità 3' con il gruppo accettore non fluorescente dabcyI.

Il saggio è stato effettuato aliquotando una soluzione 10 nM di Tat-fluoresceina, in tampone TNMg, in una piastra da 96 pozzetti ed aggiungendo successivamente nei diversi pozzetti concentrazioni crescenti di TAR-dabcyI, in presenza o assenza di concentrazioni fisse dei composti di interesse.

Le misure di fluorescenza sono state fatte utilizzando un lettore di fluorescenza per piastre multipozzetto (VictorIII, Perkin Elmer), eccitando alla lunghezza d'onda di 485 nm e leggendo lo spettro di emissione a 535 nm.

Le titolazioni sono state effettuate sia con il peptide lungo 10aa e corrispondente alla regione compresa tra gli aminoacidi 48 e 57 di Tat, sia con il peptide lungo 36aa, corrispondente alla regione compresa tra gli aminoacidi 38 e 72.

Dalle curve di titolazione ottenute sono poi stati calcolati i valori delle costanti di dissociazione (K_d) e di inibizione (K_i) a partire dalle seguenti equazioni:

$K_d = (R)(P)/(RP)$ dove R e P sono rispettivamente le concentrazioni di RNA e peptide libero, mentre RP è la concentrazione di complesso peptide/acido nucleico.

$K_i = (R)(I)/(RI)$ dove I si riferisce alla concentrazione di inibitore libero, mentre RI è la concentrazione di complesso inibitore/RNA.

4.2.7 STUDI DI MELTING DEL TAR TRAMITE CONTACT-QUENCHING

La capacità dei composti di legare il TAR o oligonucleotidi a doppio filamento è stata esaminata, eseguendo degli studi di *melting* tramite *Contact-Quenching*.

Le reazioni di *melting*, per lo studio dell'interazione con il TAR, sono state effettuate all'interno di capillari di vetro contenenti 20 μ l della seguente miscela di reazione: 2 μ l del farmaco in esame alla concentrazione finale di 1, 10 e 100 μ M, 4 μ l di tampone ETN20 5X, il TAR marcato con la fluoresceina e il *quencher* in concentrazione alla concentrazione finale di 1 μ M e H₂O mQ.

Anche i *melting* con gli oligonucleotidi a DNA sono stati effettuati allestendo una simile miscela di reazione (20 μ l) all'interno di capillari di vetro: 2 μ l del farmaco in esame alla concentrazione finale di 1, 10 e 100 μ M, 4 μ l di tampone ETN20 5X, ETN150 5X o ETN500 5X, la coppia di oligonucleotidi marcati con i gruppi FAM e DAB alla concentrazione finale di 0.25 μ M e H₂O mQ.

Prima del saggio il TAR è stato denaturato a 85°C per 5 minuti, lasciandolo poi strutturare correttamente a temperatura ambiente per un'ora. Allo stesso modo i filamenti a DNA *forward* and *reverse* sono stati fatti denaturare scaldando una soluzione equimolare dei due oligonucleotidi a 95°C per 5 minuti e lasciandoli correttamente appaiare a temperatura ambiente per tre ore.

Il saggio di *melting* è stato fatto utilizzando lo strumento *Light Cycler 1.5* della Roche ed il protocollo utilizzato è costituito da tre fasi: una prima rampa 30°-95°C (la fase di *melting*), 10 minuti a 95°C, una fase finale di ri-appaiamento (fase di *annealing*) durante la quale la temperatura viene riportata a 30°.

La velocità con la quale viene variata la temperatura è di 1°C/min e il segnale di fluorescenza viene letto dallo strumento a 520 nm.

4.2.8 STUDI DI DICROISMO CIRCOLARE

Per verificare le eventuali modifiche della topologia del DNA provocate dall'aggiunta del composto antrachinonico 1002, sono state effettuate titolazioni di una soluzione di DNA di timo di vitello con il farmaco, per poi passare alla titolazione dell'oligonucleotide ZAG2. Questo ultimo oligonucleotide differisce da quello sfruttato nel saggio di *Contact-Quencing* solo per la mancanza del fluoroforo e del *quencher* in 5' del filamento *forward* e in 3' del filamento *reverse*.

Lo spettro dicroico è stato acquisito alla velocità di 20 nm/minuto tenendo in considerazione due accumuli tra le lunghezze d'onda di 220 e 350 nm.

Per quanto riguarda la titolazione con il DNA di timo di vitello, ad una soluzione 95 µM di DNA in ETN150, pH 7.5, sono state aggiunte quantità crescenti di 1002 fino ad un rapporto DNA/farmaco di 1:2.

Per le titolazioni con l'oligonucleotide Z2, invece, siamo partiti da una soluzione 5 µM e le titolazioni sono state effettuate in ETN20, pH 7.5.

Pur essendo chirale il composto 1002 non presenta uno spettro dicroico significativo né nel visibile né nell'ultravioletto.

Gli studi sono stati effettuati con lo spettropolarimetro Jasco J-810 interfacciato con il *software* Spectra Manager e collegato al termostato NESLAB.

4.2.9 SAGGI ELETTROFORETICI

4.2.9.1 Saggi EMSA (Electrophoresis mobility shift assay)

Per stabilire la concentrazione di Tat necessaria per avere la formazione del complesso, è stato incubato il wtTAR 0.33 µM (denaturato a 85°C per 1 minuto e quindi fatto nuovamente appaiare correttamente a temperatura ambiente) con concentrazioni

crescenti di Tat (da 0.001 a 100 μM), in tampone TNMg20, in un volume di reazione finale di 20 μl , a 25°C per 30 minuti. Il complesso formato è stato separato dal TAR non legato attraverso una corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide non denaturante al 10%, a 100 Volt, per 2 ore; quindi la colorazione per rilevare le bande è stata fatta immergendo il gel per un'ora in una soluzione di colorante fluorescente Sybr Green II (diluizione 1:10000 dello stock commerciale) e analizzando poi il gel al *Phosphoimager*.

Per valutare l'inibizione dell'interazione Tat-TAR da parte dei chinoloni in esame il saggio EMSA è stato effettuato con due modalità diverse, che potremmo definire come:

- *Competition Assays*, nei quali il peptide Tat viene incubato con TAR (30 minuti, 25°C) e successivamente viene aggiunto il chinolone (incubazione per 10 minuti, 25°C)
- *Challenge Assays*, in questo caso è stato preincubato il TAR con il chinolone e successivamente aggiunto il peptide Tat.

In entrambi i casi si sono utilizzate le concentrazioni indicate sopra per formare il complesso (wtTAR 0.33 μM + Tat 1 μM) e concentrazioni crescenti di composto.

Anche in questo caso i campioni vengono fatti correre in un gel di poliacrilammide al 10%, colorato poi con Sybr Green II.

Per poter fare un confronto dell'attività dei diversi composti, sono state quantificate le bande relative al TAR libero e normalizzate rispetto alla banda del controllo senza Tat.

4.2.9.2 Saggi di *unwinding*

Questi saggi permettono di valutare la capacità intercalante degli antrachinoni in esame e il relativo svolgimento della doppia elica.

Il saggio è stato fatto incubando 0.25 μg di plasmide pBR322 superavvolto con concentrazioni crescenti dei composti in un volume finale 20 μl , in tampone TE a pH 8. Dopo 1 ora di incubazione i campioni vengono fatti correre in un gel d'agarosio all'1% *overnight* a 15 V/cm in tampone TBE 1X, pH 8.0.

Nello stesso gel viene fatto correre come controllo anche un campione di plasmide in forma *open-circular*. Per ottenere tale forma topologica, il plasmide superavvolto è stato trattato con l'enzima RQ1 DNase *RNAse-Free*. Tale enzima idrolizza i legami fosfodiesterici del DNA e in condizioni non ottimali tale enzima taglia il plasmide solamente una volta.

Il plasmide pBR322 è stato incubato per 5 minuti a 0°C con 0.001 unità di enzima in tampone composto da 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgSO₄ e 10 mM CaCl₂ a pH 8.0, in un volume finale di 50 µl. La reazione viene bloccata aggiungendo 3 µl di *Stop Solution* contenente EGTA 20 mM, pH 8.0 ed incubando per 5 minuti a 25°C.

4.2.10 SAGGI ENZIMATICI

4.2.10.1 Saggi di inibizione dell'attività di decatenazione della topoisomerasi II

In tale saggio, 180 ng di kDNA (*kinetoplast* DNA, fornito dalla ditta Topogen), vengono incubati in una miscela di reazione (20 µl), contenente Tris 40 mM a pH 7.5, KCl 80 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, BSA 15 µg/ml e ATP 1 mM, 0.01 U di enzima topoisomerasi II, in presenza del farmaco alle concentrazioni volute. Anche in questo caso, le soluzioni di farmaco sono preparate prima dell'uso, diluendo in acqua lo stock, per ottenere le concentrazioni volute.

La reazione viene fatta avvenire a 37°C per 60 minuti, quindi si aggiungono 3 µl di *gel loading buffer* e si effettua una corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1%, a 70 Volts per 90 minuti.

4.2.10.2 Saggi di inibizione dell'attività di rilassamento della topoisomerasi II

Per confermare la capacità di intercalazione al DNA di questi composti e per studiare la capacità di inibire l'attività di rilassamento della topoisomerasi II, il plasmide pBR322 in forma superavvolta è stato incubato con l'enzima, in presenza dei farmaci.

0.1 µg di pBR rilassato vengono incubati con 0.01 U di enzima, in presenza del farmaco a diverse concentrazioni, nel tampone di reazione costituito da Tris 40 mM a pH 7.5, KCl 80mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, BSA 15 µg/ml e ATP 1 mM, per un volume totale di reazione di 20 µl. Parallelamente vengono preparati anche un secondo set di campioni, sempre trattati con i farmaci, ma in assenza di enzima.

La reazione viene fatta avvenire a 37°C per 60 minuti, dopodichè la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 2 µl di NaCl. Quindi si aggiungono 3 µl di *gel loading buffer* ed i campioni vengono fatti correre in gel d'agarosio all'1% *overnight* a 3.5 Volt/cm.

4.2.11 SAGGI DI CITOTOSSICITÀ

La citotossicità dei composti è stata testata su cellule CEM e cellule Jurkat in sospensione, valutando la vitalità cellulare attraverso il saggio colorimetrico dell'MTT (3,(4,4-dimetiltiazolo)-2,5 difenil-tetrazolo bromuro). Tale metodo si basa sulla capacità da parte delle cellule vitali di ridurre il sale di tetrazonio giallo, in un precipitato purpureo insolubile di formazano. La reazione di riduzione è attribuita all'attività glicolitica mitocondriale ed è un processo dipendente dalla presenza di NADH e NADPH. Nelle cellule in attiva proliferazione la conversione di MTT nella sua forma ridotta è rilevabile tramite lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 540nm. Questo saggio è impiegato per la valutazione del tasso di proliferazione cellulare, poiché la quantità di formazano che si forma in seguito alla reazione mitocondriale è proporzionale al numero di cellule sane e vitali nella popolazione seminata.

Le cellule sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti (in triplicato) ad una concentrazione di 0.1×10^6 cell/ml in un volume di 100 μ l, a cui sono state aggiunte concentrazioni crescenti dei farmaci in esame. Trascorso l'opportuno tempo di incubazione a 37°C, sono stati aggiunti in ogni pozzetto 20 μ l di una soluzione 5 mg/ml di MTT. Le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C, per permettere l'incorporazione e la riduzione del tetrazonio, centrifugate per 5 minuti a 1200 rpm e risospese in 150 μ l di DMSO, per favorire la solubilizzazione dei cristalli di formazano. Le piastre sono state quindi lasciate agitare per 30 minuti e lette ad una lunghezza d'onda di 540 nm con l'apposito lettore *Microplate Reader* (BioRad).

4.2.12 VALUTAZIONE DELL'UPTAKE CELLULARE

Per valutare l'uptake da parte delle cellule è stato utilizzato un saggio fluorimetrico, che permette di quantificare la percentuale di composto in grado di entrare nelle cellule.

Per effettuare gli esperimenti di uptake sono state incubate $2,5 \times 10^6$ cellule in 0.5 ml di HBSS (Hanks Balanced Salt Solution), in presenza dei diversi chinoloni in concentrazione 100 μ M. Trascorso il tempo di incubazione a 37°C le cellule sono separate dalla soluzione extracellulare per centrifugazione (13000 rpm per 1'), attraverso uno strato di olio di silicone (densità 1.029 g/cm³) in un tubo da microcentrifuga (136, 137). Il surnatante viene quindi scartato ed il pellet cellulare

risospeso in 1 ml di tampone di lisi, composto da glicina 0,1M e HCl (pH 3.0) e agitato *overnight*.

A questo punto i campioni vengono centrifugati per 5 minuti a 5600 rpm, per separare i residui cellulari dal surnatante e l'ammontare di farmaco rilasciato è stato determinato misurando l'emissione di fluorescenza di quest'ultimo. Un controllo negativo senza farmaco viene usato per determinare il *background* di fluorescenza, valore da sottrarre al segnale dei campioni trattati con i farmaci.

Dall'intensità di fluorescenza misurata è stato possibile risalire alla concentrazione di farmaco rilasciato tramite le rette di taratura precedentemente costruite con i vari farmaci a pH 3.0.

Allo scopo di cercare di favorire l'entrata dei composti nelle cellule si è applicato un protocollo comunemente usato per la trasfezione cellulare ed utilizzato anche nei saggi di infezione virale a cui saranno sottoposti i composti WRNA: il trattamento con lipofectamine, una classe di molecole formate da una coda policationica e da una porzione lipidica, che prevede la pre-incubazione dei farmaci con lipofectamina 2000 in concentrazione 0.04 µg/µl per 20 minuti a temperatura ambiente. Abbiamo anche verificato l'efficacia della tecnica *Citospin*, un'altra metodologia utilizzata per favorire l'entrata dei virus nelle cellule, che consiste nella centrifugazione delle cellule a contatto con il farmaco per 2 ore a 2500rpm.

4.2.13 SAGGI ANTIVIRALI

L'effetto dei composti sull'infezione acuta da HIV-1 è stato misurato valutando l'attività dell'enzima virale retrotrascrittasi inversa (RT), presente nel surnatante di cellule Jurkat infette in coltura.

Le cellule Jurkat (10^6 cellule) sono state incubate con uno stock virale alla molteplicità di infezione (MOI) di 0.001 TCID₅₀/cellula. Dopo 2 ore di incubazione a 37°C, la coltura è stata lavata 2 volte e mantenuta in assenza o in presenza di varie concentrazioni dei composti, con un cambio del 50% del terreno ogni 3 giorni. La replicazione virale in seguito all'infezione è stata monitorata misurando l'attività dell'enzima RT nel surnatante e tale attività viene determinata misurando l'ammontare di incorporazione di dTTP triziato in un oligonucleotide-stampo poli(A)•oligo(dT)₁₂₋₁₈. I virus vengono precipitati da 1ml di cellule infette, attraverso centrifugazione a 13000

rpm a 4°C per 1h. Il *pellet* è quindi risospeso in 10 µl di tampone (Tris 50 mM, DTT 1 mM, glicerolo 20%, KCl 250 mM, TritonX-100 0,25% a pH 7.5) e lisato attraverso 3 cicli di congelamento e scongelamento. La miscela di reazione finale contiene: il lisato virale, Tris 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 7.5 mM, TritonX100 0.05%, DTT 5 mM, poliA 100 µg/ml, oligodT 10 µg/ml e 2 µCi di ³H-dTTP (43 Ci/mmmole) in 50 µl di volume finale. La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per 1 h e trasferita su un filtro DE81. I filtri sono poi lavati 3 volte in tampone SSC 2X (NaCl 3 M, sodio citrato 0,3 M, pH 7.2) e 2 volte in etanolo assoluto. Quando i filtri sono asciutti, il segnale radioattivo è stato misurato con un scintillatore β-counter (Rackbeta 1214, Wallac).

5. BIBLIOGRAFIA

1. Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. & Oshiro, L. S. (1984) *Science* **225**, 288-290.
2. Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J. & Safai, B. (1984) *Science* **224**, 500-503.
3. Lifson, J. D., Reyes, G. R., McGrath, M. S., Stein, B. S. & Engleman, E. G. (1986) *Science* **232**, 1123-1127.
4. Hughes, A. & Corrah, T. (1990) *Blood. Rev.* **4**, 158-164.
5. Muesing, M. A., Smith, D. H. & Capon, D. J. (1987) *Cell* **48**, 691-701.
6. Bohnlein, S., Hauber, J. & Cullen, B. R. (1989) *J. Virol.* **63**, 421-424.
7. Feng, S. & Holland, C. (1988) *Nature* **334**, 165-170.
8. Dalglish, A. G., Beverley, P. C., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F. & Weiss, R. A. (1984) *Nature* **312**, 763-767.
9. Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckman, J. C. & Montagnier, L. (1984) *Nature* **312**, 767-768.
10. Schwartzberg, P., Colicelli, J. & Goff, S. P. (1984) *Cell* **37**, 1043-1052.
11. Katoh, I., Yoshinaka, Y., Rein, A., Shibuya, M., Odaka, T. & Oroszlan, S. (1985) *Virology* **145**, 280-292.
12. De Clercq, E. (1995) *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 200-239.
13. Kolata, G. (1987) *Science* **235**, 1570-1577.
14. Spence, R. A., Kati, W. M., Anderson, K. S. & Johnson, K. A. (1995) *Science* **267**, 988-993.
15. Steele, F. (1995) *Nat. Med.* **1**, 285-286.
16. Bieniasz, P. D., Grdina, T. A., Bogerd, H. P. & Cullen, B. R. (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**, 4592-4599.
17. Jeang, K. T. & Gatlignol, A. (1994) *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **188**, 123-144.
18. Berkhout, B. & Jeang, K. T. (1992) *J. Virol.* **66**, 139-49.

19. Calnan, B. J., Biancalana, S., Hudson, D. & Frankel, A. D. (1991) *Genes Dev.* **5**, 201-210.
20. Cordingley, M. G., LaFemina, R. L., Callahan, P. L., Condra, J. H., Sardana, V. V., Graham, D. J., Nguyen, T. M., LeGrow, K., Gotlib, L. & Schlabach, A. J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**, 8985-8989.
21. Berkhout, B., Gatignol, A., Silver, J. & Jeang, K. T. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 1839-1846.
22. Neuveut, C. & Jeang, K. T. (1996) *J. Virol.* **70**, 5572-5581.
23. Kuppuswamy, M., Subramanian, T. & Srinivasan, A. (1989) *Nucl. Acids Res.* **17**, 3551-3561.
24. Churcher, M., Lamont, C., Hamy, F., Dingwall, C., Green, S. M., Lowe, A. D., Butler, P., Gait, M. J. & Karn, J. (1993) *J. Mol. Biol.* **230**, 90-110.
25. Loret, E. P., Georgel, P. & Johnson, J., W. C. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9734-9738.
26. Efthymiadis, A., Briggs, L. J. & Jans, D. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1623-1628.
27. Berkhout, B., Silverman, R. H. & Jeang, K. T. (1989) *Cell* **59**, 273-282.
28. Lund, L., Wahren, B. & Garcia-Blanco, M. A. (2003) *J. Gen. Virol.* **84**, 603-606.
29. Wang, Z. & Rana, T. M. (1996) *Biochemistry* **35**, 6491-6499.
30. Wang, Z. & Rana, T. M. (1998) *Biochemistry* **37**, 4235-4243.
31. Rice, A. P. & Carlotti, F. (1990) *J. Virol.* **64**, 6018-6026.
32. Endo, S., Kubota, S., Siomi, H., Adachi, A., Oroszlan, S., Maki, M. & Hatanaka, M. (1989) *Virus Genes* **3**, 99-110.
33. Hauber, J., Malim, M. H. & Cullen, B. R. (1989) *J. Virol.* **63**, 1181-1187.
34. Tao, J. & Frankel, A. D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 1571-1575.
35. Aboul-Ela, G. K., J.; Varani, G. (1996) *Nucleic Acid Res.* **24**, 3974-3981.
36. Marciniak, R. A. & Sharp, P. A. (1991) *EMBO J.* **10**, 4189-4196.
37. Nikolov, D. B. & Burley, S. K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 15-22.
38. Herman, C. H. & Rice, A. P. (1995) *J. Virol.* **69**, 231-236.
39. Zhu, Y., Pe'ery, T., Peng, J., Ramanathan, Y., Marshall, N., Marshall, T., Amendt, B., Mathews, M. B. & Price, D. H. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2622-2632.

40. Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H. & Jones, K. A. (1998) *Cell* **92**, 451-462.
41. Rusnati, M. & Presta, M. (2002) *Drugs of the Future* **27**, 481-493.
42. Noonan, D. & Albin, A. (2000) *Adv. Pharmacol.* **48**, 229-250.
43. Albin, A. B., G.; Benelli, R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4838-4842.
44. Barillari, G. G., R.; Gallo, R. C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7941-7945.
45. Vivès, E., Brodin, P. & Lebleu, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16010-16017.
46. Re, M. C., Furlini, G. & Vignoli, M. (1995) *J. Acquir. Im. Def. Syndr. Hum. Retr.* **10**, 408-416.
47. Zagury, D., Lachgar, A. & Chams, V. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3851-3856.
48. Cohen, S. S., Li, C. & Ding, L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10842-10847.
49. Huang, L. M., Chao, M. F. & Chen, M. Y. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 13427-13432.
50. Gallo, R. C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 8324-8326.
51. Karn, J. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 235-254.
52. Baba, M. (2004) *Curr. Top. Med. Chem.* **4**, 871-883.
53. Krebs, A., Ludwig, V., Boden, O. & Göbel, M. W. (2003) *Chem. Bio. Chem.* **4**, 1125-1131.
54. Kashanchi, F., Sadaie, M. R. & Brady, J. N. (1997) *Virology* **227**, 431-440.
55. Choudhury, I., Wang, J., Rabson, A. B., Stein, S., Pooyan, S. & Leibowitz, M. J. (1998) *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **17**, 104-111.
56. Hamy, F., Felder, E. R., Heizmann, G., Lazdins, J., Aboul-ela, F., Varani, G., Karn, J. & Klimkait, T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3548-3553.
57. Tamilarasu, N., Zhang, J., Hwang, S. & Rana, T. M. (2001) *Bioconjug. Chem.* **12**, 135-138.
58. Lee, C. W., Cao, H., Ichiyama, K. & Rana, T. M. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 4243-4246.
59. Chuah, M. K., Vandendriessche, T., Chang, H. K., Ensoli, B. & Morgan, R. A. (1994) *Hum. Gene Ther.* **5**, 1467-1475.

60. Boulme, F., Perala-Heape, M., Sarih-Cottin, L. & Litvak, S. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1351**, 249-255.
61. Puerta-Fernandez, E., Barroso-del Jesus, A., Romero-Lopez, C., Tapia, N., Martinez, M. A. & Berzal-Herranz, A. (2005) *Aids* **19**, 863-870.
62. Puerta-Fernandez, E., Romero-Lopez, C., Barroso-delJesus, A. & Berzal-Herranz, A. (2003) *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 75-97.
63. Darfeuille, F., Hansen, J. B., Orum, H., Di Primo, C. & Toulme, J. J. (2004) *Nucleic. Acids Res.* **32**, 3101-3107.
64. Darfeuille, F., Arzumanov, A., Gryaznov, S., Gait, M. J., Di Primo, C. & Toulme, J. J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**, 9709-9714.
65. Kolb, G., Reigadas, S., Boiziau, C., van Aerschot, A., Arzumanov, A., Gait, M. J., Herdewijn, P. & Toulme, J. J. (2005) *Biochemistry* **44**, 2926-2933.
66. Li, M. J., Bauer, G., Michienzi, A., Yee, J. K., Lee, N. S., Kim, J., Li, S., Castanotto, D., Zaia, J. & Rossi, J. J. (2003) *Mol. Ther.* **8**, 196-206.
67. Martinez, M. A., Gutierrez, A., Armand-Ugon, M., Blanco, J., Parera, M., Gomez, J., Clotet, B. & Este, J. A. (2002) *Aids* **16**, 2385-2390.
68. Nifosi, R., Reyes, C. M. & Kollman, P. A. (2000) *Nucl. Acids Res.* **28**, 4944-4955.
69. Faber, C., Sticht, H., Schweimer, K. & Roesh, P. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 20660-20666.
70. DeLano, W. L. (2002) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 14-20.
71. Ippolito, J. & Steitz, T. A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9819-9824.
72. Al-Hashimi, H. M. G., Y.; Gorin, A.; Hu, W.; Majumdar, A.; Patel, D. J. (2002) *J. Mol. Biol.* **315**, 95-102.
73. Brodsky, A. S. E., H.; Williamson, J. R. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 1991-1995.
74. Bailly, C., Colson, P., Houssier, C. & Hamy, F. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 1460-1464.
75. Dassonneville, L., Hamy, F., Colson, P., Houssier, C. & Bailly, C. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 4487-4492.
76. Peytou, V., Condom, R., Patino, N., Guedj, R., Aubertin, A. M., Gelus, N., Bailly, C., Terreux, R. & Cabrol-Bass, D. (1999) *J. Med. Chem.* **42**, 4042-4053.

77. Gelus, N. H., F.; Bailly, C. (1999) *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 1075-1079.
78. Hamy, F., Brondani, V., Flörsheimer, A., Stark, W., Blommers, M. J. & Klimkait, T. (1998) *Biochemistry* **37**, 5085-5095.
79. Murchie, A. I., Davis, B., Isel, C., Afshar, M., Drysdale, M. J., Bower, J., Potter, A. J., Starkey, I. D., Swarbrick, T. M., Mirza, S., Prescott, C. D., Vaglio, P., Aboul-ela, F. & Karn, J. (2004) *J. Mol. Biol.* **336**, 625-638.
80. Murchie, A. I. H., Davis, B., Afshar, M., Drysdale, M. J., Bower, J., Potter, J., Starkey, I. D., Swarbrick, T. M., Aboul-Ela, F., Karn, J., Varani, G. & Lentzen, G. (2004) *J. Mol. Biol.* **336**, 343-356.
81. Palumbo, M., Gatto, B., Zagotto, G. & Palu, G. (1993) *Trends Microbiol.* **1**, 232-235.
82. Palù, G., Valisena, S., Ciarrocchi, G., Gatto, B. & Palumbo, M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9671-9675.
83. Baba, M., Okamoto, M., Kimura, Y., Ikeuchi, T., Sakaguchi, T. & Okamoto, T. (1997) *Antimicrob. Agent Chemother.* **41**, 1250-1255.
84. Baba, M., Okamoto, M., Kawamura, M., Makino, M., Higashida, T., Takashi, T., Kimura, Y., Ikeuchi, T., Tetsuka, T., Okamoto, T. (1998) *Mol. Pharmacol.* **53**, 1097-1103.
85. Sissi, C., Andreolli, M., Cecchetti, V., Fravolini, A., Gatto, B. & Palumbo, M. (1998) *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1555-1561.
86. Cecchetti, V., Parolin, C., Moro, S., Pecere, T., Filipponi, E., Calistri, A., Tabarrini, O., Gatto, B., Palumbo, M., Fravolini, A. & Palu, G. (2000) *J. Med. Chem.* **43**, 3799-3802.
87. Parolin, C., Gatto, B., Del Vecchio, C., Pecere, T., Tramontano, E., Cecchetti, V., Fravolini, A., Masiero, S., Palumbo, M. & Palù, G. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 889-896.
88. Richter, S., Gatto, B., Tabarrini, O., Fravolini, A. & Palumbo, M. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 4247-4251.
89. Tabarrini, O., Stevens, M., Cecchetti, V., Sabatini, S., Dell'Uomo, M., Manfroni, G., Palumbo, M., Pannecouque, C., De Clercq, E. & Fravolini, A. (2004) *J. Med. Chem.* **47**, 5567-5578.

90. Richter, S., Parolin, C., Gatto, B., Del Vecchio, C., Fravolini, A., Palù, G. & Palumbo, M. (2004) *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1895-1899.
91. Forster, T. (1948) *Ann. Phys.* **2**, 55-75.
92. Haugland, R. P., Yguerabide, J. & Stryer, L. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63**.
93. Marras, S. A. (2006) *M. M. B.* **35**, 4-16.
94. Lakowicz, J. R. (2006) *Principle of Flourescence Spectroscopy*.
95. Peelman, F., Couturier, C., Dam, J., Zebeau, L., Tavernier, J. & Jockers, R. (2006) *Trends Pharmacolog. Sci.* **27**, 218-25.
96. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992) *Bio-Technology* **10**, 413-417.
97. Liu, J. & Lu, Y. (2006) *Methods Mol. Biol.* **335**.
98. Mergny, J. L. & Maurizot, J. C. (2001) *Chembiochem* **2**, 124-32.
99. Cao, H., Tamilarasu, N. & Rana, T. M. (2006) *Bioconjug. Chem.* **17**, 352-358.
100. Tao, J. & Frankel, A. D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2723-2726.
101. Boyle, P. & Ferlay, J. (2005) *Ann. Oncol.* **2005** **16**, 481-488.
102. Gasser, S. & Raulet, D. (2006) *Seminars in Cancer Biology Natural killer cells in cancer 2006* **16**.
103. Kiaris, H. (2006) *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 2006*, 188.
104. Krapcho, A. P., Gaetahun, Z., Avery, K. L., Hacker, M. P., Spinelli, S. & Pezzoni, G. (1991) *J. Med. Chem.* **34**, 2373-80.
105. Morreal, C. E., Bernacki, R. J., Hillman, M., Atwood, A. & Certonia, D. (1990) *J. Med. Chem.* **33**, 490-492.
106. Murray, J. T. (2006) *Expert. Opin. Drug. Saf.* **5**, 265-74.
107. Lerman, L. S. (1961) *J. Mol. Biol.* **3**, 18-30.
108. Chen, K. X., Gresh, N. & Pullmann, B. (1986) *Nucleic Acid. Res.* **14**, 9103.
109. Gatto, B., Capranico, G. & Palumbo, M. (1999) *Curr. Pharm. Des.* **5**, 195-215.
110. Fisher, G. R., Brown, J. R. & Patterson, L. H. (1990) *Free Radical Res. Commun.* **11**, 117-125.
111. Blanz, J., Mewes, K., Ehniger, G., Proksch, B., Waidelich, D., Grager, B. & Zeller, K. P. (1991) *Drug Metab. Dispos.*, 871-880.

112. Kolodziejczyk, P., Reszka, K. & Lown, J. W. (1988) *Free Radical Biol. Med.* **5**, 13-25.
113. Murdock, K. C., Child, R. G., Fabio, P. F., Angier, R. B., Wallace, R. E., Durr, F. E. & Citarella, R. V. (1979) *J. Med. Chem.* **22**, 1024-30.
114. Palumbo, M., Gatto, B., Moro, S., Sissi, C. & Zagotto, G. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1587**.
115. Zagotto G., U. E., Antonello C., Conconi M.T., Marciani Magno S. (1992) *Med. Chem. Lett.* **2**, 659-662.
116. Gatto B., Z. G., Sissi, C., Cera, C., Uriarte, E., Palù, G., Palumbo, M. (1995) *J. Med. Chem.* **39**.
117. Pullman, B. (1991) *Anticancer Drug Des.* **6**, 95-105.
118. Hui, X. W., Gresh, N. & Pullman, B. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 1109-14.
119. Dervan, P. B. (2001) *Bioorganical and Medicinal Chemistry* **9**, 2215.
120. Arcamone, F. (1981) *Academic Press: New York*.
121. Bourdouxhe-Housiaux, C. C., Houssier, C., Waring, M. J. & Bailly, C. (1996) *Biochemistry* **35**, 4251.
122. Far, S. K., Verchere-Beaur, C., Gresh, N., Taillandier, E. & Perree-Fauvet, M. (2004) *Eur. J. Org. Chem.*, 1781.
123. Gresh, N. & Kahn, P. (1991) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **8**, 827-845.
124. Dvorak, M., Urbanek, Bartunek, P., Paces, V., Vlach, J., Pecenka, V. & Arnold, L. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 458-466.
125. Burnouf, D., Koehl, P. & Fuchs, R. P. (1989) *Proc. Nacl. Acad. Sci.* **86**, 4147-51.
126. Wain-Hobson S., S. P., Danos O., Cole S., Alizon M. (1985) *Cell* **40**, 9-17.
127. Muesing, M., Smith, D., Cabradilla, C., Benton, C., Lasky, L. & Capon, D. (1985) *Nature* **313**, 450.
128. Van Straaten F., M. R., Curran T., Van Beveren C., Verma I.M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **80**, 3183-7.
129. Tsimanis A., B., Dreilina D., Meldrais J., Lozha V., Kukaine R. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11**, 1009-1017.
130. Hong, F., Huang, H., To, H., Yuong, L., Oro, A., Bookstein, R. & Lee, W. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**, 5502-5509.

131. Gresh, N. & Kahn, P. (1990) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **7**, 1141-1160.
132. Butler, M. A., Matney, T. S. & Loo, T. L. (1981) *Cancer. Res.* **41**, 376-379.
133. Crick, F. H. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**, 2639-2643.
134. S. A. Marras, F. R. Kramer & Tyagi, S. (2002) *Nucleic Acid Res.* **30**, 1-8.
135. Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K. J., Starcich, B., Josephs, S. F., Doran, E. R., Rafalski, J. A., Whitehorn, E. A. & Baumeister, K. (1985) *Nature* **313**, 277-279.
136. Pascual, A., Garcia, I. & Perea, E. (1989) *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 653-656.
137. Pascual, A., Garcia, I., Ballesta, S. & Perea, E. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 12-15.