



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE**



**Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche**  
**IX-Ciclo NS**  
**2007-2010**

*Design and synthesis of “small molecules” as  
antiviral and radiotracer agents*

**Tutor**

Prof. Paolo de Caprariis

**PhD Student**

Grazia Sellitto

**Coordinatore**

Prof.ssa Nunziatina De Tommasi

## ABSTRACT

Il presente progetto di ricerca è stato diviso in tre parti ai fini di una maggiore comprensione dello stesso nella sua interezza. In particolare:

- I) Progettazione, sintesi e valutazione dell'attività antivirale degli analoghi di Arbidol.
- II) Valutazione del meccanismo d'azione anti-influenza di Arbidol.
- III) Sintesi e caratterizzazione di un P.E.T. radiotracer per l'ipossia tumorale:  
*1- (5- [18F] Fluoro-5-deossi- $\alpha$ -D-arabinofuranosil) -2-nitroimidazolo o <sup>18</sup>F-FAZA.*

L'attività di scientifica svolta inizialmente ha riguardato la progettazione e sintesi di derivati a nucleo indolico utilizzando come *lead compound* Arbidol (ARB), un composto che esplica effetti immunomodulanti, antiossidanti, antimetastatici e antivirali<sup>1</sup>. ARB è un composto sintetizzato in Russia con un potente ed ampio spettro d'azione antivirale rivolto verso virus a DNA ed RNA, con o senza envelope, e pH-dipendenti e -indipendenti, quali: *virus dell'influenza A (H1N1, H2N2 and H3N2), B e C, virus respiratorio sinciziale (RSV), adenovirus-7, virus coxsackie B3, virus della parainfluenza di tipo 5 e rinovirus-14, coronavirus aviario, virus della bronchite contagiosa e virus della patologia di Marek, virus dell'epatite B e C*. L'ampio spettro d'azione di ARB suggerisce che esso attacca step critici comuni nell'interazione virus-cellula. Studi di letteratura riportano, inoltre, che l'attività antivirale di Arbidol è legata alla sua capacità di interagire con le membrane biologiche e con alcune sequenze chiave presenti in glicoproteine di diversi virus. La sua attività antivirale è probabilmente dovuta ad un effetto diretto nell'interazione di membrana virus-cellula. Infatti, intercalandosi nelle membrane, ARB potrebbe indurre delle alterazioni nelle stesse, portando ad una eccessiva stabilizzazione delle membrane cellulari con resistenza ai processi di fusione ed in alcuni casi (HCV) anche alla replicazione<sup>2-4</sup>. Le note proprietà farmacologiche di Arbidol hanno spinto la nostra attenzione alla sintesi di suoi

derivati come potenziali agenti antivirali. La progettazione di tali derivati è stata effettuata mantenendo i gruppi responsabili dell'interazione di ARB con le membrane biologiche (anello indolico, gruppo S-fenile, gruppo estereo e ammino gruppo) ed eliminando quelli non ritenuti farmacofori (gruppi OH e Br in posizione 5 e 6 sull'anello indolico). Inoltre, sono stati introdotti diversi sostituenti in posizione 2 e 5 sull'anello indolico, al fine di valutare come queste modifiche influissero sull'attività antivirale. La sintesi di tali derivati è stata effettuata mediante la validazione di due schemi sintetici. Successivamente, i composti sintetizzati sono stati sottoposti a saggi per la valutazione dell'attività anti-HCV e anti-HSV. Essi hanno mostrato una buona attività antivirale, paragonabile e in alcuni casi superiore al *lead* di riferimento, su entrambi i sistemi. In particolare, è stato dimostrato che i derivati di ARB sono inibitori della fusione su entrambi i virus e inibitori non selettivi della replicazione di HCV.

La seconda parte del presente progetto di ricerca ha riguardato lo studio del meccanismo d'azione anti-influenza di Arbidol. Ci sono evidenze sperimentali che dimostrano che ARB non influisce sull'attività della neuraminidasi virale (NA, una proteina di superficie del virus dell'influenza) ma attacca i primi stadi di post-assorbimento del ciclo di replicazione del virus con un possibile coinvolgimento della seconda proteina di superficie del virus, l'emoagglutinina (HA). Secondo alcuni studi, Arbidol potrebbe incrementare la stabilità dell'HA del virus dell'influenza e prevenire la sua transizione (indotta da basso pH) a stato fusiogenico; ciò bloccherebbe l'infezione allo stadio della fusione virale<sup>5</sup>. Sulla base di questa ipotesi, abbiamo condotto uno studio volto a valutare una eventuale interazione di Arbidol con il dominio di fusione idrofobico dell'emoagglutinina, localizzato all'estremità N-terminale della proteina. Perciò, è stato sintetizzato il peptide host-guest (P20H6, in cui il dominio di fusione guest è stato legato mediante un flessibile linker ad un peptide molto polare solubilizzante host) mediante l'impiego di tecniche di

sintesi peptidica in fase solida (SPPS) e sono stati condotti studi di *dicroismo circolare* (CD)<sup>6</sup>. Da questi studi è stato dimostrato che Arbidol interagisce con il dominio di fusione dell'HA a pH 5 e 7, e che tale interazione è predominante a pH fisiogenico.

L'ultima parte del presente progetto di ricerca è stata effettuata all'estero, in particolare presso l'Università di Aberdeen (Scozia), dove mi sono occupata della sintesi di un P.E.T. (Positron Emission Tomography) radiotracer per l'ipossia tumorale: il [<sup>18</sup>F]1- $\alpha$ -D-(5-Fluoro-5-deossiarabinofuranosil)-2-nitroimidazolo, noto come <sup>18</sup>F-FAZA. Il <sup>18</sup>F-FAZA è attualmente il *gold standard* per *PET Imaging* di patologie caratterizzate da ipossia (tumori solidi, ischemia, ictus)<sup>7</sup>, ma non è usato di routine e non è mai stato sintetizzato in Scozia. Il lavoro svolto, perciò, rappresenta un importante punto di partenza per l'introduzione del <sup>18</sup>F-FAZA in Scozia con l'obiettivo di un utilizzo in imaging clinico e in ricerca. In particolare, in seguito ad un dettagliato lavoro di ricerca bibliografica inerente il suddetto composto e la sua sintesi (non interamente e dettagliatamente riportata in letteratura) e ad una successiva ottimizzazione dello schema sintetico adoperato, è stato sintetizzato il precursore del <sup>18</sup>F-FAZA, il 1- $\alpha$ -D-[5'-O-Toluenesulfonyl-2',3'-Di-Oacetilarabinofuranosil]-2-nitroimidazolo (DAcTs-AZA).

- [1] Surinova B. N., Karpova N. A., Kumin Yu. C. (1995). *Khim. Farm. Zh.;Chem.-Pharm. J.*, 3, 14-15.
- [2] Eve-Isabelle Pe´cheur, Dimitri Lavillette, Fanny Alcaras, Jennifer Molle, Yury S. Boriskin, Michael Roberts, Francois-Loic Cosset, and Stephen J. Polyak; *Biochemistry* **2007**, 46, 6050-6059.
- [3] Yury S Boriskin<sup>1</sup>, Eve-Isabelle P´echeur and Stephen J Polyak; *Virology Journal* **2006**, 3:56:1-9.
- [4] Irina A. Leneva, Rupert J. Russell, Yury S. Boriskin, Alan J. Hay; *Antiviral Research* **2009**; 81:132–140.

- [5] Irina A. Leneva, Rupert J. Russell, Yury S. Boriskin, Alan J. Hay; *Antiviral Research*; 81 (2009) 132–140.
- [6] Xing Han, John H. Bushweller, David S. Cafiso and Lukas K. Tamm; *Nature Structural Biology*; **2001**, Volume 8 N.8.
- [7] Ernst J. Postema, Alexander J. B. McEwan, Terence A. Riauka, Piyush Kumar, Dacia A. Richmond, Douglas N. Abrams, Leonard I. Wiebe; *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (**2009**) 36:1565–1573.