

Curriculum vitae
di
Valentina Noemi Madia, PhD

Notizie Biografiche-Attività didattica

Valentina Noemi Madia, nata a Catanzaro il 25 Agosto 1987.

CARRIERA

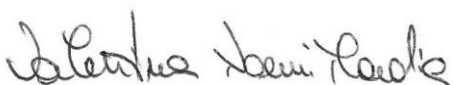
- 2013 - Laurea in Farmacia con lode presso l'Università "La Sapienza" di Roma;
- 2014 - Abilitazione alla professione di Farmacista;
- 2017 - PhD in "Scienze della Vita", Università degli Studi di Roma "La Sapienza";
- 2018-2019 – Post-doc presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco (Università "La Sapienza" di Roma), con un progetto dal titolo: "Progettazione e sintesi di nuovi derivati eterociclici come agenti anti-HIV-1"
- 2019-2020 – Post-doc presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco (Università "La Sapienza" di Roma), con un progetto dal titolo: "Progettazione e sintesi di nuovi derivati chinolonici come potenziali agenti anti-HIV-1"

ATTIVITA' DIDATTICA

Ha svolto attività seminariale e di assistenza didattica per i seguenti corsi:

- 2013-2014 Analisi dei Medicinali II (CTF);
- 2013-2020 Chimica Farmaceutica e Tossicologica II (Farmacia);
- 2016-2020 Ricerca e Sviluppo del Farmaco e Documentazione Scientifica (SFA).

Tutor di numerosi laureandi in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche ed in Farmacia per preparazione delle loro tesi compilative e sperimentali. Tutor di numerosi dottorandi.



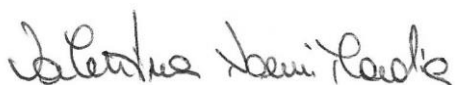
Ha partecipato a commissioni d'esame in qualità di cultore della materia per i seguenti corsi:

- 2019-2020 Esami di profitto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica II canali A-L (docente del corso prof.ssa Roberta Costi) e M-Z (docente del corso prof. Roberto Di Santo) del Corso di Laurea in Farmacia;
- 2019-2020 Esami di profitto di Ricerca e Sviluppo del Farmaco e Aspetti Regolatori (docente del corso prof. Roberto Di Santo) del corso di Laurea in Scienze Farmaceutiche Applicate.

Nel 2016 ha svolto attività di tutoraggio in Stechiometria (Farmacia) per un totale di 30 ore.

Nel 2016 ha fatto parte del Comitato Scientifico Organizzativo della VII edizione del "Biology and Molecular Medicine PhD Symposium" tenutosi presso l'Università "Sapienza" di Roma.

E' attualmente membro della Società Chimica Italiana, divisione di Chimica farmaceutica.



Attività Scientifica

Le ricerche hanno avuto inizio nel 2013 presso l'Università di Roma "La Sapienza" e si sono inizialmente rivolte alla sintesi di nuovi chemioterapici ad attività antiretrovirale.

Gran parte della produzione scientifica del candidato riguarda studi su chemioterapici ad attività antitumorale, antiparassitaria od antivirale.

L'attività di ricerca accademica ha portato a collaborazioni internazionali e ad interazioni anche con il mondo industriale con risvolti brevettuali ed applicativi: nel 2017 ha preso parte ad un progetto di ricerca su inibitori dell'enzima eparanasi come potenziali farmaci antitumorali, in collaborazione con la Sigma-Tau.

L'attività di ricerca è stata, quindi, incentrata nel campo della progettazione sintesi e sviluppo (Drug Design and Development, DDD) di nuovi farmaci ed esercitata con applicazione delle più moderne tecniche di ricerca nel campo farmaceutico, quali progettazione guidata da computer, sintesi classica, in parallelo e mediante riscaldamento a microonde (MW), chimica in flusso (flow chemistry).

In particolare essa è generalmente riferibile ai seguenti composti chemioterapici:

- a) composti ad attività antivirale (HIV, Chickungunya, polio)*
- b) composti ad attività antiparassitaria (parassiti del genere Plasmodium, Leishmania e Trypanosoma)*
- c) composti ad attività antitumorale (chemioterapici attivi su target specifici per una terapia personalizzata)*
- d) ricerche su sostanze attive sul S.N.C. (anti-Alzheimer)*
- e) estrazione e l'analisi fitochimica di sostanze naturali ottenute da matrici vegetali.*

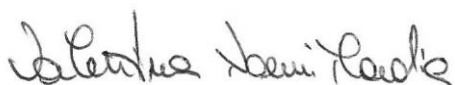
La suddetta attività di ricerca si esprime in 29 pubblicazioni, 3 comunicazioni orali e numerose comunicazioni poster a congressi internazionali e nazionali, 1 brevetto. Tale attività di ricerca è riassunta, tenendo conto dei principali lavori, da pagina 6 del presente curriculum vitae. Inoltre, i parametri bibliometrici possono essere riassunti come segue:

DATI al 16/10/2021:

IF Totale (15 pubblicazioni) = 143,149

IF Totale (15 pubblicazioni + 1 brevetto) = 143,149 + 1 IF medio del settore

IF Medio: 4,936



L'IF totale è calcolato utilizzando l'IF dell'anno di stampa ove possibile e, ove non presente, utilizzando IF dell'anno più vicino rilevabile in rete.

h_i (Scopus) = 10

Citazioni totali (Scopus) = 316

Numero medio di citazioni per pubblicazione (Scopus): 10,896

FINANZIAMENTI

Finanziamenti ottenuti, in **qualità di partecipante**:

- **Ateneo 2016** (responsabile scientifico: Prof.ssa Roberta Costi).
- **Ateneo 2017** (responsabile scientifico: Prof.ssa Roberta Costi).

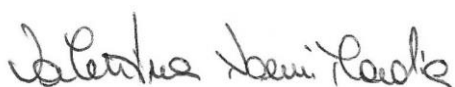
COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI

Ha preso parte a vari progetti in collaborazione con i seguenti gruppi di ricerca:

- Prof. Y. Pommier e Dott. C. Marchand, NHI, National Cancer Institute, Bethesda (USA), per ricerche su inibitori dell'integrasi di HIV;
- Prof. S. J. Le Grice, NHI, National Cancer Institute, Frederick (USA), per ricerche su inibitori dell'RNasi H di HIV;
- Prof. E. Tramontano, Università degli studi di Cagliari (Italia), per ricerche su inibitori dell'RNasi H di HIV;
- Prof. Z. Debyser, Università cattolica di Leuven (KUL) (Belgio) per studi su agenti anti-HIV;
- Dott. E. Rhoden e Dott. S. Oberste, CDC, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta (USA) per studi su agenti anti-poliovirus;
- Prof. Y. G. Zheng, Università di Georgia, (USA) per ricerche su inibitori di istone acetiltransferasi umana;
- Prof. S. Rivara e Prof. M. Mor, Università degli studi di Parma (Italia) per ricerche su inibitori di eparanasi;
- Dott. R. Brun, Swiss Tropical Institute Parasite Chemotherapy Basilea (Svizzera) per ricerche su nuovi antiprotozoari;
- Prof. L. Maes, Università di Anversa (Belgio) per ricerche su nuovi antiprotozoari;
- Prof. L. M. Podust, Università della California, per ricerche su inibitori del CYP51 di parassiti appartenenti alla famiglia *Trypanosomatidae*.

Ha inoltre collaborato con:

- IRBM, Pomezia (Italia) per ricerche su nuovi antiprotozoari;
- Alfasigma (ex Sigma-Tau), Pomezia (Italia) per ricerche su inibitori di eparanasi;
- Takis s.r.l., Roma (Italia) per ricerche su inibitori di eparanasi.



DESCRIZIONE ATTIVITA' DI RICERCA

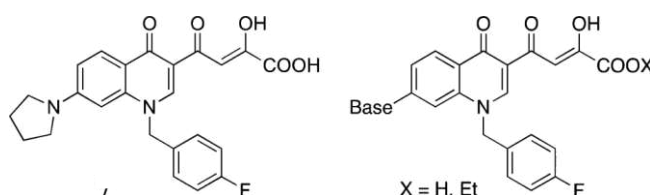
RICERCHE SU CHEMIOTERAPICI

Studi su composti ad attività anti-retrovirale (anti-HIV-1)

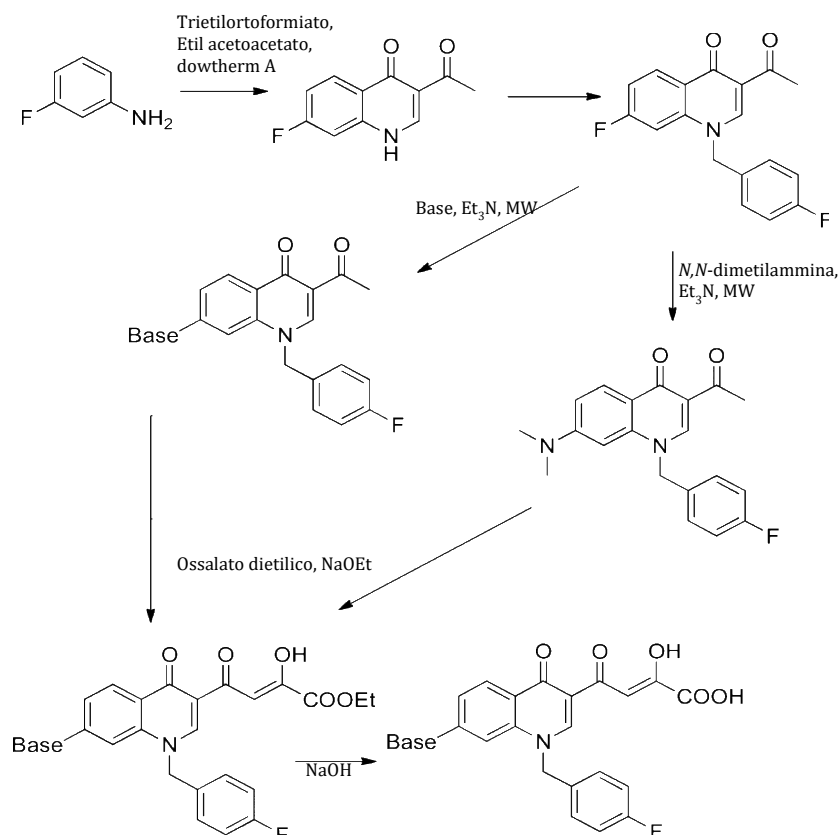
Inibitori di integrasi e ribonucleasi H

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) causata dal virus HIV rimane, a trent'anni dall'inizio del suo dilagare, una sfida terapeutica mondiale. Nonostante l'attuale polichemioterapia HAART abbia consentito il raggiungimento di innegabili successi, ad oggi numerose rimangono le problematiche irrisolte. Il regime farmacologico di combinazione di più farmaci con diverso meccanismo d'azione ha consentito di ridurre la comparsa di ceppi virali farmacoresistenti rispetto alla monoterapia, ma a causa della diminuzione della compliance da parte del paziente dovuta agli effetti collaterali ed alla complessità di somministrazione di più farmaci, ad oggi l'insorgenza della farmacoresistenza rimane il limite principale della terapia HAART. Pertanto, lo sviluppo di un composto capace di inibire simultaneamente due target virali potrebbe rappresentare una strategia produttiva nella lotta al virus HIV capace di ritardare l'insorgenza di resistenza, migliorare la compliance e ridurre effetti collaterali ed interazioni farmaco-farmaco. In particolare, risulta essere di grande interesse lo sviluppo di inibitori duali degli enzimi trascrittasi inversa (RT) e integrasi (IN). Quest'ultimo enzima è preposto al passaggio che prevede l'integrazione del DNA provirale nel DNA della cellula infettata. Esso catalizza due reazioni: la prima è costituita dalla scissione degli ultimi due nucleotidi da ciascuna delle parti 3'-terminali del DNA virale (definito 3'-processing, 3'-P); il secondo è l'attacco nucleofilo, delle parti terminali ottenute, sul cromosoma dell'ospite (chiamato strand transfer, ST). Inibitori duali di RT ed IN sono in grado di agire sul sito catalitico di IN e sulla funzione ribonucleasi H (RNasi H) della RT di HIV. Tale funzione della trascrittasi inversa è rilevante ai fini della retrotrascrizione. Essa è deputata all'idrolisi del filamento di RNA virale che ha funzionato da stampo per la sintesi del primo filamento di DNA provirale. Il sito catalitico della RNasi H ha infatti struttura e caratteristiche simili al sito catalitico dell'IN (due ioni magnesio complessati da due residui di aspartato ed uno di glutammato). Per questo motivo è stata studiata l'attività di questi agenti anti-HIV sia su IN che su RNasi H.

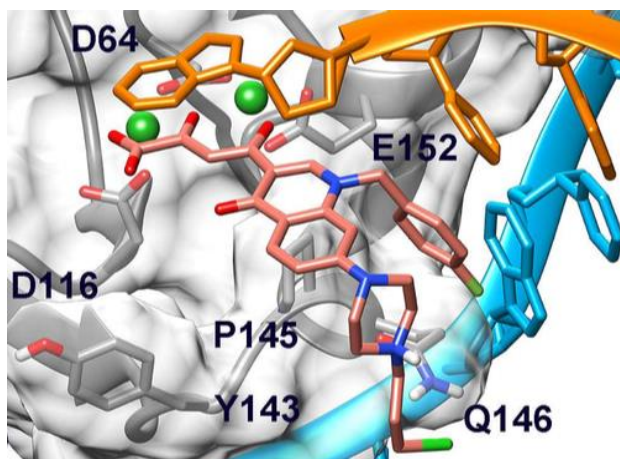
Inoltre, è interessante ricordare che ad oggi non vi sono farmaci in grado di inibire RNasi H. Molecole capaci di chelare i due atomi di magnesio mediante la porzione dichetoacida (DKA) sono state descritte come inibitori duali di IN e RNasiH. Pertanto, sono stati progettati e sintetizzati una serie di derivati chinolonici strutturalmente correlati ad un derivato chinolonico precedentemente identificato da questo gruppo di ricerca come inibitore submicromolare di IN ST caratterizzato da: una catena DKA in posizione 3, un *p*-fluorobenzile in posizione 1 ed un anello pirrolidinico in posizione 7. In particolare, abbiamo progettato e sintetizzato dei derivati chinolonici caratterizzati dalla catena DKA in posizione 3 e dall'anello *p*-fluorobenzilico, variando in sostituito basico in posizione 7. Inoltre, data la somiglianza strutturale tra IN e RNasi H, tali molecole sono state valutate per entrambe le attività biologiche.



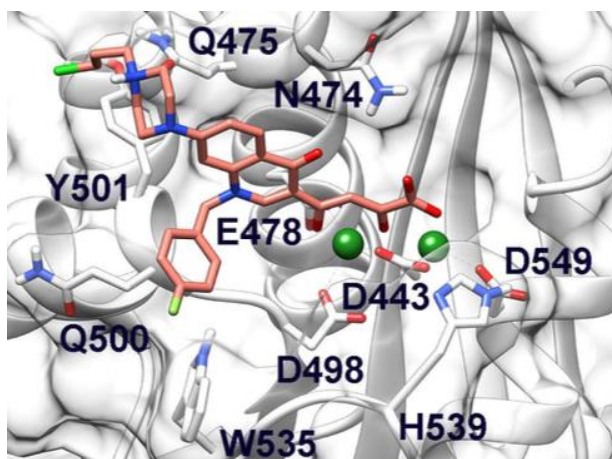
Questi composti sono stati sintetizzati a partire dalla 3-fluoroanilina che è stata sottoposta a condensazione termica in presenza di trietilortoformiato o acetoacetato di etile per ottenere l'anello chinolonico corrispondente, il quale è stato successivamente alchilato con *p*-fluorobenzil bromuro. In seguito a condensazione con ossalato di etile e idrolisi, sono stati ottenuti i derivati acidi finali.



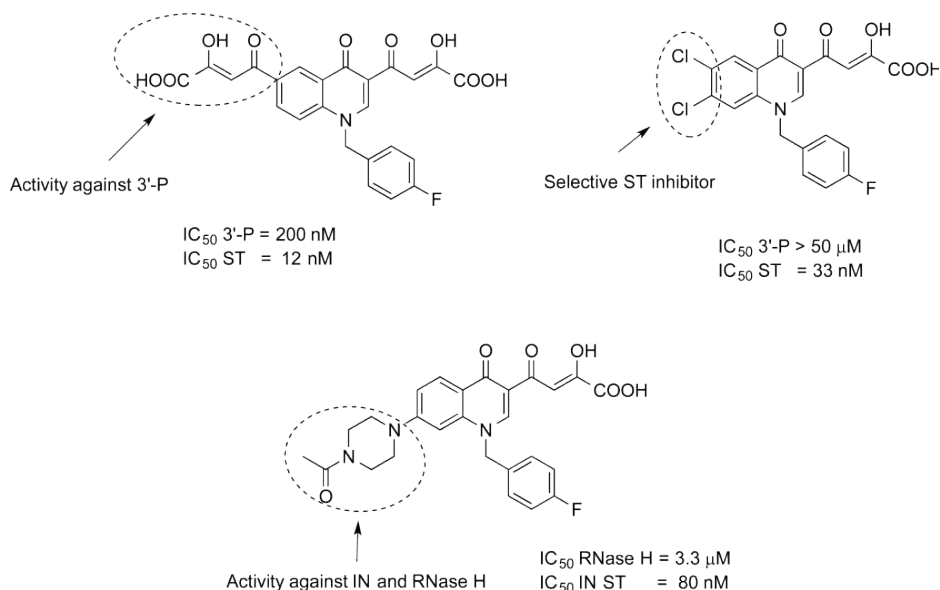
I derivati ottenuti si sono dimostrati potenti inibitori dell'IN in test enzimatici su rIN. In particolare, alcuni derivati hanno mostrato attività inibitoria nanomolare nei confronti dello step di ST di IN e solo marginale sul 3'-P di IN, essendo dotati inoltre di attività nel basso micromolare nei confronti di RNasi H, con buona attività antiretrovirale in cellule infettate. Abbiamo potuto dedurre che derivati chinolonici con sostituzioni bioisosteriche con anelli piperazinici rispetto al composto di riferimento, rappresentano inibitori potenti di ST di IN dotati di attività antivirale. Inoltre, si è dedotto che gli acidi sono dotati di maggiore attività su IN, mentre i corrispondenti esteri possiedono attività migliori su RNasi H, senza peraltro avere attività su RT. Inoltre, studi di docking condotti sul migliore inibitore di IN della serie nel core catalitico di IN hanno mostrato che la catena DKA si dispone in modo analogo al raltegravir (il primo farmaco inibitore di ST di IN introdotto in pratica clinica) e che sia lo scaffold chinolonico che l'anello *p*-fluorobenzilico instaurano interazioni produttive con vari residui amminoacidici al sito attivo e con il DNA virale.



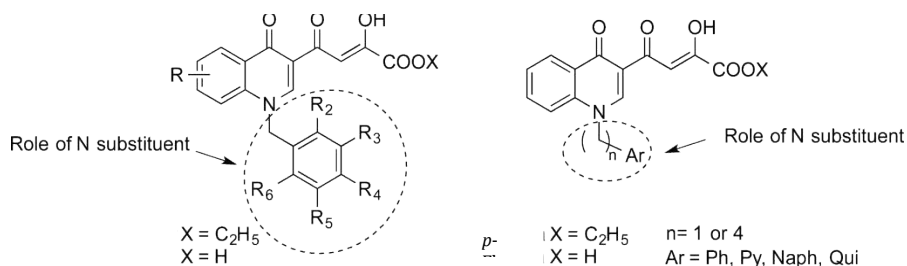
Analogamente, studi di docking di tale composto al sito attivo di RNasi H ha mostrato una pose di binding simile a quella al sito attivo di IN, suggerendo che il nostro inibitore di ST di IN condivide simili interazioni con il sito attivo di RNasi H.



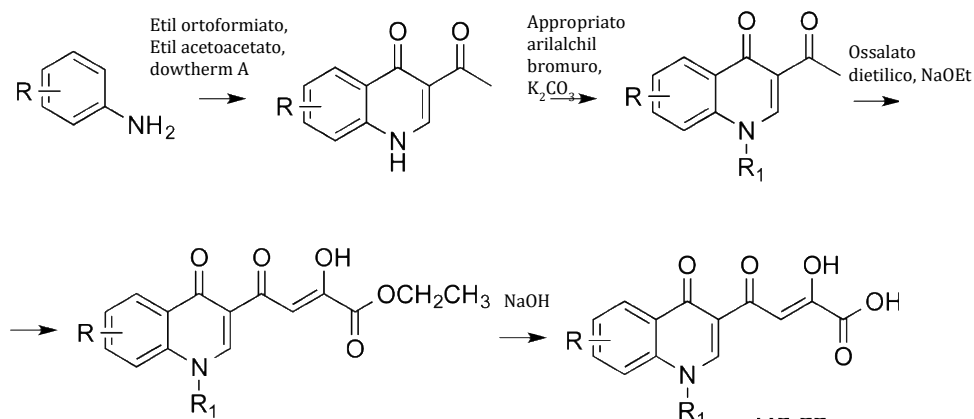
I risultati molto importanti ottenuti hanno spinto ad approfondire le indagini sui chinolonil DKA come inibitori di IN. Lavori precedenti avevano messo in evidenza come un secondo braccio DKA in posizione 6 del nucleo chinolonico potesse ridurre la selettività verso il 3'-P piuttosto che su ST di IN poiché in grado di interagire sia con il sito accettore che donatore del DNA, mentre l'introduzione di atomi di alogeno in posizione 6 e 7 dell'anello chinolonico incrementasse la selettività nei confronti dello step di ST. Infine, come evidenziato nel lavoro precedentemente descritto, la presenza di una funzione basica in posizione 7 del chinolone porta ad una discreta attività nei confronti sia di IN che di RNasi H. Abbiamo, così, deciso di esplorare le relazioni struttura-attività derivanti dalla modifica del sostituito legato all'azoto chinolonico.



In particolare, sono stati introdotti benzili variamente sostituiti o porzioni ariliche o eteroariliche in posizione 1 dell'anello chinolonico. Infatti, è noto che l'anello benzilico degli inibitori di ST è rilevante per il legame di questi inibitori al complesso IN/DNA.



La sintesi dei derivati in questione è stata realizzata partendo da una condensazione termica secondo Yoshizawa dell'opportuna anilina in presenza di trietilortoformiato e acetoacetato di etile per ottenere l'anello chinolonico corrispondente, il quale è stato successivamente alchilato con l'opportuno benzil bromuro. Dopo condensazione con ossalato di etile, il dichetoestere è stato idrolizzato in ambiente basico per ottenere i dicheto acidi finali.

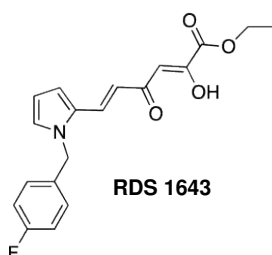


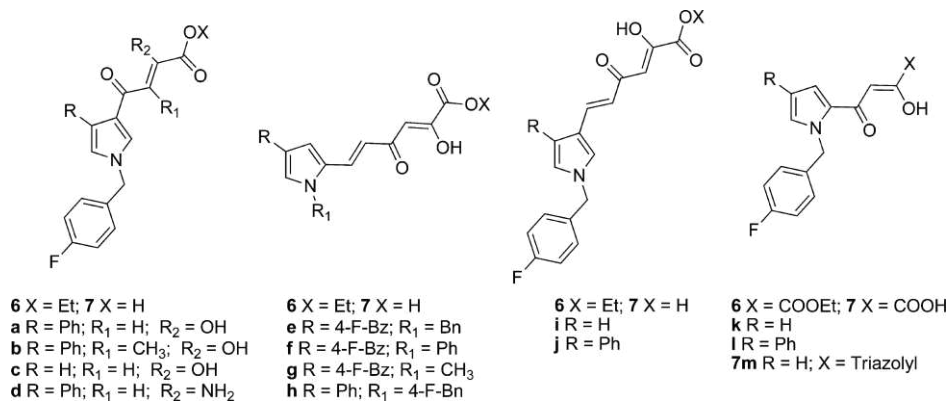
I derivati chinolonici hanno mostrato efficacia in cellule infettate e promettente attività inibitoria nei confronti dell'enzima IN, nell'ordine del sub-micromolare/nanomolare, ed hanno dimostrato di inibire marginalmente RNasi H. Inoltre, la potenza dei derivati acidi in saggi cellulari si è rivelata inferiore rispetto alle controparti esteree, suggerendo che gli acidi sono meno dotati di minore capacità di attraversamento della membrana cellulare. I derivati difluoro sostituiti sull'anello benzilico hanno riportato maggiore potenza inibitoria nei confronti di IN ed una discreta selettività per lo step di ST, mentre i dicloro sostituiti hanno mostrato migliore attività inibitoria nei confronti di RNasi H. Inoltre, è stato confermato il trend di attività secondo cui i derivati acidi hanno mostrato maggiore attività su IN mentre le controparti esteree nei confronti di RNasi H. Il derivato caratterizzato dal migliore profilo inibitorio nei confronti di IN (caratterizzato da un anello benzilico 2,4-difluoro sostituito) è stato sottoposto a studi di docking in complesso con il sito attivo di IN, mostrando una pose di binding analoga a quella del raltegravir. La catena DKA, infatti, si dispone in modo da chelare i due atomi di magnesio, mentre l'anello chinolonico instaura interazioni lipofile e l'anello benzilico si inserisce nella tasca di legame del DNA virale con un meccanismo "induced-fit" analogo a quella degli inibitori dello step di ST di IN.

Gli ottimi risultati ottenuti ci hanno spinto a proseguire le ricerche in questo campo. In particolare, tenendo in considerazione la semplicità di funzionalizzazione dell'anello pirrolico da un punto di vista sintetico e che tale scaffold è presente in vari farmaci, abbiamo progettato nuovi dicheto acidi basati su uno scaffold pirrolico. Pertanto, abbiamo progettato inibitori di IN che avessero contemporaneamente la porzione DKA e l'anello pirrolico come porzione arilica. A partire da una serie di pirrolidicheto esenoici analoghi dell'estere etilico dell'acido 6-[1-(4-fluorofenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-diosso-5-esenoico (RDS 1643) precedentemente identificati come potenti inibitori di IN (nel range del nanomolare) e attivi anche su RNasi H nell'ordine del

micromolare, sono stati progettati e sintetizzati una serie di derivati pirrolici DKA al fine di implementare studi di relazione struttura-attività. In particolare, partendo dalla struttura di RDS 1643 sono state apportate una o più delle seguenti modifiche: (i) introduzione di un sostituito aromatico in posizione 4 dell'anello pirrolico; (ii) shift della catena dicheto esenoica dalla posizione 2 alla posizione 3 del pirrolo; (iii) accorciamento della catena dicheto esenoica in una dicheto butanoica; (iv) introduzione di gruppi arilici o alchilici in sostituzione dell'anello *p*-fluorobenzilico; (v) sostituzione del gruppo acido carbossilico con un anello triazolico; (vi) introduzione di un gruppo alchilico nella catena DKA; (vii) sostituzione del gruppo chetonico della catena DKA con un gruppo NH₂.

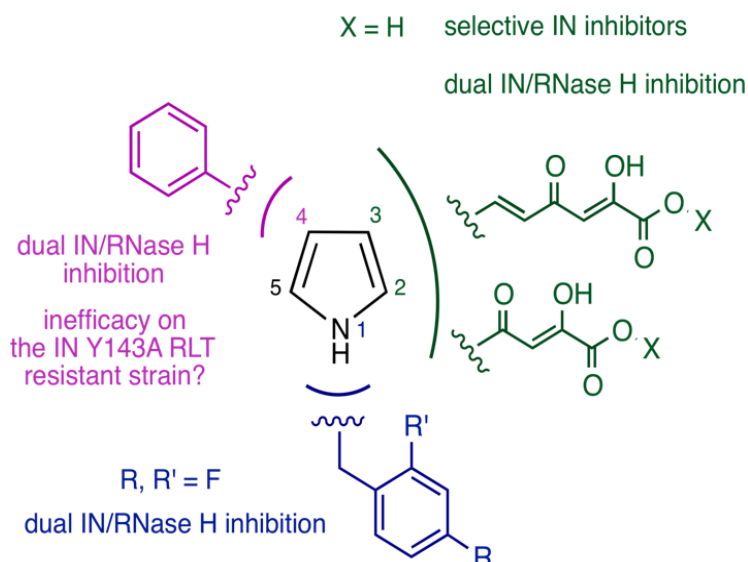
I nuovi derivati sintetizzati hanno mostrato attività nanomolare anti-IN in saggi enzimatici, e ottima attività in test su cellule infettate da HIV-1 insieme a bassa citotossicità. Inoltre, i derivati pirrolici hanno riportato moderata attività nei confronti di RNasi H, confermando il trend secondo cui gli esteri risultano essere più attivi su RNasi H mentre le controparti acide mostrano maggiore potenza su IN. Pertanto, sebbene il gruppo acido conferisca maggiore attività su IN, la funzione esterea risulta essere necessaria per un'attività duale. Inoltre, è stato possibile concludere che: i) la catena dichetobutanoica può essere rimpiazzata da quella dichetoesenoica; ii) la catena DKA non può essere modificata con l'inserimento di altri gruppi; iii) la catena DKA può essere legata in posizione 2 o 3 dell'anello pirrolico; iv) l'anello *p*-fluorobenzilico è necessario per l'attività; v) un fenile può essere introdotto in posizione 4 dell'anello pirrolico (*J. Med. Chem.* **2015**, 58, 1915-1928).



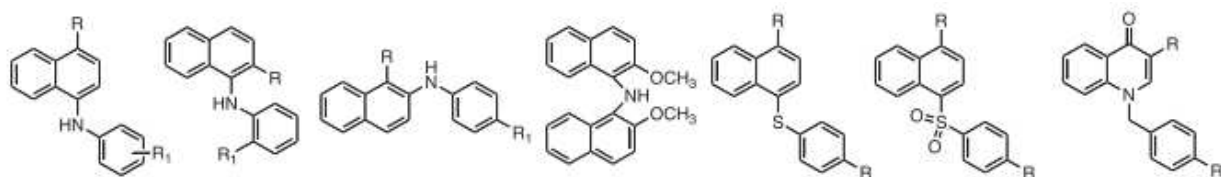


Al fine di razionalizzare i risultati ottenuti con gli inibitori a struttura pirrolil DKA, sono stati condotti studi di docking al sito attivo di IN con lo scopo di: i) valutare le interazioni degli inibitori con i residui amminoacidici dell'enzima noti per essere responsabili di farmacoresistenza agli attuali inibitori di ST in clinica; ii) confrontare le interazioni produttive instaurate da tali inibitori al sito attivo di IN con quelle al sito attivo di RNasi H e poter, così, confermare le caratteristiche strutturali riconducibili ad attività inibitoria duale.

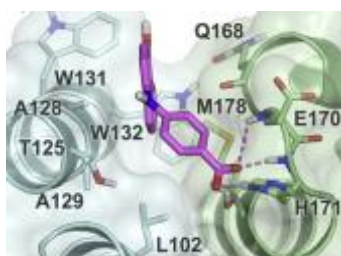
Tali studi hanno evidenziato che i derivati pirrolil DKA in esame chelano i due atomi di magnesio al sito attivo ed interagiscono con il DNA virale con meccanismo "induced-fit" analogo agli attuali farmaci anti-IN. In particolare, i derivati pirrolici interagiscono con una tasca creata dallo spizzamento del DNA virale mediante l'anello *p*-fluorobenzilico o il fenile in posizione 4 a seconda della distanza tra il sostituito aromatico e la porzione DKA e/o della lunghezza della catena. Inoltre, i risultati degli studi di docking hanno mostrato come tali derivati pirrolici non interagissero con residui che notoriamente conferiscono resistenza a farmaci anti-IN quali il raltegravir, come confermato anche da esperimenti di mutagenesi (ad esempio nel caso dei mutanti Y143A e N155H). I dati ottenuti ci hanno consentito di delineare le principali caratteristiche di tali derivati utili per poter ottenere inibitori duali IN/RNasi H (*Antiviral Res.* **2016**, *134*, 236-243).



Dopo l'avvento sul mercato anche del farmaco anti-IN dolutegravir dotato di alta efficacia anche contro i ceppi virali resistenti ai farmaci inibitori di ST di generazione precedente, l'interesse si è spostato anche su altri approcci nell'inibire il processo di integrazione. Uno di questi approcci è quello di bloccare l'interazione proteina-proteina tra l'IN e cofattori cellulari o virali. Tra le più studiate è l'interazione IN e fattore cellulare LEDGF/p75, essenziale perchè la replicazione virale proceda. E' stata individuata una classe di nuovi agenti che impediscono l'interazione IN-LEDGF, costituita da un gruppo di arilnaftilammine e derivati ad esse strutturalmente correlate che hanno mostrato azione inibente a concentrazione micromolare (*Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 101, 288-294).

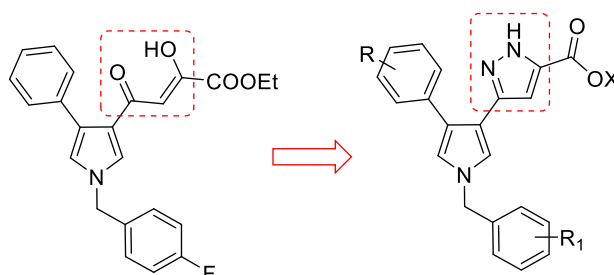


Il derivato più potente della serie è stato anche esaminato in studi di docking al sito di legame di LEDGF/p75 che hanno evidenziato una pose di legame analoga a quella del primo inibitore descritto dell'interazione LEDGF/p75-IN.

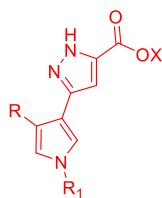


Tuttavia, sebbene particolarmente promettenti, i derivati DKA sono caratterizzati da diversi limiti legati al profilo farmacocinetico. Infatti, la catena DKA è responsabile della scarsa solubilità, dell'alto turnover metabolico e della bassa permeabilità attraverso la membrana cellulare. Inoltre, è stata dimostrata una diminuzione tempo-dipendente dell'attività in soluzione a temperatura ambiente, anche per brevi periodi. Pertanto, sono stati sintetizzati nuove molecole che hanno la caratteristica di non possedere la funzione DKA. In particolare, sono stati progettati e sintetizzati derivati non-DKA caratterizzati da uno scaffold pirrolil-pirazolico e chinolonico.

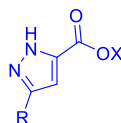
La serie dei derivati pirrolil-pirazolici è stata progettata a partire da un derivato pirrolico DKA precedentemente descritto in letteratura come inibitore di RNasi H. In particolare, la catena DKA è stata sostituita con un anello pirazolico.



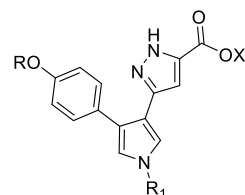
Inoltre, mantenendo come costante strutturale la porzione pirrolil-pirazolil carbossilica, sono stati sintetizzati nuovi analoghi caratterizzati da una o più delle seguenti modifiche: (i) rimozione del sostituente in posizione 1 o 4 dell'anello pirrolico; (ii) introduzione di vari sostituenti alchilici o arilalchilici al posto dell'anello *p*-fluorobenzilico; (iii) la sostituzione del fenile con un gruppo nafti-2-ilico in posizione 4 del nucleo pirrolico.



- 6a X = Et; R = Ph; R₁ = 4-F-Bn
 7a X = H; R = Ph; R₁ = 4-F-Bn
 6b X = Et; R = H; R₁ = H
 7b X = H; R = H; R₁ = H
 6c X = Et; R = H; R₁ = 4-F-Bn
 7c X = H; R = H; R₁ = 4-F-Bn
 6d X = Et; R = Ph; R₁ = H
 7d X = H; R = Ph; R₁ = H
 6e X = Et; R = Ph; R₁ = CH₃
 7e X = H; R = Ph; R₁ = CH₃
 6f X = Et; R = Ph; R₁ = CH₂-Napht-1-yl
 7f X = H; R = Ph; R₁ = CH₂-Napht-1-yl
 6g X = Et; R = Ph; R₁ = (CH₂)₄Ph
 7g X = H; R = Ph; R₁ = (CH₂)₄Ph
 6h X = Et; R = Napht-2-yl; R₁ = 4-F-Bn
 7h X = H; R = Napht-2-yl; R₁ = 4-F-Bn



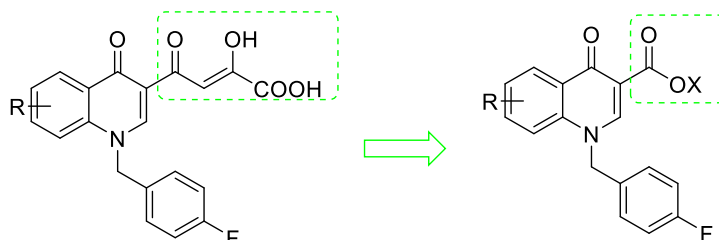
- 8a X = Et; R = Me
 9a X = H; R = Me
 8b X = Et; R = Ph
 9b X = H; R = Ph
 8c X = Et; R = Biphenyl-2-yl
 9c X = H; R = Biphenyl-2-yl



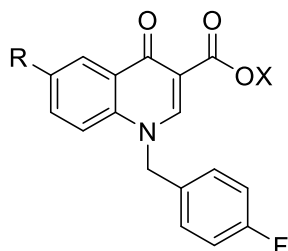
- 10a X = Et; R = Bn; R₁ = 4-F-Bn
 11a X = H; R = Bn; R₁ = 4-F-Bn
 10b X = Et; R = (CH₂)₄Ph; R₁ = 4-F-Bn
 11b X = H; R = (CH₂)₄Ph; R₁ = 4-F-Bn
 10c X = Et; R = (CH₂)₄Ph; R₁ = CH₂-Napht-1-yl
 11c X = H; R = (CH₂)₄Ph; R₁ = CH₂-Napht-1-yl
 10d X = Et; R = CH₂-Napht-1-yl; R₁ = 4-F-Bn
 11d X = H; R = CH₂-Napht-1-yl; R₁ = 4-F-Bn
 10e X = Et; R = CH₂-Napht-1-yl; R₁ = CH₂-Napht-1-yl
 11e X = H; R = CH₂-Napht-1-yl; R₁ = CH₂-Napht-1-yl
 10f X = Et; R = N-Ph-4-carboxyacetamide; R₁ = 4-F-Bn
 11f X = H; R = N-Ph-4-carboxyacetamide; R₁ = 4-F-Bn
 10g X = Et; R = N-Phenylacetamide; R₁ = 4-F-Bn
 11g X = H; R = N-Phenylacetamide; R₁ = 4-F-Bn
 10h X = Et; R = N-Phenylacetamide; R₁ = CH₂-Napht-1-yl
 11h X = H; R = N-Phenylacetamide; R₁ = CH₂-Napht-1-yl
 10i X = Et; R = (CH₂)₅Ph; R₁ = 4-F-Bn
 11i X = H; R = (CH₂)₅Ph; R₁ = 4-F-Bn

I nuovi composti sintetizzati hanno dimostrato di essere buoni inibitori di RNasi H, in particolare la sottoserie dei derivati ossifenilpirrolil-pirazolici che hanno riportato attività inibitorie nel range del basso micromolare/submicromolare, con bassa citotossicità e buona attività su cellule infette. Inoltre, tutti i composti testati hanno mostrato selettività per RNasi H rispetto a integrasi. Studi di docking accoppiati con esperimenti di mutagenesi hanno mostrato le porzioni rilevanti ai fini dell'attività, mostrando inoltre la capacità di interagire con residui altamente conservati del target enzimatico isolati da pazienti affetti da varianti resistenti del virus (*ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*(5), 798-805).

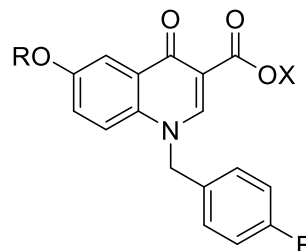
Per quanto concerne il lavoro sui derivati chinolonici, essi sono stati progettati a partire dalla struttura di un derivato chinolonico DKA descritto in letteratura, sostituendo la catena DKA con una funzione acida carbossilica in posizione 3 dell'anello chinolonico la quale, insieme al carbonile in posizione 4, potesse mimare la capacità chelante della catena DKA.



I nuovi composti sintetizzati sono caratterizzati da una o più delle seguenti modifiche: (i) introduzione di un atomo di idrogeno o un gruppo ossidrilico; (ii) diversi gruppi eterici caratterizzati da diversi gradi di libertà o di ingombro sterico; (iii) gruppi acetile, ciano, nitro, trifluorometile o metilsulfonile; (iv) una porzione fenilpropenonica.



- 4a** X = H; R = H
-5a X = Et; R = H
4b X = H; R = CN
5b X = Et; R = CN
4c X = H; R = CF₃
5c X = Et; R = CF₃
4d X = H; R = COCH₃
5d X = Et; R = COCH₃
4e X = H; R = NO₂
5e X = Et; R = NO₂
4f X = H; R = SO₂CH₃
5f X = Et; R = SO₂CH₃
4g X = H; R = OH
5g X = Et; R = OH
4h X = H; R = OCH₃
5h X = Et; R = OCH₃
4i X = H; R = OPh
5i X = Et; R = OPh
4k X = H; R = (E)-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl
5k X = Et; R = (E)-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl



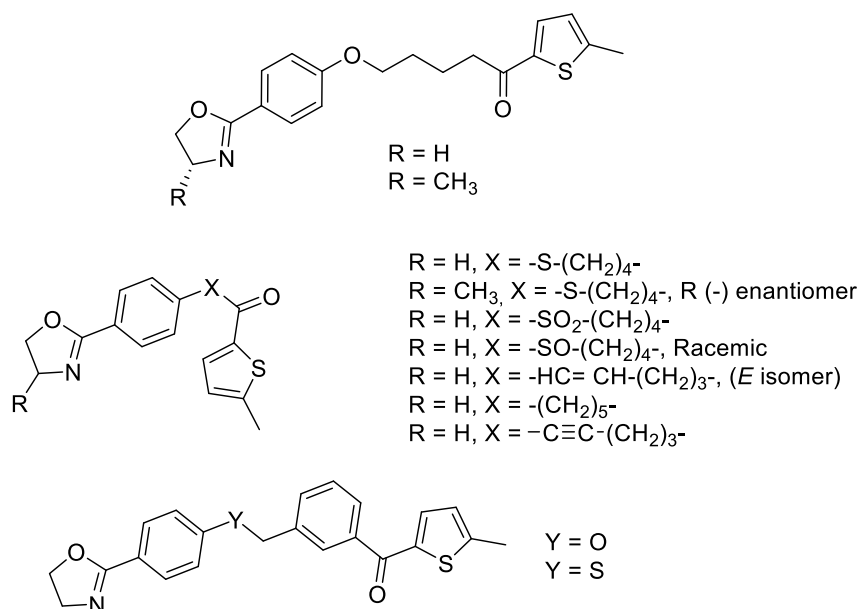
- 4j** X = H; R = 3-(dimethylamino)propyl
5j X = Et; R = 3-(dimethylamino)propyl
4l X = H; R = Bn
5l X = Et; R = Bn
4m X = H; R = CH₂-2,3-Cl₂Ph
5m X = Et; R = CH₂-2,3-Cl₂Ph
4n X = H; R = CH₂-3,4-Cl₂Ph
5n X = Et; R = CH₂-3,4-Cl₂Ph
4o X = H; R = CH₂-napht-1-yl
5o X = Et; R = CH₂-napht-1-yl
4p X = H; R = CH₂-napht-2-yl
5p X = Et; R = CH₂-napht-2-yl
4q X = H; R = CH₂-Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl
5q X = Et; R = CH₂-Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl
4r X = H; R = (CH₂)₄Ph
5r X = Et; R = (CH₂)₄Ph
4s X = H; R = CH₂-[1,1']Biphenyl
5s X = Et; R = CH₂-[1,1']Biphenyl
4t X = H; R = CH₂-Phen-4-oxybenzyl
5t X = Et; R = CH₂-Phen-4-oxybenzyl

Tra i nuovi derivati sintetizzati, i chinoloni arilmetilossiacidi hanno mostrato il miglior profilo inibitorio con attività nel range del micromolare/basso micromolare, con promettente attività su cellule infette senza citotossicità. Studi di docking accoppiati con esperimenti di mutagenesi hanno consentito una razionalizzazione dei risultati ottenuti, mostrando inoltre la capacità di interagire con residui altamente conservati del target enzimatico isolati da pazienti affetti da varianti resistenti del virus. Inoltre, i nuovi derivati hanno mostrato selettività per RNasi H rispetto a integrasi, con un'attività non selettiva nei confronti della funzione polimerasica della trascrittasi inversa di HIV (*J. Med. Chem.* **2021**, 64(12), 8579–8598).

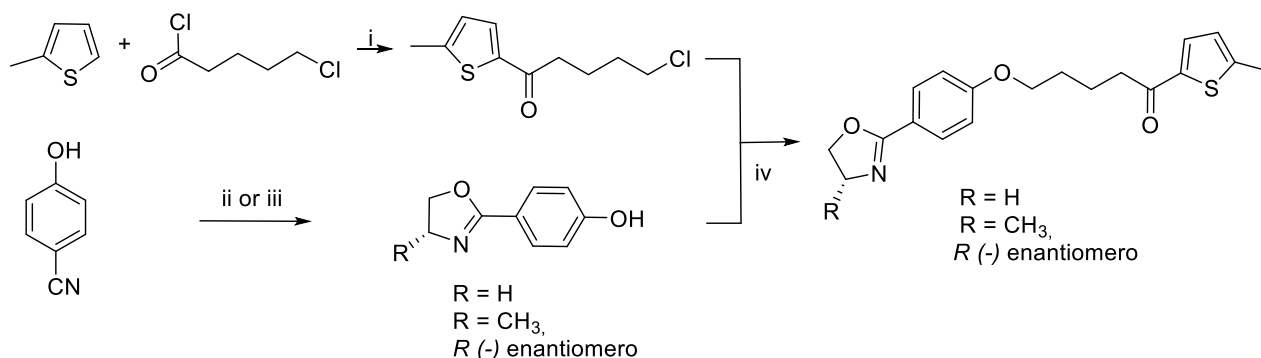
Studi su composti ad attività antivirale (antipolio)

Inibitori del poliovirus

Il poliovirus (PV), agente eziologico della poliomielite, è un enterovirus a RNA appartenente alla famiglia Picornaviridae. Sebbene oggi sia diffuso solo in pochi paesi, rappresenta tuttavia un rischio per la salute umana in quanto non è stato ancora eradicato a livello globale. L'attuale strategia clinica consiste nella prevenzione (mediante l'impiego di due tipi di vaccino: il Sabin, con poliovirus attenuati, ed il Salk, con poliovirus inattivati) e nell'impiego di farmaci antivirali in caso di infezioni croniche o persistenti in soggetti immunodeficienti. Tuttavia, ad oggi non sono disponibili agenti antivirali specifici per l'infezione da poliovirus e soltanto due candidati farmaci sono in trial clinico (un inibitore dell'enzima virale proteasi ed un inibitore dell'uncoating) mentre altri due agenti inibenti l'uncoating sono in fase di valutazione. Nondimeno è da valutare la problematica dell'insorgenza di varianti virali che potrebbero dar vita al fenomeno della farmacoresistenza. Recentemente abbiamo individuato una serie di 3(2*H*)-isoflaveni come blandi agenti anti-PV in grado di prevenire l'entry virale con meccanismo analogo all'inibitore dell'uncoating in trial clinico. Tuttavia, test in vitro su tali composti hanno evidenziato la comparsa di ceppi virali mutanti ed, inoltre, tentativi di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche di tali molecole hanno condotto a scarsi risultati. Abbiamo, pertanto, condotto uno screening sulla nostra libreria di molecole con lo scopo di individuare scaffold alternativi a quello degli isoflaveni summenzionati ma in grado di sortire attività inibitoria nei confronti del target virale. Abbiamo, così, individuato due derivati 5-(4-(4,5-diidroossazol-2-il)-fenossi)-1-(5-metiltiofen-2-il)pentan-1-onici con attività submicro/micromolare nei confronti dei ceppi Sabin 1, 2 e 3 di poliovirus. Al fine, quindi, di poter condurre studi SAR, sono stati sintetizzati una serie di analoghi dei composti hit individuati caratterizzati da modifiche a carico del linker ossialchilcarbonilico a ponte tra le due porzioni ariliche (un anello tienilico ed uno fenilico) degli hits.



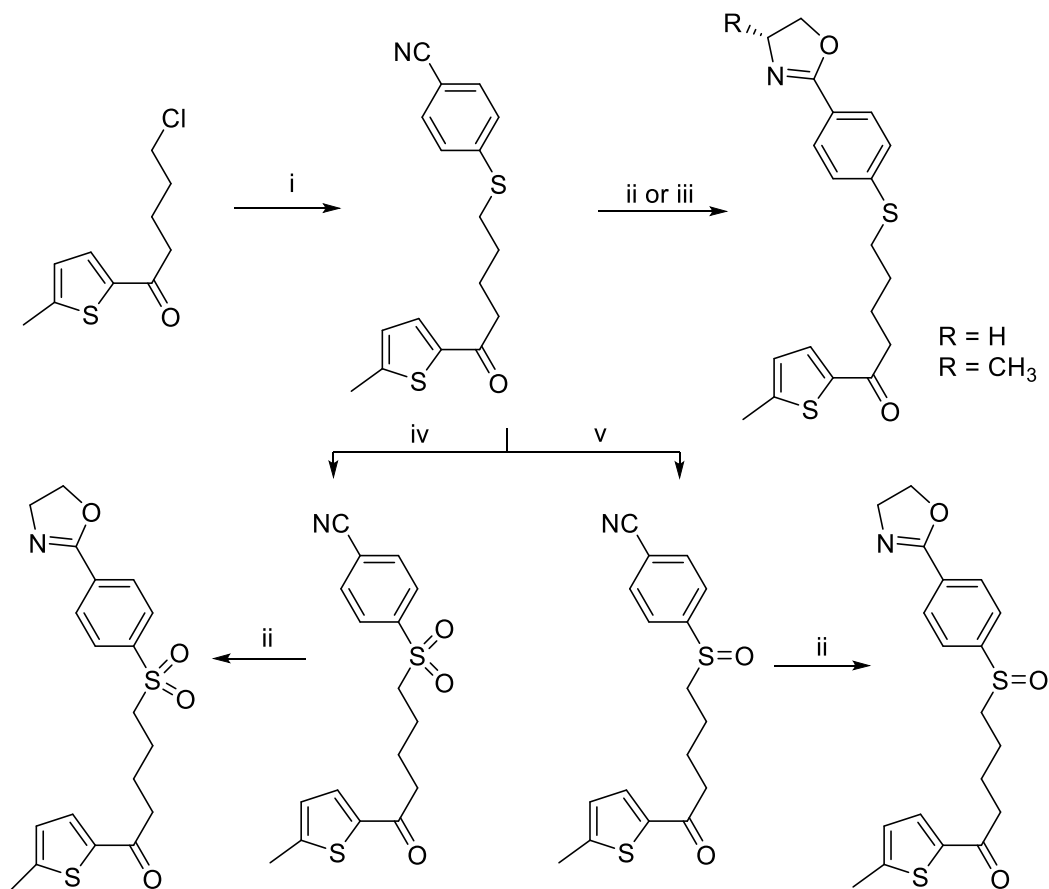
La sintesi degli hits è stata condotta mediante acilazione di Friedel-Craft del 2-metiltiofene che ha condotto al corrispondente derivato acilato il quale è stato successivamente sottoposto a reazione di sostituzione nucleofila alifatica in presenza dell'opportuno fenolo (previamente sintetizzato per reazione del 4-idrossibenzonitrile con l'appropriata etanolammina in presenza di cloruro di zinco.



Reagenti: (i) $AlCl_3$; (ii) etanolammina, $ZnCl_2$; (iii) (R)-(-)-2-ammino-1-propanolo, $ZnCl_2$; (iv) K_2CO_3 , NaI .

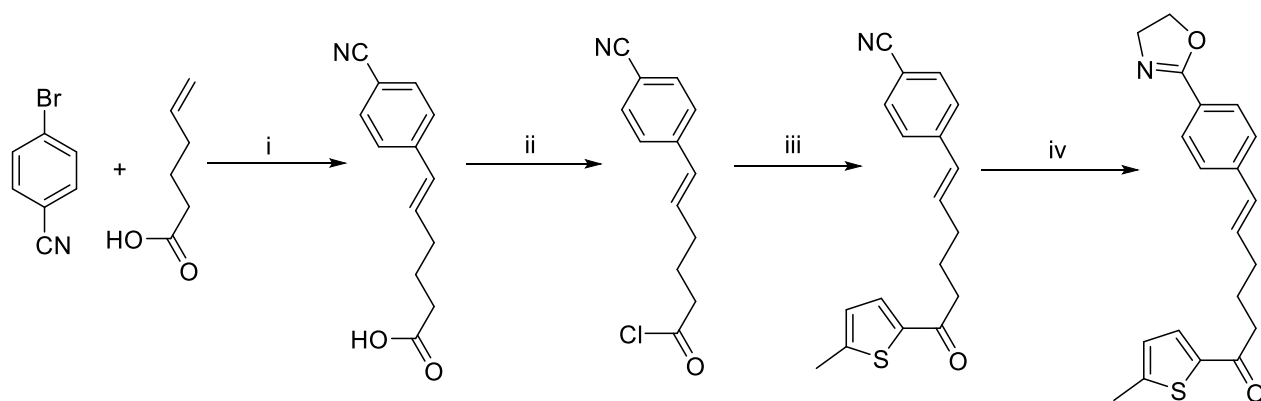
I derivati caratterizzati dalla sostituzione dell'atomo di ossigeno del linker dei composti hit con uno zolfo, un gruppo solfinilico o uno solfonilico sono stati sintetizzati per reazione di sostituzione nucleofila alifatica del 4-mercaptobenzonitrile con l'intermedio acilico ad ottenere il tioetere desiderato che è stato poi sottoposto a reazione di formazione dell'anello ossazolinico con l'opportuna etanolammina in presenza di silice funzionalizzata con acido propilsolfonico. Infine,

per reazione di ossidazione dell'intermedio tioetereo con *m*CPBA, or H₂O₂/POCl₃ sono stati ottenuti, rispettivamente, il derivato solfonico e quello solfinilico che per reazione di formazione dell'anello ossazolinico, condotta in condizioni analoghe a quelle descritte precedentemente, hanno fornito gli ossazolinil derivati corrispondenti.



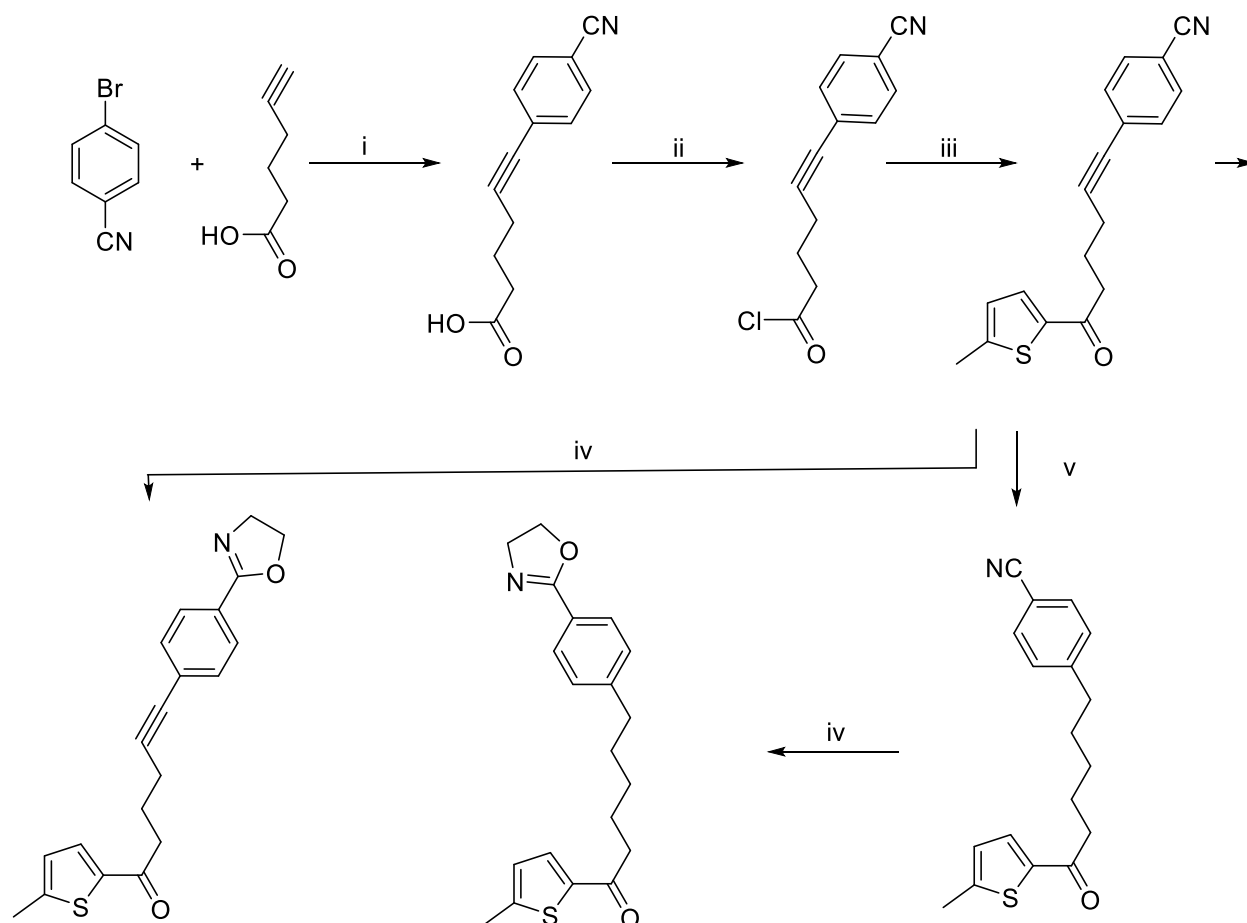
Reagenti: (i) 4-mercaptobenzonitrile, K₂CO₃; (ii) etanolammina, Si-acido propilsolfonico; (iii) (R)-(-)-2-ammino-1-propanolo, Si-acido propilsolfonico; (iv) *m*CPBA; (v) H₂O₂, POCl₃.

La sintesi del derivato caratterizzato dalla sostituzione dell'ossigeno del composto hit con un metilene è stata condotta per reazione di Heck del 4-bromobenzonitrile con l'acido 5-esenoico e successivamente convertito nel corrispondente acil cloruro prima di essere sottoposto a reazione di acilazione di Friedel-Craft in presenza del 2-metiltiofene. Segue, infine, una reazione di formazione dell'anello ossazolinico in modo analogo a quello descritto in precedenza.



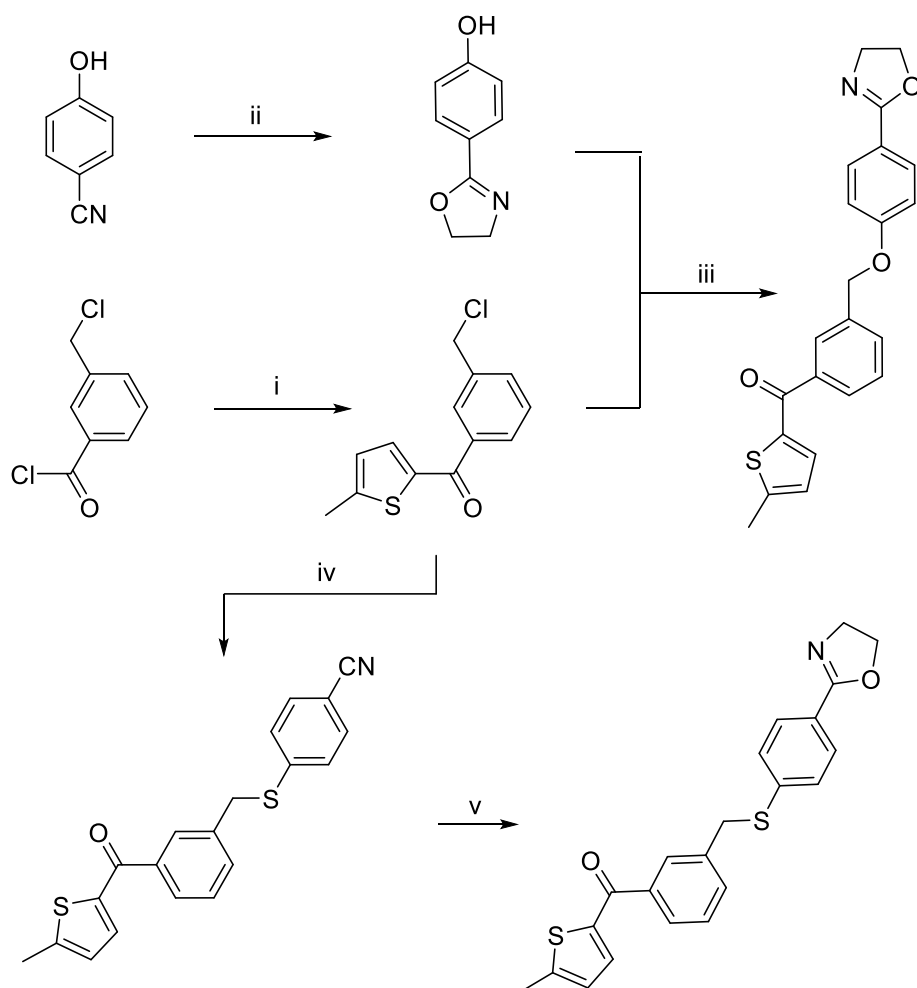
Reagenti: (i) TBACl, Pd(OAc)₂, PPh₃, KOAc; (ii) cloruro di ossalile; (iii) 2-metiltiofene, AlCl₃; (iv) etanolammina, Si-acido propilsolfonico.

I derivati caratterizzati dalla sostituzione dell'atomo di ossigeno dell'hit con un etilene o un etino sono stati ottenuti mediante reazione di Heck del 4-bromobenzonitrile con l'acido 5-esinoico e successivamente convertito nel corrispondente acil cloruro prima di essere sottoposto a reazione acilazione di Friedel-Craft in presenza del 2-metiltiofene. Segue, infine, una reazione di formazione dell'anello ossazolinico in modo analogo a quello descritto precedentemente per il derivato alchinico mentre il corrispondente analogo saturo è stata condotta una previa reazione di riduzione del triplo legame con Pd/C in atmosfera saturata d'idrogeno.



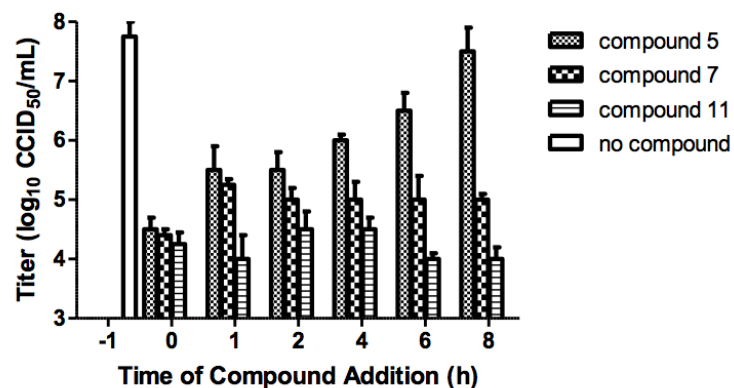
Reagenti: (i) TBACl, Pd(OAc)₂, PPh₃, KOAc; (ii) cloruro di ossalile; (iii) 2-metilthiofene, AlCl₃; (iv) etanolamina, Si-acido propilsolfonico; (v) Pd/C, H₂.

Infine i composti caratterizzati da uno spaziatore fenilico ed un atomo di zolfo o ossigeno sono stati sintetizzati a partire dal 2-metilthiofene che è stato sottoposto a reazione di acilazione di Friedel-Craft con il 3-clorometilbenzoil cloruro e successivamente a reazione di sostituzione nucleofila alifatica in presenza dell'intermedio fenolico, ad ottenere il corrispondente derivato ossazolinico, o in presenza del 4-mercaptobenzonitrile (nel caso del derivato caratterizzato da un atomo di zolfo) prima di essere sottoposto a reazione di formazione dell'anello ossazolinico in condizioni analoghe alle precedenti.



Reagenti: (i) 2-metiltofene, AlCl_3 ; (ii) etanolamina, ZnCl_2 ; (iii) K_2CO_3 ; (iv) 4-mercaptobenzonitrile, K_2CO_3 ; (v) etanolamina, , Si-acido propilsolfonico.

I derivati neosintetizzati hanno mostrato incoraggiante attività inibitoria e tra essi i risultati migliori sono stati riscontrati con i composti caratterizzati dalla presenza di un ponte tioetereo o da una porzione stilirica a carico del linker alifatico. In particolare, tali derivati si sono mostrati attivi nei confronti di tutti i tre ceppi Sabin nel range del submicromolare con citotossicità molto bassa. Degno di nota, inoltre, il derivato stilirico ha mostrato attività inibitoria nel nanomolare nei confronti di un ampio pannello di ceppi di poliovirus wild-type e/o isolati da pazienti con paralisi flaccida o immunocompromessi.



Inoltre, esperimenti di time-of-addition condotti sul composto hit hanno mostrato che esso è attivo nelle primissime fasi della replicazione virale, mentre il derivato stirilico si è mostrato attivo durante diverse fasi dell'infezione, suggerendo un meccanismo d'azione differente (*J. Med. Chem.* **2019**, 62, 798-810).

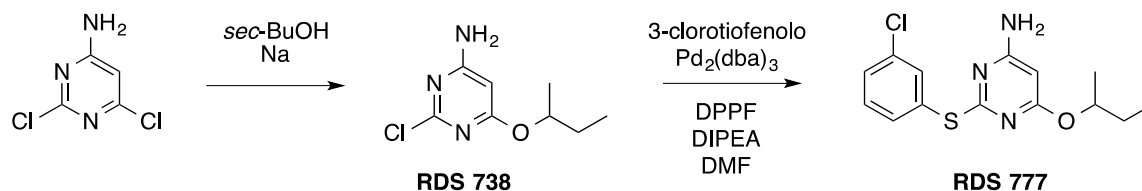
Studi su composti ad attività antiprotozoaria

Inibitori di tripanotione reduttasi

Negli ultimi anni si è accesa l'attenzione su patologie che precedentemente erano trascurate perché le aziende farmaceutiche non intravedevano in tale settore adeguati margini di guadagno.

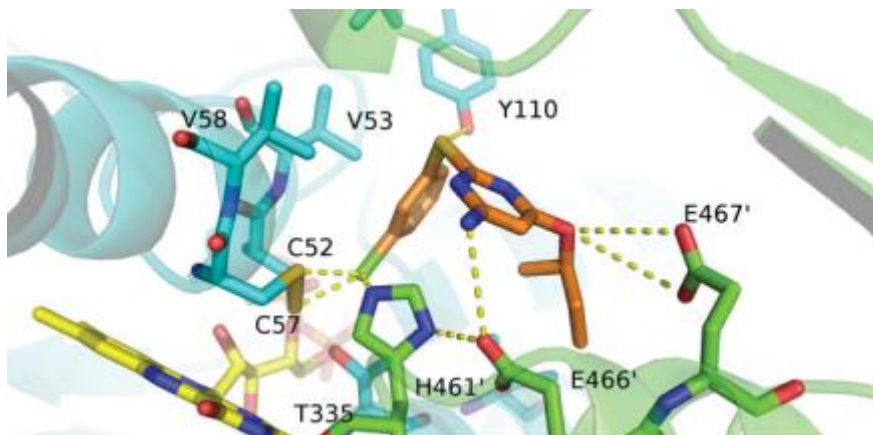
Tra queste patologie senza'altro hanno gran rilievo le malattie causate da protozoi quali il morbo di Chagas e la leishmaniosi. Una delle strategie più promettenti nella lotta a tali patologie, è l'inibizione di target esclusivi dei prassiti, quali l'enzima tripanotione reduttasi (TR). Tale enzima, infatti, svolge un ruolo essenziale per la sopravvivenza del parassita poiché rappresenta il principale sistema di detossificazione dallo stress ossidativo, ruolo che nell'uomo è svolto dall'enzima glutatione reduttasi. Tra gli inibitori di TR descritti in letteratura, si annoverano derivati a struttura diaril solfurea. Abbiamo, pertanto, condotto un semi-random screening sulla nostra libreria di composti valutandone l'attività su *Leishmania* in saggi cellulari di una serie di derivati a struttura diarilsolfurea precedentemente sintetizzati come agenti anti-HIV. Tra essi, è emerso il composto 6-(sec-butoossi)-2-((3-clorofenil)tio)pirimidin-4-ammina (RDS 777) che si è dimostrato in grado di inibire la crescita dei promastigoti di *L. infantum* ($IC_{50} = 29.43 \mu M$) grazie alla sua elevata affinità con il sito catalitico di TR con un valore di K_i pari a $0.25 \mu M$.

Per quanto riguarda la sintesi di RDS 777, il prodotto commerciale, 4-ammino-2,6-dicloropirimidina, è stato sottoposto a reazione di sostituzione nucleofila aromatica in presenza di sec-butoossido, di sodio, generato *in situ* mediante impiego di sec-butanolo anidro e sodio metallico, come precedentemente riportato dal nostro gruppo di ricerca. Il composto RDS 777 è stato sintetizzato a partire dall'intermedio RDS 738 mediante reazione di cross-coupling C-S, attuando una procedura differente rispetto a quella precedentemente descritta in letteratura. Seppur con resa inferiore, tale procedura ha consentito l'ottenimento del prodotto in tempi di reazione sensibilmente inferiori evitando l'utilizzo di reattivi difficili da maneggiare, quali il tiofenato di potassio.



Al fine di avere maggiori delucidazioni circa l'interazione con il target ed il meccanismo di inibizione, è stata risolta la struttura ai raggi X di RDS 777 in complesso con TR di *Leishmania*,

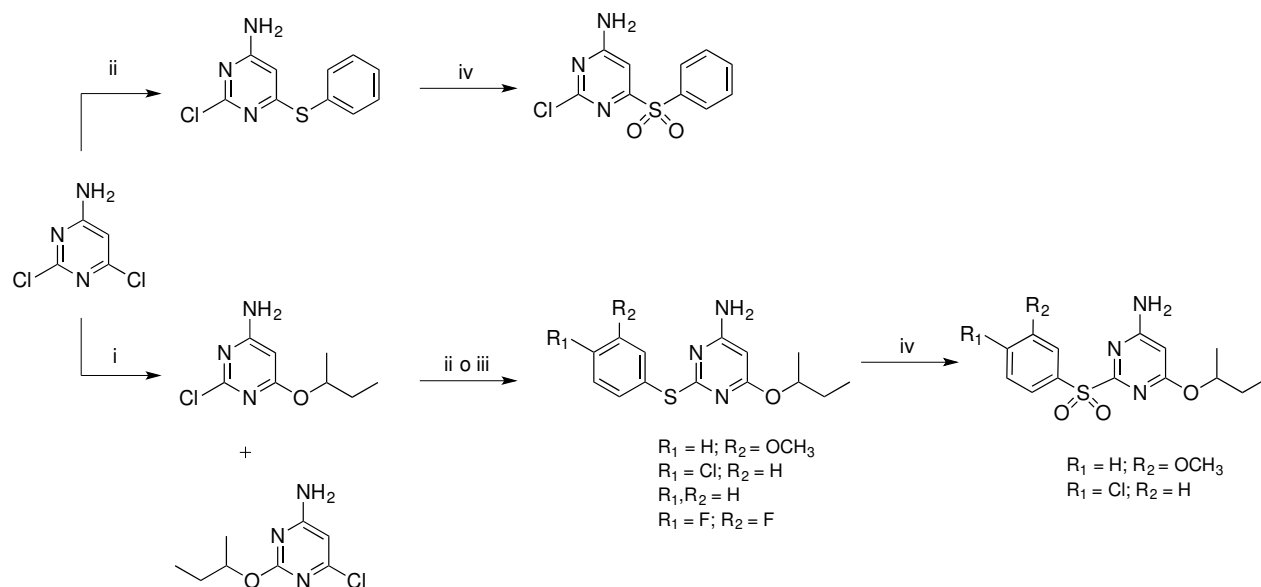
evidenziando il legame di RDS 777 ai residui più coinvolti nella catalisi, giustificando l'interferenza con l'attività catalitica di TR (*J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, 32, 304-310).



Sulla base del complesso RDS 777-TR, abbiamo inoltre progettato e sintetizzato una serie di analoghi diarilsolfurei strutturalmente correlati a RDS 777 come potenziali inibitori di TR in grado di competere con il legame del tripanotione all'enzima e bloccare in tal modo la crescita promastigote.

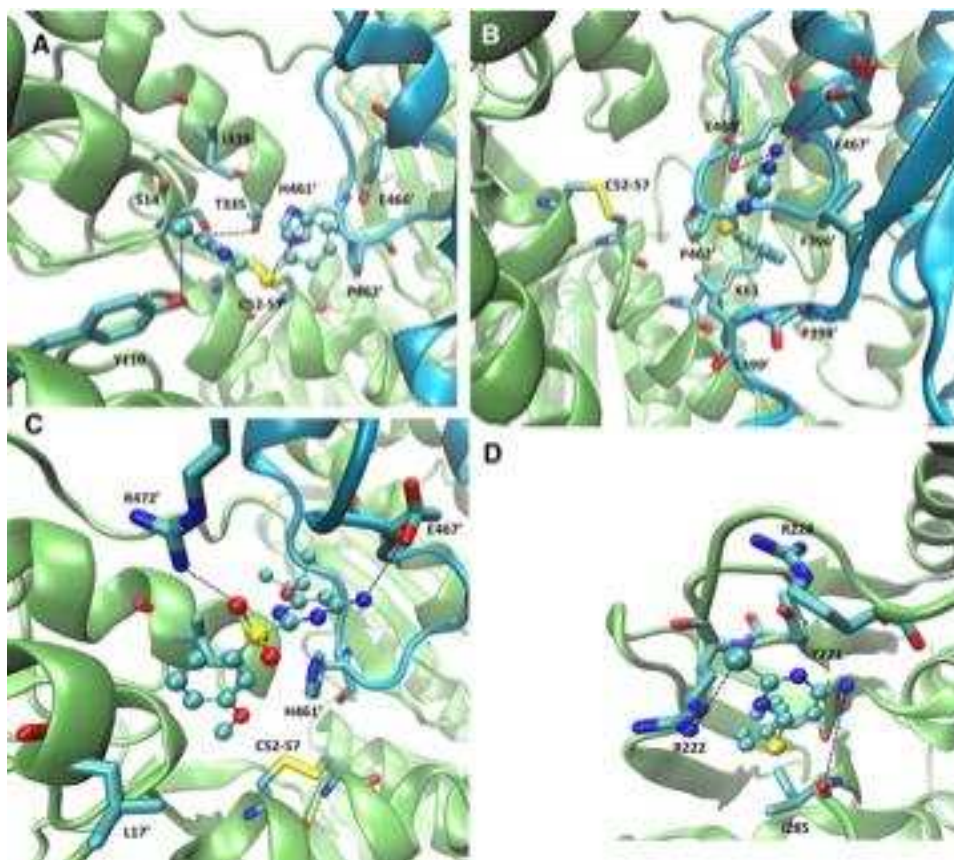
La sintesi di tali derivati è stata condotta in maniera analoga a quella precedentemente descritta dal nostro gruppo di ricerca ma variando alcuni step sintetici per motivi di sicurezza e per ridurre i tempi. In particolare, tutti gli step sintetici che hanno previsto l'impiego di benzentoli per le sostituzioni nucleofile aromatiche sono state opportunamente modificate al fine di evitare l'uso di sali tiofenolici di potassio preparati in situ con potassio metallico, riducendo così il rischio per l'operatore. Inoltre, analogamente a quanto riportato per la risintesi di RDS 777 summenzionata, si è deciso di ricorrere a reazioni assistite da microonde o palladio-catalizzate al fine di ridurre notevolmente i tempi di reazione.

La 4-ammino-2,6-dicloropirimidina è stata sottoposta a reazione di sostituzione nucleofila aromatica in presenza di sodio *sec*-butossido preparato in situ da sodio metallico e *sec*-butanolo anidro. E' stato così ottenuto l'intermedio 6-(*sec*-butossi)-2-cloro-4-amminopirimidinico come prodotto principale che in seguito a reazione di Buchwald–Hartwig C-S cross coupling modificata (o a reazione assistita da microonde) ha condotto ai corrispondenti derivati arilsolfurei. Gli analoghi solfonici sono stati sintetizzati per reazione di ossidazione del tioeteri corrispondenti con perossido d'idrogeno 30%. La reazione di Buchwald–Hartwig C-S cross coupling modificata è stata anche impiegata per la sintesi del derivato arilsolfureo 2-cloro sostituito.



Reagents and conditions: (i) *sec*-BuOH, Na; (ii) opportuno tiofenolo, $Pd_2(dba)_3$, DPPF, DIPEA; (iii) opportuno tiofenolo, DIPEA, *i*PrOH 0.25 M; (iv) H_2O_2 30%, AcOH.

I derivati neosintetizzati sono stati valutati in saggi in vitro per testarne la loro attività inibitoria nei confronti di *Leishmania* (promastigote), mostrando valori di IC_{50} compresi tra 6 e 30 micromolare. Tra essi, il derivato solfonico *p*- OCH_3 sostituito e il derivato solfureo 2-cloro sostituito si sono dimostrati inibitori della crescita parassitaria più potenti di RDS 777 ed in particolare, il secondo derivato, si è rivelato in grado di ridurre la concentrazione di tripanotione ridotto (del 33%) nei promastigoti di *Leishmania donovani*. Inoltre, studi di cinetica enzimatica condotti sul derivato più attivo hanno consentito di evidenziare che tale composto è in grado di inibire selettivamente TR (senza mostrare attività sull'enzima omologo hGR) con K_i pari a 12.0 μM , un ordine di grandezza maggiore rispetto a quella di RDS 777 e ben sei volte più alta dei farmaci antimoniali. Tale derivato, inoltre, è stato oggetto di studi di docking che hanno mostrato la capacità di instaurare interazioni più forti con il target enzimatico rispetto a RDS 777.

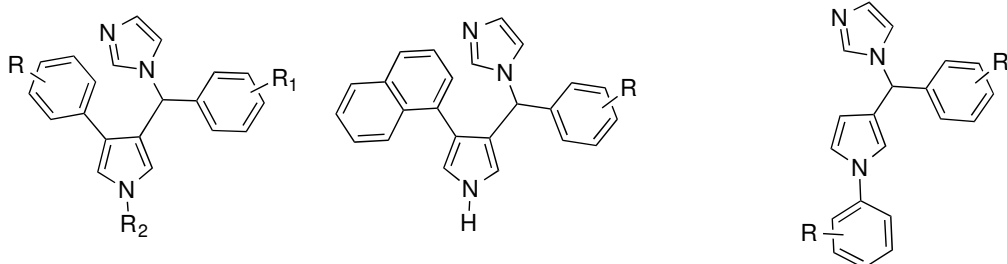


Tali studi di docking hanno, pertanto, fornito le basi molecolari per l'inibizione di TR da parte di questa classe di composti. Alla luce dei dati sperimentali ottenuti si può, pertanto, affermare che il derivato più attivo della serie è in grado di inibire la crescita parassitaria (sulla fase di promastigote) mediante competizione con il legame del tripanotione, senza esercitare effetti off-target (*Amino Acids* **2020**, 52(2), 247-259).

Inibitori della lanosterolo 14 α -demetilasi

L'interesse su composti antifungini descritti precedentemente ha fatto sì che si valutasse un cosiddetto "riposizionamento". Normalmente tale approccio è definito a livello di farmaci già in commercio che vengono studiati per un'applicazione diversa da quella per la quale sono entrati sul mercato. Tale approccio può essere utilizzato in senso più lato anche nella ricerca accademica.

Così, composti antifungini precedentemente sintetizzati sono stati studiati come agenti antiprotozoari, considerando una possibile azione inibente nei confronti della lanosterolo 14 α -demetilasi (CYP51) dei protozoi. L'enzima CYP51, infatti, rappresenta uno dei target più promettenti nel contesto della terapia antiprotozoaria. Esso è l'enzima chiave del metabolismo dell'ergosterolo, il principale sterolo di membrana dei tripanosomatidi che svolge ruoli metabolici e strutturali tali da consentire la sopravvivenza parassitaria. Diversi studi hanno dimostrato che l'inibizione della biosintesi dell'ergosterolo e degli steroli ciclici ad esso correlati produce blocco della crescita e morte parassitaria. Poiché l'ergosterolo rappresenta il principale sterolo di membrana anche dei funghi, i farmaci antifungini inibitori del CYP51 a struttura azolica sono stati testati anche nei confronti dei tripanosomatidi evidenziando incoraggianti risultati in modelli *in vitro* e animali. Attuando un approccio analogo, il nostro gruppo di ricerca ha valutato l'attività antiprotozoaria di una serie di derivati imidazolici precedentemente progettati e sintetizzati presso i nostri laboratori quali inibitori del CYP51 di *C. albicans*.



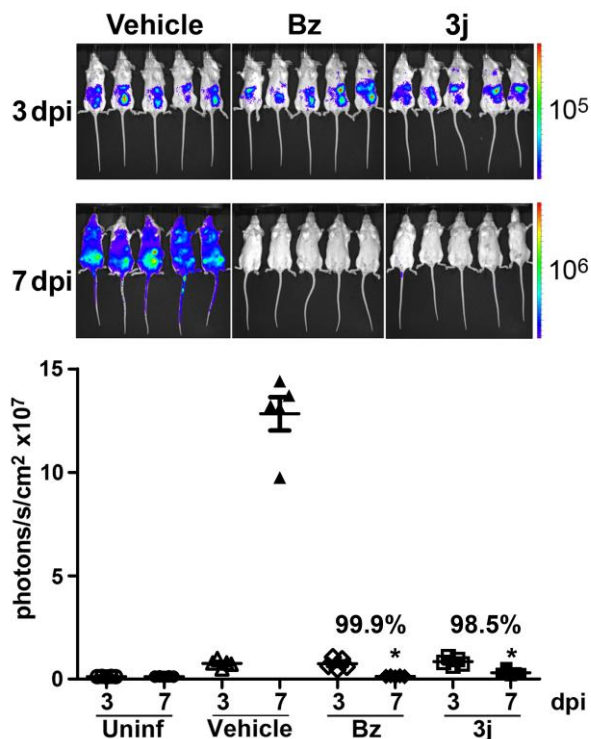
I composti sono stati testati nei confronti di *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*, evidenziando incoraggianti risultati, nell'intervallo del micromolare, nei confronti dei primi due ceppi. Inoltre essi hanno mostrato attività micromolare-submicromolare nei confronti dell'agente eziologico della malaria. Infine, la maggior parte di tali composti ha evidenziato attività inibitoria nanomolare nei confronti di *T. cruzi*, risultando fino a tre ordini di grandezza più attivi del farmaco di riferimento benznidazolo.

con elevata selettività nei confronti del parassita. In dettaglio, i pirroli 3,4-disostituiti sono risultati più attivi rispetto agli *N*-fenil pirroli 1,4-disostituiti.

Inoltre, nella serie dei 3,4-disostituiti, l'aumento del numero di atomi di cloro sui gruppi fenilici ha condotto ai migliori risultati di inibizione parassitaria. L'*N*-metil derivato è risultato il più attivo della serie, con IC₅₀ pari a 2 nM, risultando 825 volte più attivo del benznidazolo ed evidenziando un elevato indice di selettività (SI=2615).

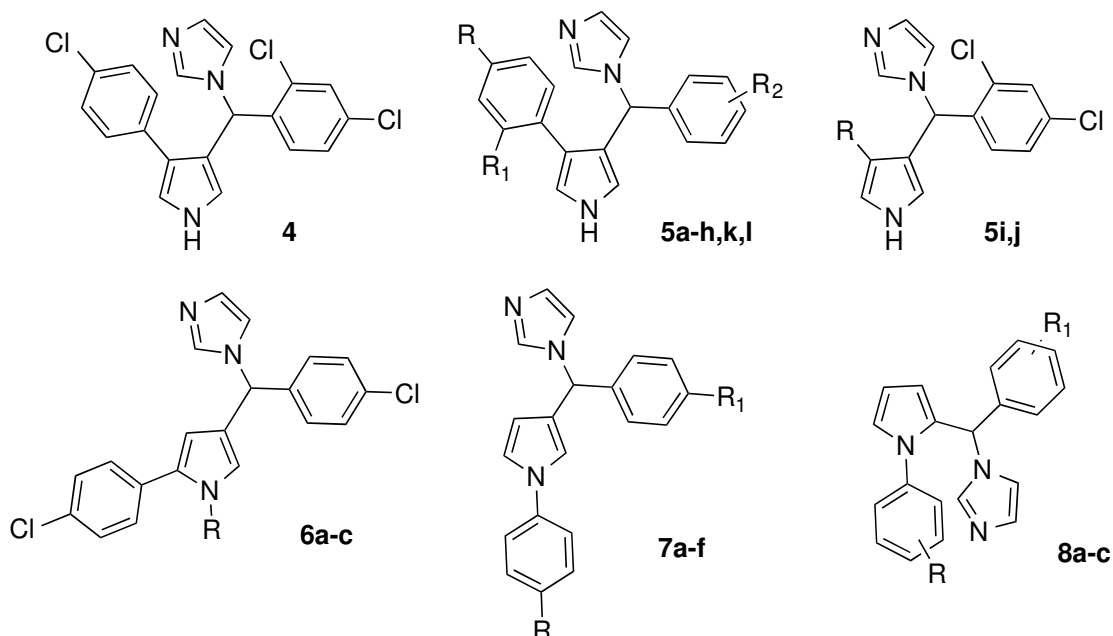
Utilizzando un metodo spettroscopico UV-vis, i composti più promettenti sono stati valutati per la capacità di inibire il CYP51 di *T. cruzi*, mostrando elevata affinità nei confronti dell'enzima. Inoltre, l'analisi del profilo di assorbanza ha evidenziato la capacità dei suddetti composti di formare complesso di coordinazione con ferro presente nel gruppo prostetico eme del target protozario.

Dati i risultati particolarmente promettenti del composto più attivo, abbiamo deciso di testarlo in modelli murini di infezione da *T. cruzi*. I topi infetti sono stati trattati a partire dal terzo giorno di infezione e per ulteriori quattro giorni, monitorando la parassitemia mediante tecnica di bioluminescenza. I risultati hanno evidenziato l'elevata efficacia di tale derivato nel ridurre la parassitemia del 98.5%, mostrando un'efficacia paragonabile a quella del benznidazolo seppur ad una dose dimezzata rispetto a quest'ultimo e senza segni di tossicità clinica nei giorni del trattamento (*Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 156, 53-60).



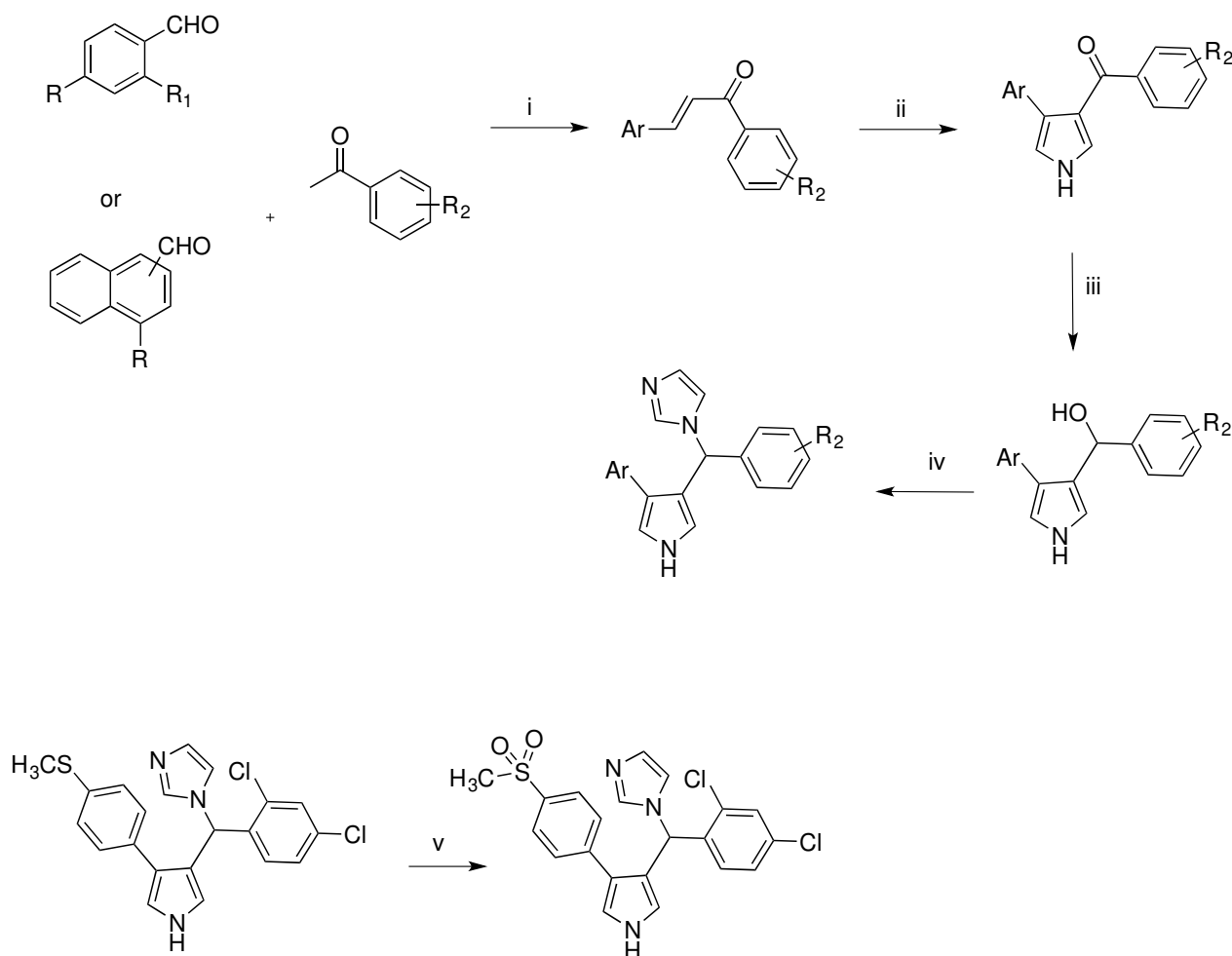
Inoltre, partendo dallo scaffold di uno dei composti più promettenti della suddetta serie di 1-[(aril)(1(o 4)-aril-1*H*-pirrol-3-il)metil]-1*H*-imidazoli (RDS 416), abbiamo progettato e sintetizzato nuovi analoghi al fine di implementare le relazioni struttura-attività di questa nuova classe di agenti antiprotozoari. RDS 416, infatti, ha mostrato attività nanomolare nei confronti di *T. cruzi*, micromolare nei confronti di *L. donovani* e *T. brucei* e submicromolare su *P. falciparum*. Inoltre, RDS 416 si è dimostrato più attivo di due ordini di grandezza del composto di riferimento (benznidazolo), mostrando anche elevata selettività nei confronti di *T. cruzi* (SI = 275).

In particolare, abbiamo progettato e sintetizzato derivati [(aril)(4-aril-1*H*-pirrol-3-il)metil]-1*H*-imidazoli e 1-(fenil(1-fenil-1*H*-pirrol-3-il)metil)-1*H*-imidazoli come analoghi della summenzionata classe di agenti antiprotozoari. Inoltre, abbiamo deciso di approfondire l'effetto conseguente alla posizione del sostituito fenilico sull'anello pirrolico sintetizzando una nuova serie di derivati 1-(fenil(5-fenil-1*H*-pirrol-3-il)metil)-1*H*-imidazoli e 1-(fenil(1-fenil-1*H*-pirrol-2-il)metil)-1*H*-imidazoli. Infine, è stata risolta mediante HPLC su fase stazionaria chirale la miscela racemica di RDS 416 al fine di poter valutare l'attività antiprotozoaria dei singoli enantiomeri (+)-RDS 416 e (-)-RDS 416.



La sintesi dei derivati [(aril)(4-aril-1*H*-pirrol-3-il)metil]-1*H*-imidazoli è stata realizzata partendo da una reazione di Claisen-Schmidt dell'appropriata aldeide (disponibile commercialmente o previamente sintetizzata) con l'acetofenone opportunamente sostituito in presenza di NaOH come base per ottenere i calconi corrispondenti i quali sono stati quindi sottoposti a reazione di

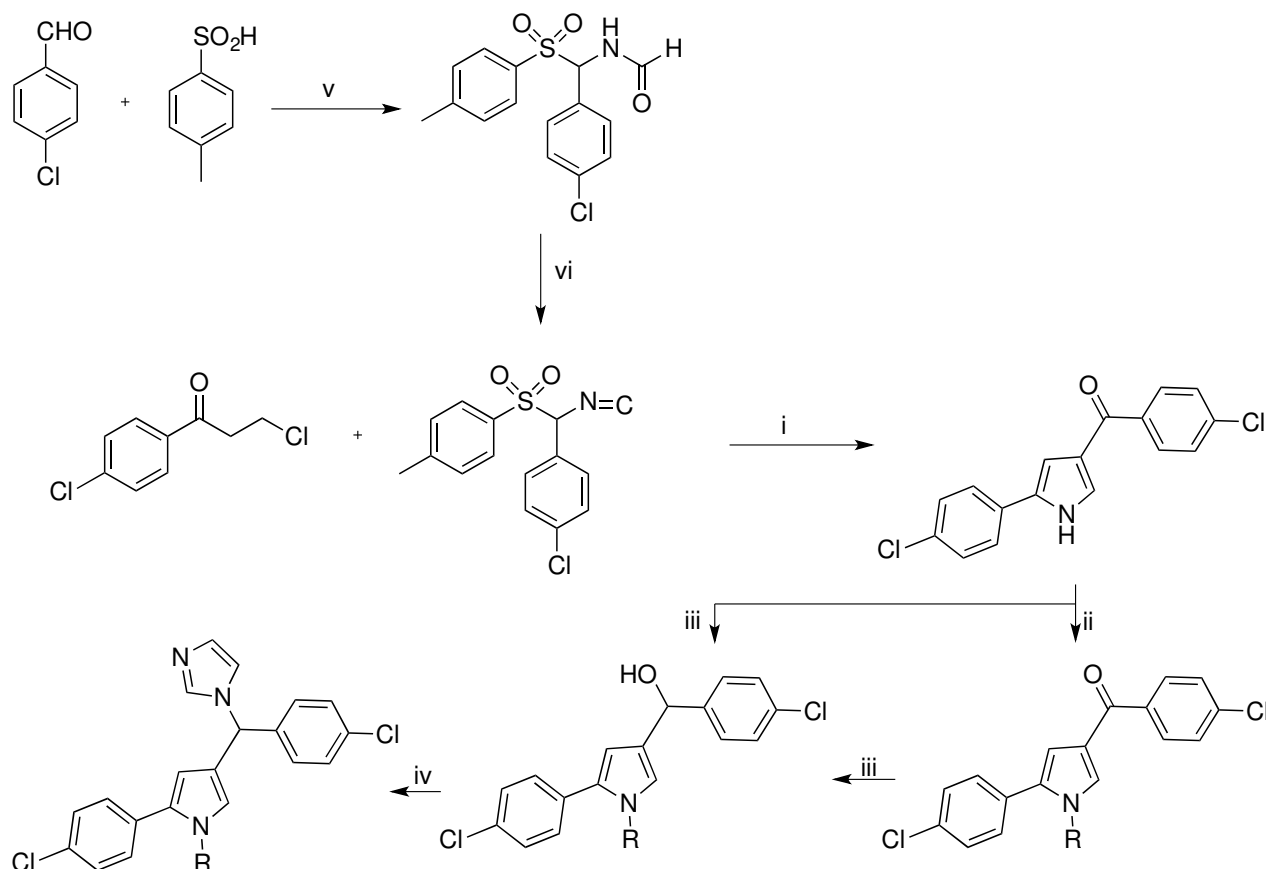
formazione dell'anello pirrolico secondo Van Leusen. La successiva reazione di riduzione del gruppo carbonilico di tali derivati pirrolici ha condotto ai corrispondenti alcoli che per reazione con *N,N'*-carbonildiimidazolo (CDI) hanno fornito i derivati imidazolici di tale serie.



Reagenti: (i) NaOH; (ii) TosMIC, NaH, DMSO, Et₂O; (iii) LiAlH₄; (iv) CDI; (v) oxone, H₂O.

Con riferimento ai derivati 1-(fenil(5-fenil-1*H*-pirrol-3-il)metil)-1*H*-imidazolici, la sintesi è stata condotta a partire da una reazione di cicloaddizione dell'opportuno isocianuro con 3-cloro-1-(4-clorofenil)propan-1-one in presenza di NaH, ottenendo il corrispondente derivato pirrolico il quale è stato successivamente alchilato in posizione 1 con l'opportuno alogenuro alchilico. I derivati *N*-

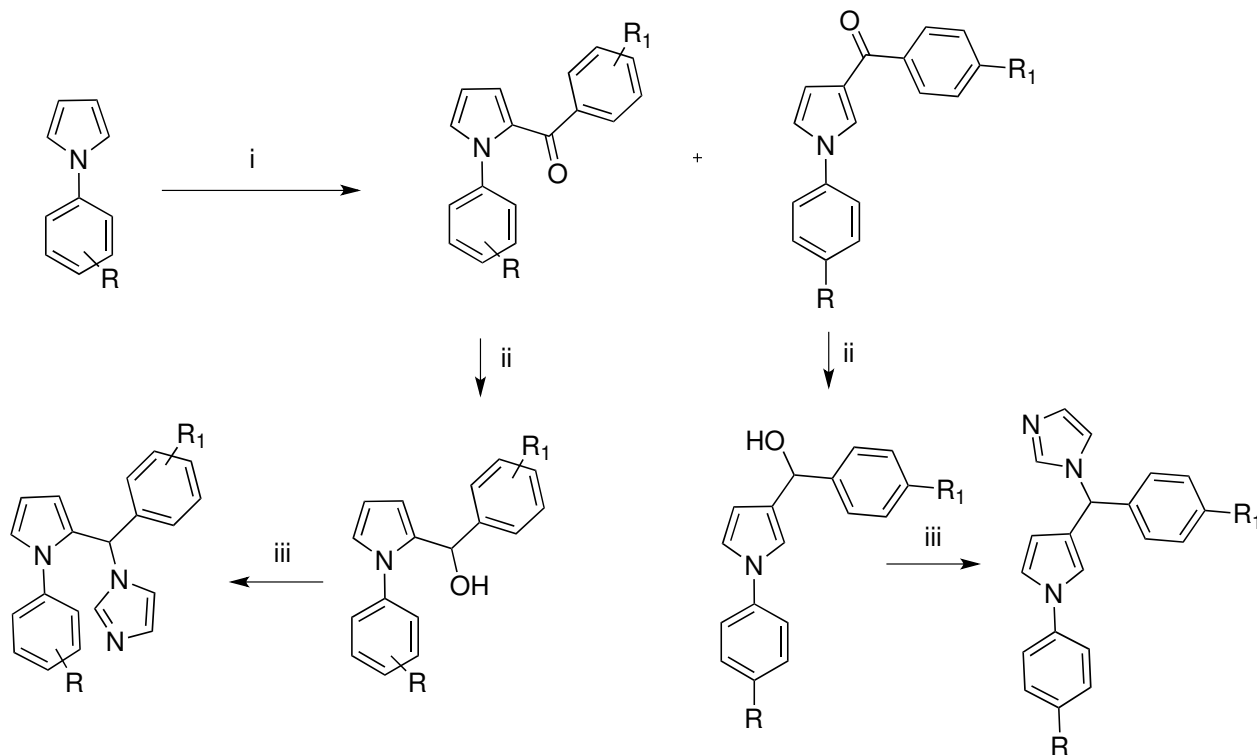
pirrolici così sintetizzati sono quindi stati sottoposti a riduzione del gruppo carbonilico e reazione con CDI analogamente a quanto precedentemente descritto, fornendo i corrispondenti derivati imidazolici. Degno di nota, la sintesi dell'isocianuro ha previsto una reazione di Mannich della formammide con acido *p*-toluensulfonico e 4-clorobenzaldeide in presenza di trimetilsilil cloruro, seguita da reazione di disidratazione con POCl₃ e trietilammina a basse temperature.



Reagenti: (i) NaH, DMSO, Et₂O; (ii) opportuno alchil alogenuro, K₂CO₃; (iii) NaBH₄; (iv) CDI; (v) formammide, TMSCl; (vi) POCl₃, Et₃N, DME.

I derivati 1-(fenil(1-fenil-1*H*-pirrol-3-il)metil)-1*H*- e 1-(fenil(1-fenil-1*H*-pirrol-2-il)metil)-1*H*-imidazolici sono stati sintetizzati a partire da una reazione di acilazione di Friedel-Craft dell'appropriato *N*-fenilpirrolo con il benzoil cloruro opportunamente sostituito, ottenendo una miscela dei corrispondenti isomeri α e β che sono stati separati mediante cromatografia

gravimetrica. Seguono, infine, una riduzione del gruppo carbonilico e una reazione con CDI, come già descritto in precedenza.

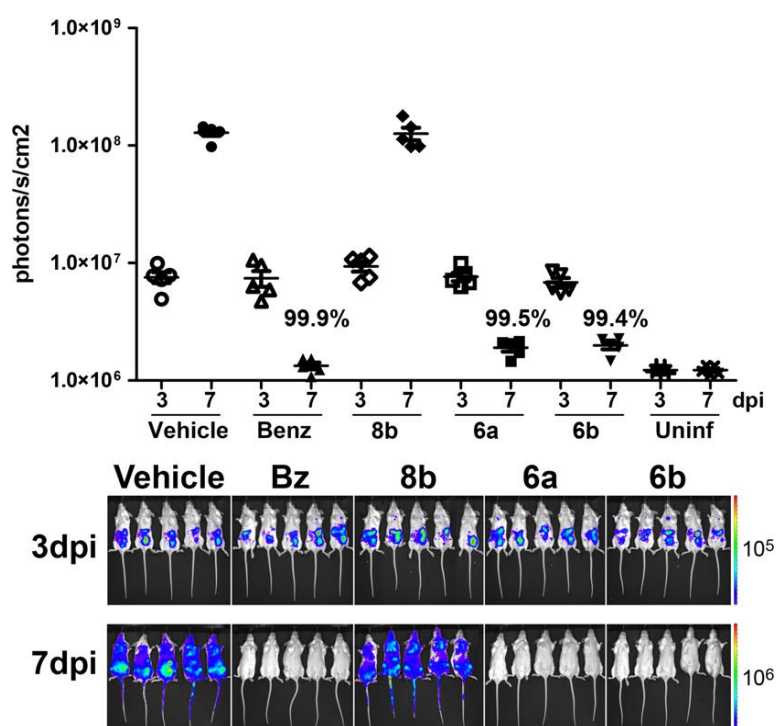


Reagenti: (i) opportuno benzoil cloruro, AlCl_3 ; (ii) NaBH_4 ; (iii) CDI.

Per quanto concerne il derivato RDS 416, è stata risolta la sua miscela racemica mediante HPLC semipreparativo enantioselettivo (Chiralcel OD CSP usando come fase mobile una miscela 70:30 *n*-esano/EtOH), ottenendo i due enantiomeri (+)-RDS 416 e (-)-RDS 416. La loro purezza è stata determinata mediante HPLC analitico e dicroismo circolare il quale ha mostrato che le proprietà chirottiche dei due antipodi ottici sono perfettamente speculari. Inoltre, la configurazione assoluta dell'enantiomero (-)-RDS 416 è stata determinata mediante analisi ai raggi X.

I derivati neosintetizzati hanno mostrato attività inibitoria in un ampio range di concentrazioni in saggi fenotipici in vitro nei confronti dei parassiti presi in esame. In particolare, i dati migliori in termini di potenza inibitoria sono stati riportati dai derivati 1-(fenil(5-fenil-1*H*-pirrol-3-il)metil)-1*H*-imidazoliche che hanno mostrato attività nell'ordine del micromolare nei confronti di *T. brucei* e *L. donovani* e del nanomolare su *T. cruzi* e *P. falciparum*, con potenze maggiori rispetto agli analoghi precedentemente sintetizzati dal nostro gruppo di ricerca nei confronti di *T. cruzi*. Inoltre, la risoluzione della miscela racemica di RDS 416 ha consentito di valutare l'attività dei singoli

enantiomeri, mostrando che l'eutomero è rappresentato dall'enantiomero (-)-RDS 416 ($IC_{50} = 0.9 \mu M$ su *T. cruzi*). E' stato determinato il meccanismo d'azione dei derivati più attivi mediante un metodo spettroscopico UV-vis che ha confermato l'elevata affinità di tali molecole per il CYP51 di *T. cruzi*. Inoltre, è stata condotta una valutazione preliminare circa la selettività di tali agenti antiprotozoari nei confronti dei più rilevanti enzimi umani coinvolti nel metabolismo di farmaci. Essa ha mostrato promettenti risultati, sebbene una parziale cross-reattività con i CYP umani abbia evidenziato la necessità di un'ulteriore ottimizzazione di tali derivati. Infine, i tre derivati più attivi tra i neosintetizzati sono stati testati in modelli murini di infezione da *T. cruzi*. I topi infetti sono stati trattati a partire dal terzo giorno di infezione e per ulteriori quattro giorni, monitorando la parassitemia mediante tecnica di bioluminescenza. I risultati ottenuti hanno evidenziato l'elevata efficacia di tali derivati nel ridurre la parassitemia di più del 99%, mostrando un'efficacia paragonabile a quella del benznidazolo seppur ad una dose dimezzata rispetto a quest'ultimo e senza segni di tossicità clinica nei giorni del trattamento (*J. Med. Chem.* **2019**, 62, 1330-1347).



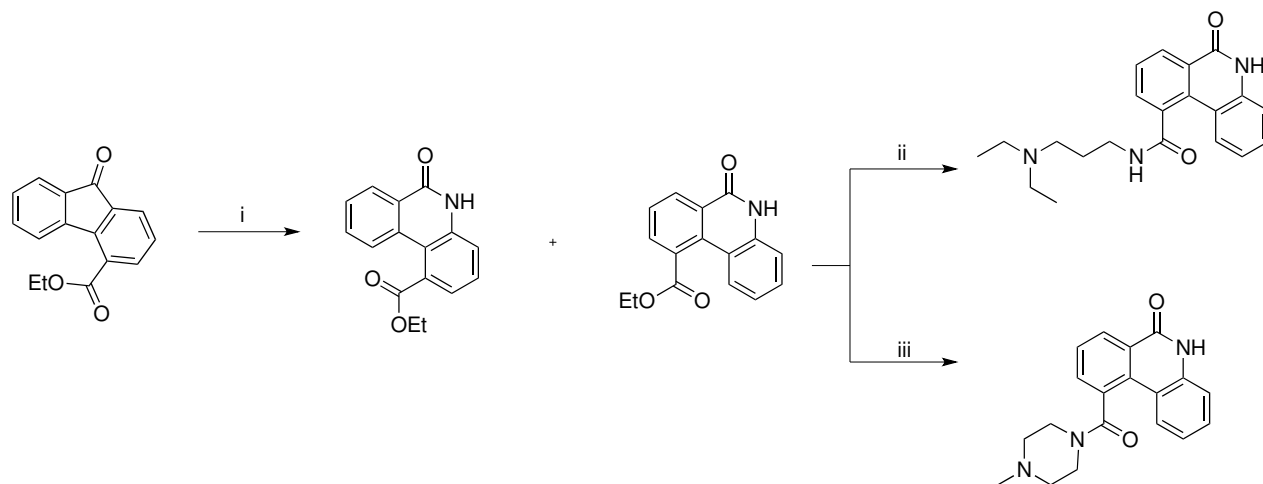
RICERCHE SU SOSTANZE AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE

Studi su composti che interferiscono con il ciclo cellulare

Recentemente, alcune molecole azotate, come il derivato fenantridinonico PJ34, hanno mostrato pronunciata attività antitumorale. Tale molecola è in grado di danneggiare l'organizzazione del fuso mitotico in cellule tumorali in proliferazione e indurre un blocco della loro replicazione. Inoltre, il trattamento con PJ34 di topi atimici ha consentito l'arresto della crescita del tumore al seno triplo negativo, probabilmente grazie alla sua attività inibitoria nei confronti di PARP (poli(ADP-ribosio)polimerasi) che è in grado di alterare i centrosomi e l'organizzazione del fuso mitotico soltanto in cellule tumorali e in fase di proliferazione. PJ34 esercita la sua azione sui centrosomi mediante la soppressione della chinesina HSET/KIFC1, responsabile della stabilizzazione del fuso mitotico in cellule tumorali umane e che gioca, pertanto, un ruolo importante nell'insorgenza di tumori e nel processo di metastasi. PJ34 causa, infatti, la formazione di fusi mitotici multipolari (anziché bipolari) e di conseguenza sopprime la formazione di colonie cellulari tumorali in quanto riduce la vitalità cellulare.

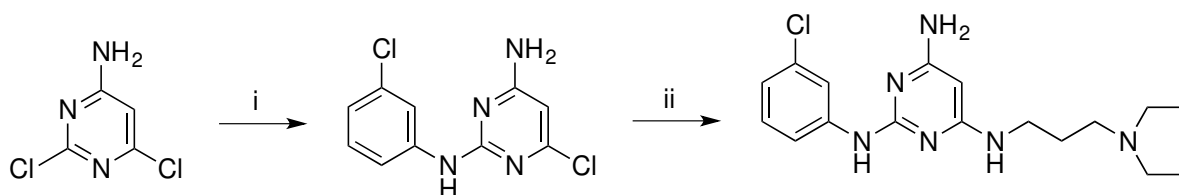
Alla luce dell'importante attività antitumorale esercitata da PJ34, abbiamo deciso di progettare e sintetizzare alcuni analoghi fenantridinonici caratterizzati dall'introduzione di porzioni ammidiche secondarie e terziarie alternative in posizione 10 dello scaffold centrale, ottenendo due derivati fenantridinonici. Inoltre, poiché gli eterocicli azotati rappresentano scaffold privilegiati in ambito farmaceutico ed, in particolare, poiché importanti agenti antitumorali in grado di danneggiare il fuso mitotico sono a struttura pirimidinica, abbiamo pensato di valutare l'effetto antiproliferativo di una serie di composti azotati presenti nella nostra libreria di molecole. In particolare è stata esaminata tale attività su tre linee cellulari tumorali umane, selezionate sulla base delle insoddisfacenti strategie terapeutiche attualmente disponibili e sulla prognosi infausta: glioblastoma multiforme, tumore al seno triplo-negativo e adenocarcinoma del colon. Da tale screening è emerso un derivato a struttura pirimidinico come agente antitumorale promettente, in grado di inibire la proliferazione cellulare, bloccare il ciclo cellulare e indurre apoptosi nelle tre linee cellulari tumorali prese in esame.

La sintesi dei derivati fenantridinonici è stata condotta a partire dal 9-ossido-9H-fluorene-4-carbossilato di etile mediante reazione di Schmidt, che ha fornito l'intermedio fenantridinonico il quale, a seguito di reazione di amminolisi assistita da microonde, ha fornito i due composti finali.



Reagenti: (i) sodio azide, H_2SO_4 96%; (ii) N,N' -dietilpropano-1,3-diammina, MW; (iii) 1-metilpiperazina, MW.

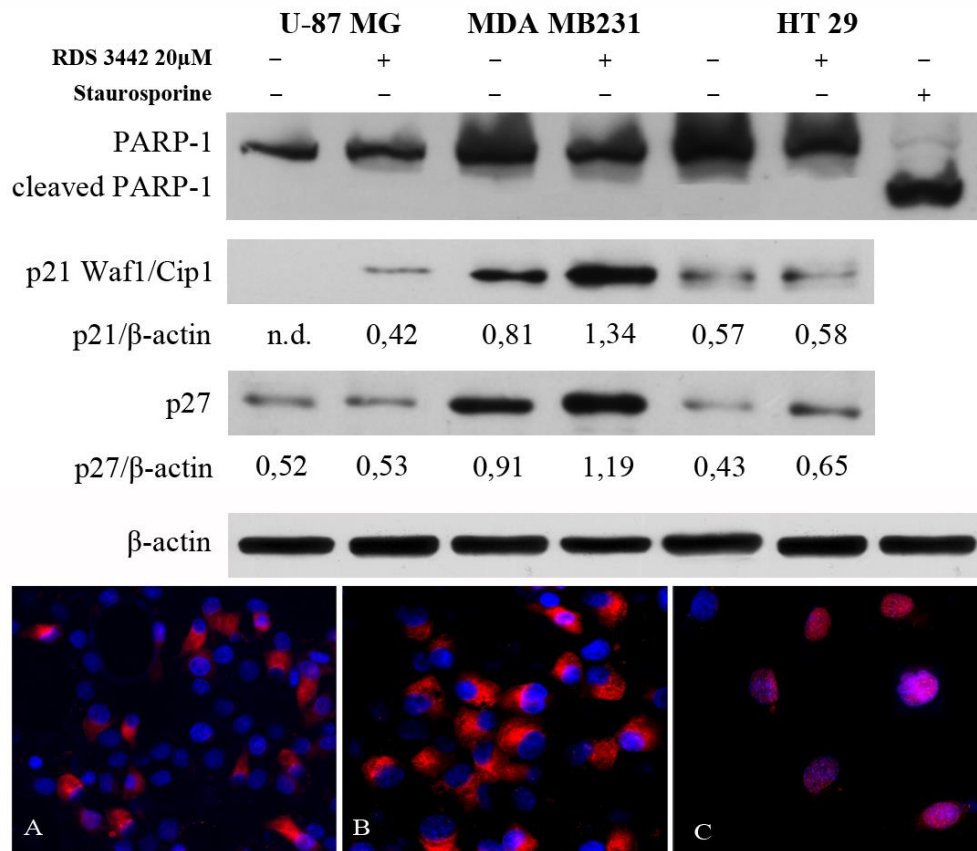
Il derivato pirimidinico è stato sintetizzato mediante una via sintetica a due step che ha previsto una reazione di sostituzione nucleofila aromatica in batch seguita da una seconda reazione di sostituzione nucleofila aromatica assistita da microonde.



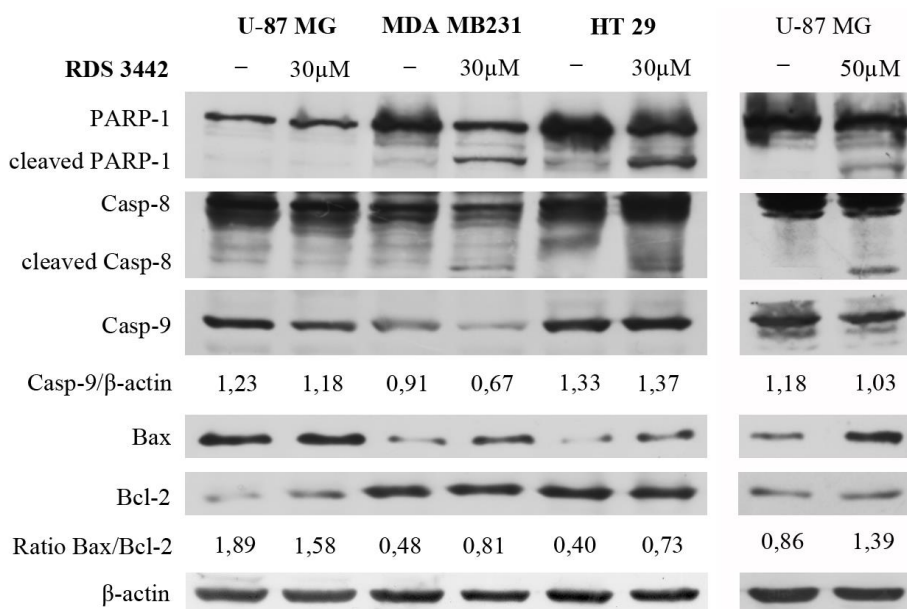
Reagenti: (i) 3-cloroanilina; (ii) N,N' -dietilpropano-1,3-diammina, K_2CO_3 anidro, MW.

Tra i derivati neosintetizzati, il composto a struttura pirimidinica si è dimostrato in grado di inibire la proliferazione cellulare ed indurre apoptosi nelle tre linee tumorali di interesse, con effetto antiproliferativo più spiccato sul tumore al seno triplo negativo e sul carcinoma del colon già dopo 24 ore di trattamento. Tale effetto sul glioblastoma multiforme, invece, è stato ottenuto dopo 48 ore di trattamento e con concentrazioni maggiori di inibitore. Per quanto riguarda l'induzione di

apoptosi, invece, sono state necessarie concentrazioni maggiori di derivato pirimidinico, a cui esso si è rivelato in grado di indurre una upregulation di due inibitori di CDK, ovvero p21 e p27, descritte in letteratura come inibitori dell'apoptosi.

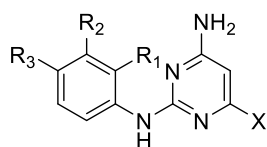


La sovraespressione di p21 e p27 indotta dall'inibitore suggerisce un arresto del ciclo cellulare in G0/G1 in quanto questi due regolatori negativi delle CDK sono capaci di bloccare il ciclo cellulare prima dell'ingresso in G1. Inoltre, alle concentrazioni più alte richieste per l'induzione di apoptosi, p21 trasloca nel nucleo ed induce così apoptosi con il clivaggio di PARP-1 e delle caspasi 8 e 9 ed un aumento del rapporto Bax/Bcl-2.



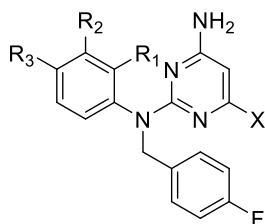
Grazie a tali risultati, quindi, tale derivato pirimidinico si configura come un promettente agente antitumorali in grado di agire non solo sulla proliferazione cellulare tumorale ma anche sul processo apoptotico (*Invest. New Drugs* **2020**, 38(1), 39-49).

A partire dalla struttura di **RDS 3442** sono stati successivamente progettati e sintetizzati nuovi derivati aminopirimidinici strutturalmente correlati a **RDS 3442**, al fine di valutare la loro attività antiproliferativa.

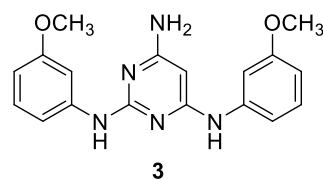


1a-g

- 1a** X=3-(diethylamino)propyl-amino; R₁ = H; R₂ = Cl; R₃ = H
1b X= 3-(diethylamino)propyl-amino; R₁ = H R₂= F R₃= H
1c X= 3-(diethylamino)propyl-amino; R₁ = H; R₂ = OCH₃; R₃ = H
1d X= 3-(diethylamino)propyl-amino; R₁ = H; R₂ = NO₂; R₃ = H
1e-HCl X=dipropylamino; R₁ = H R₂ = Cl R₃ = H
1e X=dipropylamino; R₁ = H; R₂ = Cl; R₃ = H
1f X=dipropylamino; R₁ = F; R₂ = H; R₃ = Cl
1g X=4-methylpiperazin-1-yl; R₁ = H; R₂ = Cl; R₃ = H



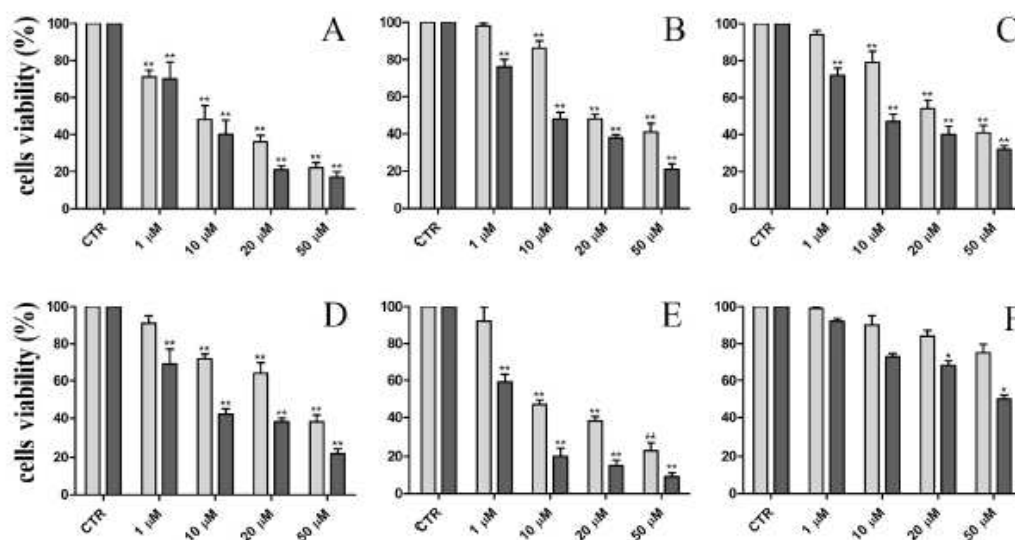
2a-f



3

- 2a** X = 3-(diethylamino)propyl-amino; R₁ = H; R₂ = Cl; R₃ = H
2b X = 3-(diethylamino)propyl-amino; R₁ = H R₂= F R₃= H
2c X = 3-(diethylamino)propyl-amino; R₁ = H; R₂ = OCH₃; R₃ = H
2d X = 3-(diethylamino)propyl-amino; R₁ = H; R₂ = NO₂; R₃ = H
2e X = dipropylamino; R₁ = H R₂ = Cl R₃ = H
2f X = dipropylamino; R₁ = F; R₂ = H; R₃ = Cl

La capacità di inibire la proliferazione cellulare è stata valutata su diversi tipi di tumori: glioblastoma, carcinoma mammario triplo negativo, carcinoma orale a cellule squamose e carcinoma del colon.

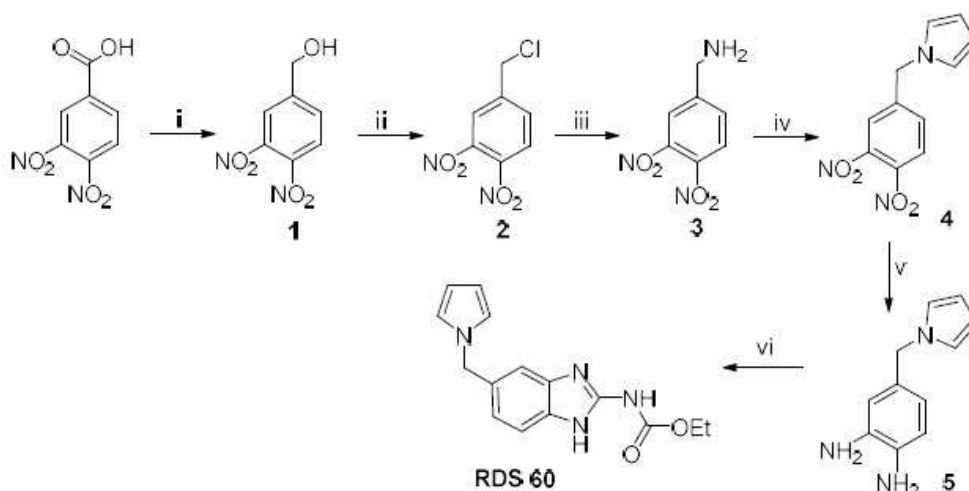


Il composto più interessante è risultato essere la controparte *N*-benzilica di **RDS 3442**, che induceva una significativa diminuzione della vitalità cellulare in tutte le linee cellulari tumorali testate, con EC₅₀ compreso tra 4 e 8 μM, 4-13 volte più del hit (*Molecules* **2021**, 26(3), 771).

Sempre in questo ambito e partendo sempre da dati di letteratura, è ben noto che, il nocodazolo composto sintetico identificato per la prima volta in uno screening per agenti antielmintici, (De Brabander et al., 1975) impedisce la polimerizzazione dei microtubuli e, recentemente, ha mostrato anche la capacità di inibire alcune protein chinasi coinvolte nella tumorigenesi. Queste caratteristiche ne fanno un interessante molecola ad azione antiproliferativa che può essere sfruttata nella chemioterapia antiblastica. Da un punto di vista farmacocinetico, è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e ha un buon assorbimento intestinale. Non è un inibitore della glicoproteina P ma inibisce il CYP450 1A2. Dopo un breve utilizzo in clinica, attualmente rimane un importante tool farmacologico di ricerca.

Il nocodazolo è stato selezionato come modello iniziale per un'ulteriore ottimizzazione mediante modifiche strutturali approfondite grazie alle sue molteplici attività biologiche. In uno sforzo iniziale per migliorare l'affinità di legame ai vari target, partendo dai dati SAR di studi precedenti e analizzando la regione di legame sulla macromolecola, siamo giunti alla nuova struttura attraverso alcune considerazioni. Partendo dalla struttura chimica del nocodazolo, sono state apportate le seguenti modifiche:

- il gruppo carbonilico è stato ridotto a gruppo metilenico, mentre il sostituito 2-tienilico viene sostituito con un 1-pirrolile, un classico isostere del tiofene. Inoltre, secondo alcuni dati SAR, la riduzione del gruppo carbonilico porta a composti ancora dotati di attività antitumorale, caratterizzati, però, da una maggiore libertà conformazionale.
- Il gruppo metossilico è stato sostituito con un gruppo etossilico nella porzione carbammica in C2, in considerazione del fatto che la tasca di legame della colchicina sulla β -tubulina presenta, in quella porzione, uno spazio più ampio che poteva ancora essere occupato.



Scheme 1. Synthetic route to RDS 60. i: AlCl_3 , NaBH_4 , THF dry, 0°C to reflux, 3 h and 20 min; ii: PCl_5 , CHCl_3 , 0°C to RT, 2 h and 45 min; iii: 1. (1*s*,3*s*)-1,3,5,7-tetraazaadamantane, NaI, EtOH abs., CHCl_3 , RT, 24 h, 2. HCl (37%), EtOH, 55°C , 4 h, 3. $\text{Na}_2\text{CO}_{3(\text{ss})}$, RT; iv: 2,5-dimethoxytetrahydrofuran, AcOH, reflux, 5 min; v: H_2/Pd , AcOEt, 45°C , 4 h; vi: S-methylisothiourea, PTSA, EtOH, reflux, 45 min.

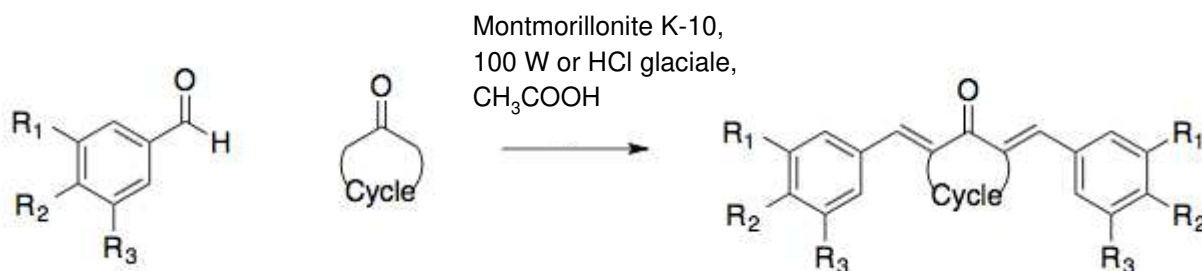
Sono state valutate le proprietà antineoplastiche di **RDS 60** in due linee cellulari di carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (HNSCC), scoprendo che questo composto ha inibito significativamente la replicazione di entrambe le linee cellulari HNSCC senza indurre alcuno importante effetto citotossico sui fibroblasti dermici umani e sui cheratinociti umani. Il trattamento di linee cellulari HNSCC con **RDS 60** ($1\ \mu\text{M}$) per 24 h ha interrotto lo sviluppo dei normali fusi mitotici bipolari e, allo stesso tempo, bloccato il ciclo cellulare in fase G2/M insieme all'accumulo citoplasmatico di ciclina B1. Di conseguenza, il trattamento con **RDS 60** ($2\ \mu\text{M}$) per 24 h ha indotto l'attivazione dell'apoptosi in entrambe le linee cellulari HNSCC. Inoltre, RDS 60 è stato in grado di invertire l'epitelio-mesenchimale e inibire la migrazione cellulare e l'infiltrazione della matrice extracellulare di entrambe le linee cellulari HNSCC. I risultati dimostrano che questo composto ha un potente effetto nel bloccare il ciclo cellulare, inducendo l'apoptosi e inibendo la motilità cellulare e l'invasione stromale delle linee cellulari HNSCC (*Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 564).

Studi su composti che influenzano il rimodellamento della cromatina

Inibitori delle istone acetil transferasi

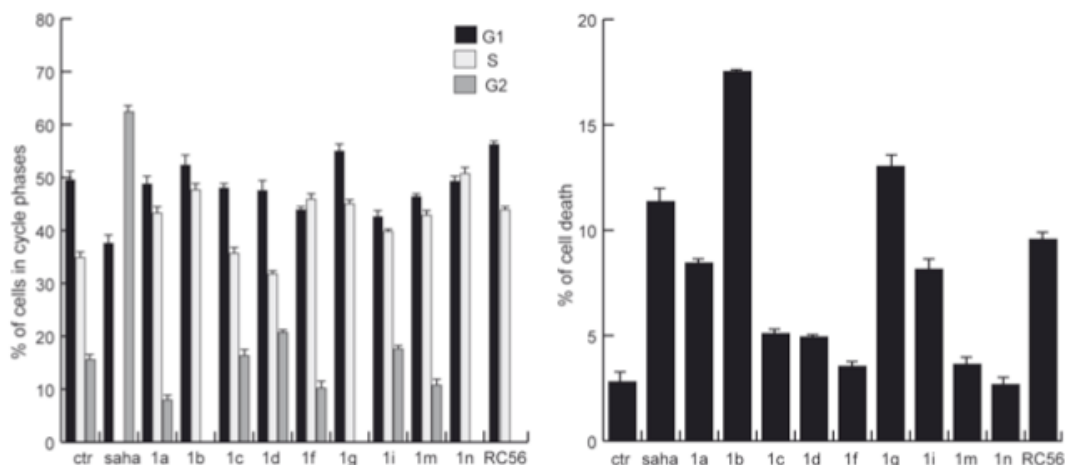
Negli ultimi anni un nuovo approccio nella chemioterapia antitumorale è emerso con vigore. Si tratta dell'influenza che si può produrre sul rimodellamento della cromatina. In tale ambito gli inibitori dell'istone deacetilasi (HDAC) hanno avuto un ruolo di "apripista", dal momento che la loro scoperta e sviluppo ha portato a ipotizzare il loro uso a livello clinico. La cromatina è costituita dal DNA cromosomico e da proteine basiche (H2A, H2B, H3 e H4) ad esso associate, chiamate istoni. Questa associazione permette alla cromatina di essere in forma estremamente addensata. Specifici ammino acidi istonici sono acetitati da enzimi chiamati Istone Acetil Transferasi (HAT); viceversa le HDAC catalizzano la deacetilazione di tali residui. Un equilibrio tra acetilazione e deacetilazione prodotte dai suddetti enzimi è fondamentale per regolare l'espressione genica. L'inibizione dell'HAT può produrre addensamento della cromatina che risulta quindi trascrizionalmente inattiva. Questo può risultare in un effetto antitumorale: è stato infatti provato l'effetto antiproliferativo di inibitori HAT su cellule che sovresprimono tale enzima.

Recentemente è stata descritta in letteratura l'azione inibente nei confronti di HAT/p300 di un derivato cinnamoilico precedentemente sintetizzato dal nostro gruppo di ricerca, 6 [2,6-bis-(3-bromo-4-idrossibenzilidene)cicloesano] (RC 56). Tale derivato bis-benzilidenico ha mostrato attività inibitoria selettiva nei confronti di p300, con attività cellulare evidenziata dalla diminuzione dell'acetilazione dell'istone H3. AL fine, quindi, di effettuare studi SAR sui derivati cinnamoilici, sono stati progettati e sintetizzati analoghi di RC 56 caratterizzati da modifiche strutturali a carico sia della porzione bis-benzilidenica che cicloesanonica.



I derivati bis-arilidenici sono stati sintetizzati mediante reazione assistita da microonde impiegando una resina come catalizzatore o condensazione acido catalizzata dell'appropriato ciclo a sei o cinque membri con l'opportuna benzaldeide.

I derivati neosintetizzati hanno mostrato attività nell'ordine del micro e sub-micromolare, evidenziando che: i) l'anello cicloesanonico risulta essere importante per l'attività; ii) l'atomo di bromo dell'arile può essere sostituito con altri alogeni; iii) l'introduzione di un ulteriore atomo di bromo sull'arile porta ad un incremento di attività. Inoltre, tali composti si sono dimostrati attivi in cellule leucemiche U937, essendo in grado di influenzare il ciclo cellulare ed indurre morte cellulare.



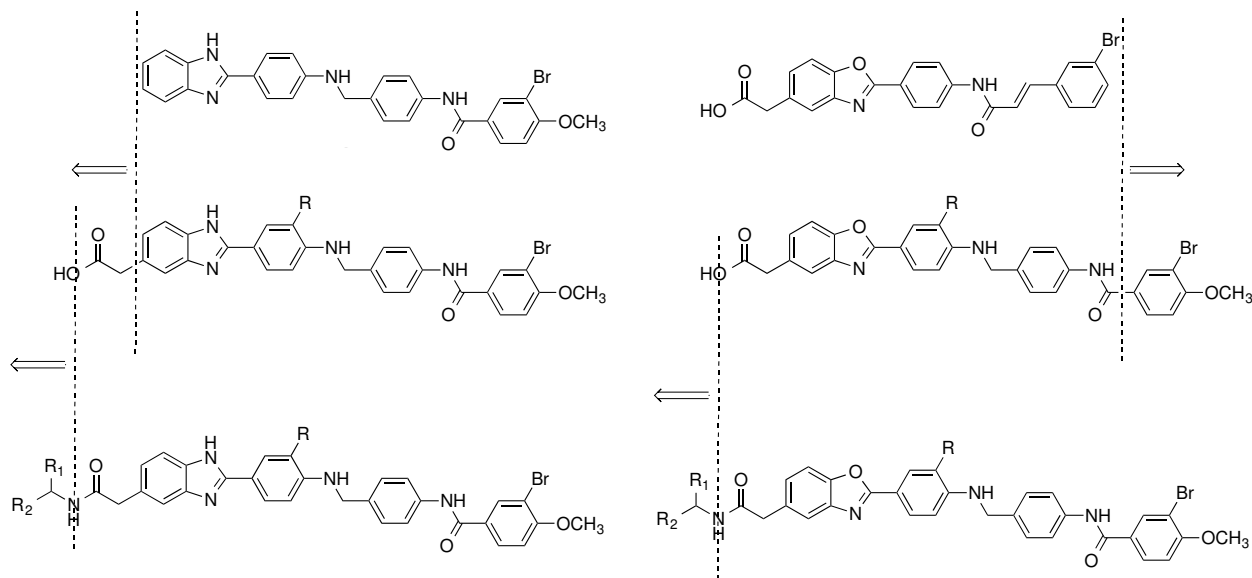
Studi di modellistica molecolare condotti sul derivato più attivo della serie hanno mostrato le caratteristiche strutturali principali coinvolte nella formazione del complesso ligando-proteina, evidenziando il ruolo della porzione fenolica (fenolato) nell'instaurare un ponte salino con residui amminoacidici al sito attivo (ChemMedChem. **2016**, *12(16)*, 1359-1368).

Studi su composti inibitori di target specifici

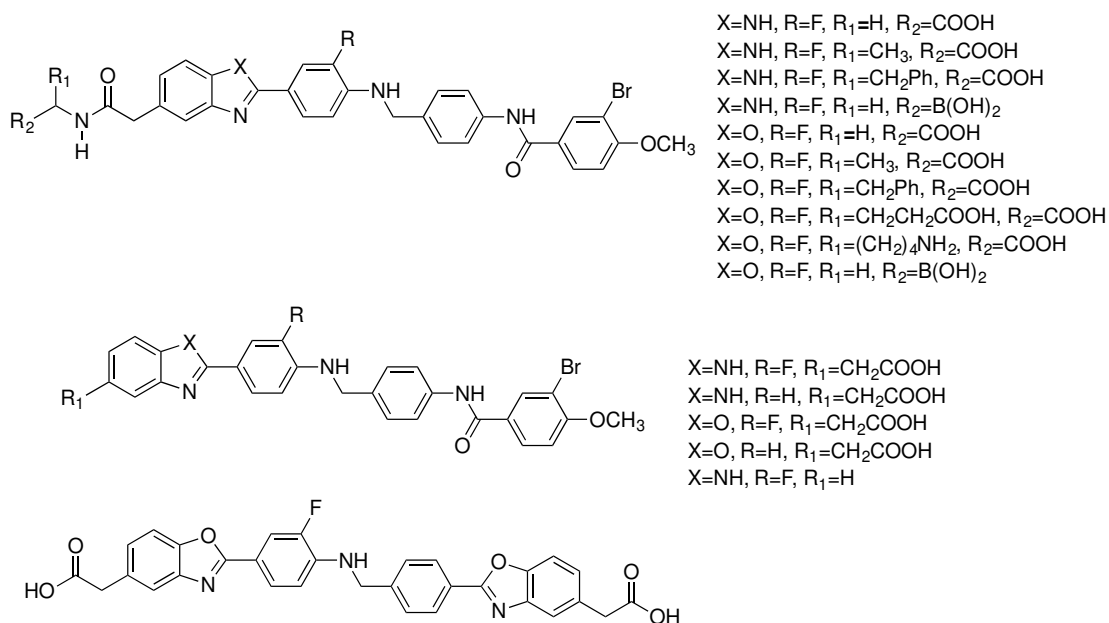
Inibitori di eparanasi

L'enzima eparanasi (Hpse) è l'unica *endo*- β -D-glucuronidasi nell'uomo avente la capacità di scindere le catene laterali di eparan solfato di proteoglicani avente come frazione di glicosamminoglicano l'eparan solfato (HS). Tali proteoglicani sono localizzati sulla superficie cellulare, nella membrana basale e nello spazio extracellulare ed agiscono da serbatoio di fattori di crescita e citochine legati all'HS, regolando così vie di segnalazione, di riconoscimento molecolare e di differenziamento cellulare. Hpse, degradando le catene di HS, induce la liberazione delle varie proteine ad esso legate, provocando profondi effetti sulla crescita e sulla sopravvivenza cellulare e, pertanto, Hpse risulta coinvolto in numerosi processi biologici. Infatti, Hpse promuove l'infiammazione, modula la risposta dei macrofagi nell'infiammazione cronica, stimola la metastasi e l'angiogenesi e facilita l'invasione cellulare. Recentemente, inoltre, è stato scoperto il ruolo chiave di Hpse nella modulazione dell'autofagia in cellule normali e maligne, conferendo così resistenza alla chemioterapia. Si è messo in evidenza che in seguito al trattamento chemioterapico, molto spesso, si ha un innalzamento dell'espressione di Hpse, che poi promuove la sopravvivenza cellulare. È quindi possibile considerare un'elevata espressione di Hpse come un fattore di rischio e indice di diagnosi negativa nei pazienti oncologici. Negli ultimi decenni sono stati condotti numerosi studi con l'obiettivo di sviluppare molecole o sostanze che inibissero l'azione di Hpse e che potessero interferire con le sue attività in condizioni patologiche. Ad oggi vi sono quattro inibitori di Hpse in fase di sviluppo clinico, due polisaccaridi altamente solfatati come il roneparstat, e due oligosaccaridi solfatati. Sfortunatamente, questi inibitori presentano diverse problematiche, principalmente connesse al loro elevato peso molecolare ed alla via di somministrazione. Pertanto, è necessario sviluppare piccole molecole come inibitori di Hpse in quanto dotate di migliori caratteristiche farmacocinetiche. Partendo da dati di letteratura, abbiamo, pertanto, progettato e sintetizzato una serie di nuovi derivati benzazolici come inibitori di Hpse. In particolare, abbiamo apportato varie modifiche alle strutture di due inibitori di Hpse descritti in letteratura, uno a struttura benzimidazolica ed uno a struttura benzossazolica. Abbiamo deciso di: (i) introdurre un atomo di fluoro in posizione orto rispetto al gruppo amminico sull'anello fenilico legato allo scaffold benzazolico poiché dati in letteratura suggeriscono che tale alogeno conferisce maggiore attività nei confronti del target enzimatico; (ii) funzionalizzare la porzione acetica con

vari amminoacidi o acidi boronici per instaurare interazioni polari addizionali con l'enzima; (iii) sostituire la porzione bromo-metossibenzammidica con una seconda porzione benzazolil-acetica.

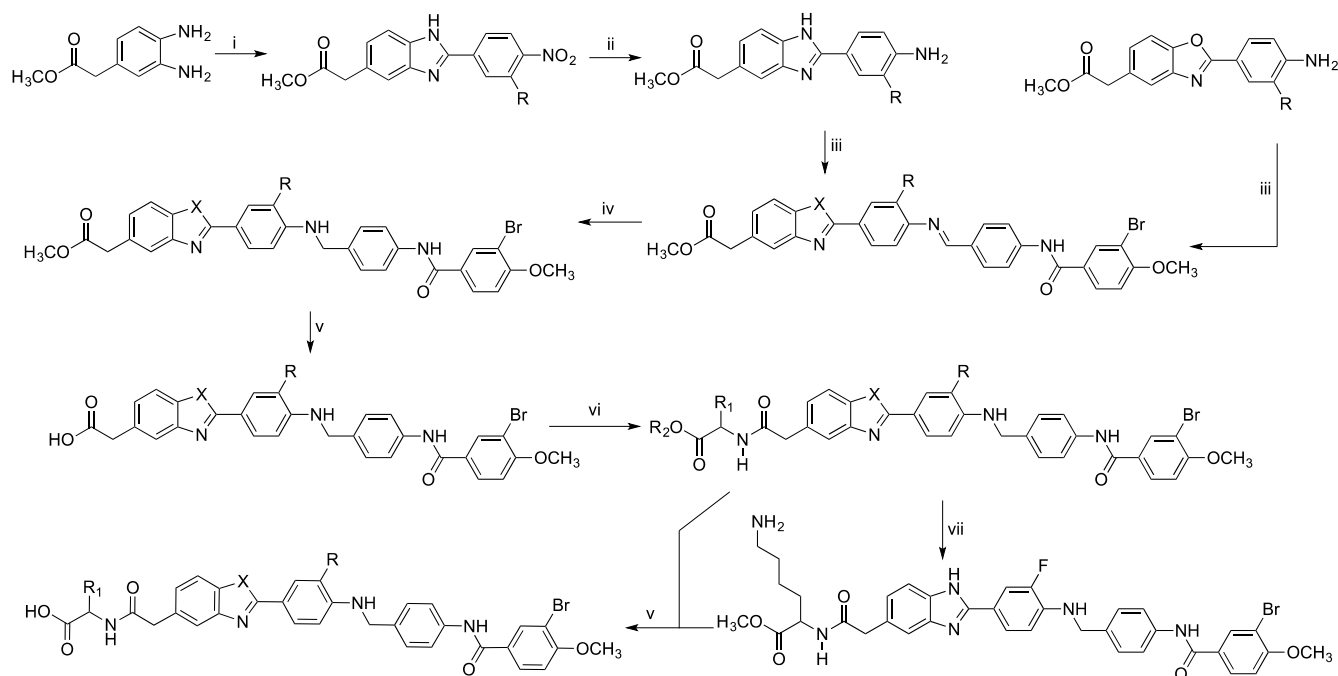


Abbiamo, così, ottenuto una nuova serie di derivati benzimidazolici e benzossazolici come inibitori di Hpse.



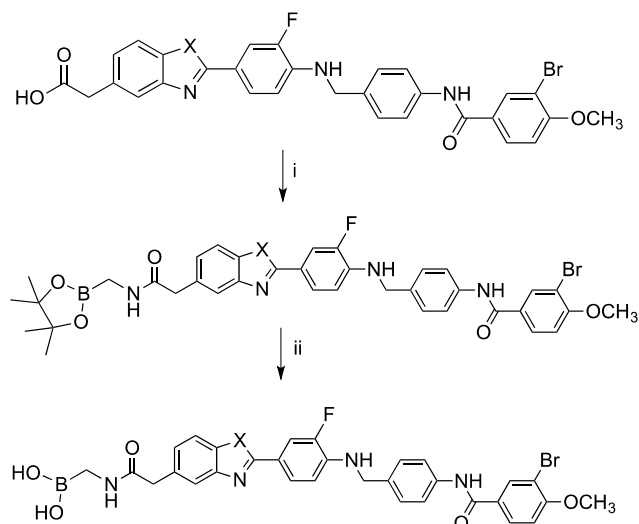
L'anello benzimidazolico è stato sintetizzato a seguito di reazione di condensazione di metil 2-(3,4-diamminofenil)acetato con l'opportuna 4-nitrobenzaldeide in presenza di ammonio cerio nitrato e acqua ossigenata, per ottenere il derivato anilिनico corrispondente in seguito a riduzione del gruppo nitro mediante reazione di Leuckart. I derivati anilici benzimidazolici e benzossazolici sono stati quindi sottoposti a reazione di amminazione riduttiva impiegando la 3-bromo-N-(4-

formilfenil)-4-metossibenzammide come aldeide ed il NaBH_4 come agente riducente. In seguito ad idrolisi basica per LiOH sono stati ottenuti i derivati acetici acidi che sono poi stati sottoposti a reazione di amidazione in presenza di EDCI, DMAP e DIPEA come base, ottenendo gli amminoesteri benzazolici. Infine, un'idrolisi basica ha fornito i derivati amminoacidici finali. Da notare che per il derivato coniugato con la lisina, è stato necessario rimuovere il gruppo protettore Fmoc impiegando una soluzione di piperidina al 20% in DMF prima di poter procedere con l'idrolisi finale.



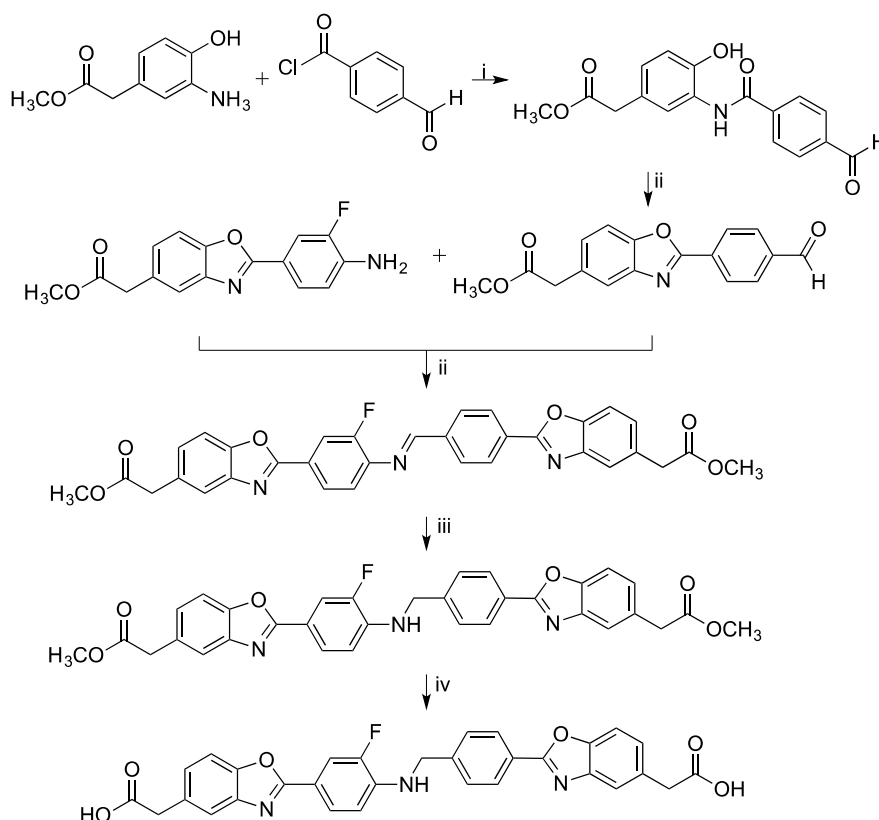
Reagenti: (i) appropriata aldeide, cerio ammoni nitrato, H_2O_2 ; (ii) ammonio formiato, dietilammina, Pd/C ; (iii) 3-bromo-N-(4-formilfenil)-4-metossibenzammide; PTSA; (iv) NaBH_4 ; (v) LiOH ; (vi) appropriato amminoestere, EDCI, DMAP, DIPEA; (vii) piperidina 20% in DMF.

Per quanto riguarda i derivati boronici, sono stati sintetizzati in maniera analoga a quanto precedentemente descritto, impiegando il (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)metanammio cloruro come base per la reazione di amidazione, in presenza di TBTU e DIPEA come base. Infine, il gruppo acido boronico è stato ottenuto per clivaggio ossidativo impiegando il metaperiodato di sodio in presenza di una soluzione acquosa di acetato d'ammonio.



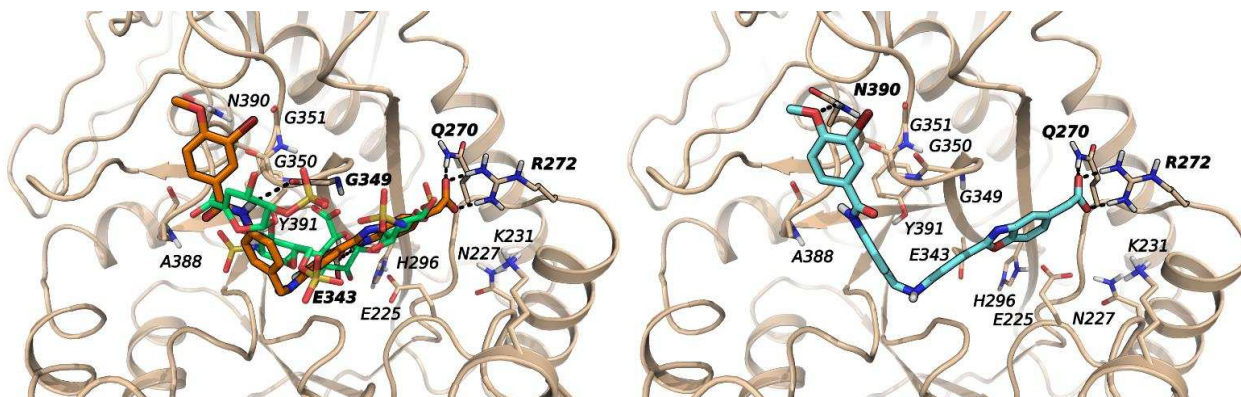
Reagenti: (i) (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)metanamminio cloruro, TBTU, DIPEA; (ii) NaIO_4 , $\text{NH}_4\text{OAc}_{\text{aq}}$

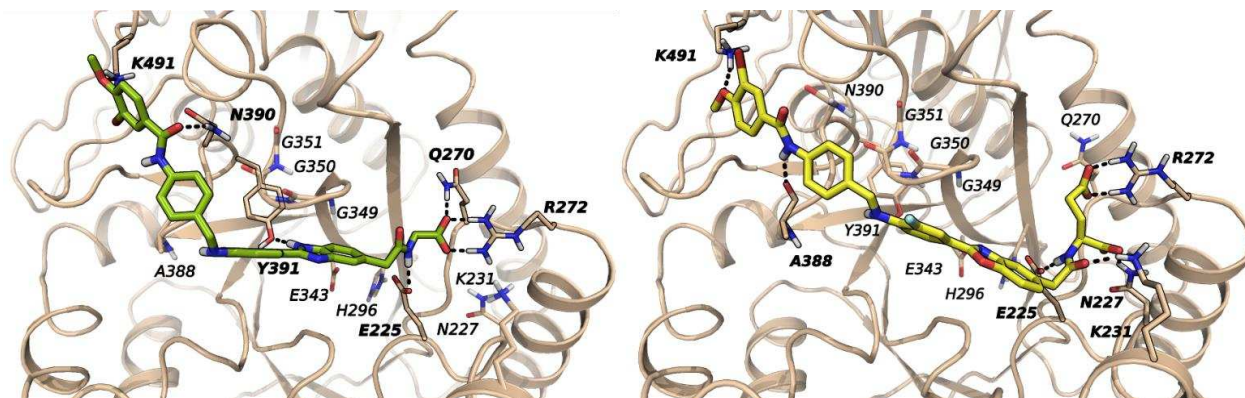
Il derivato bis-benzossazolinico è stato sintetizzato a partire dall'acilazione dell'idrossianilina con il *p*-formilbenzoil cloruro utilizzando come base la trietilammina. Il derivato ammidico così ottenuto è stato sottoposto a chiusura dell'anello acido catalizzata per dare il corrispondente benzossazolinil derivato che è stato sottoposto ad amminazione riduttiva impiegando l'anilina precedentemente descritta ed il NaBH_4 come agente riducente. Infine, un'idrolisi basica ha fornito il derivato bis-benzossazolinico acido finale.



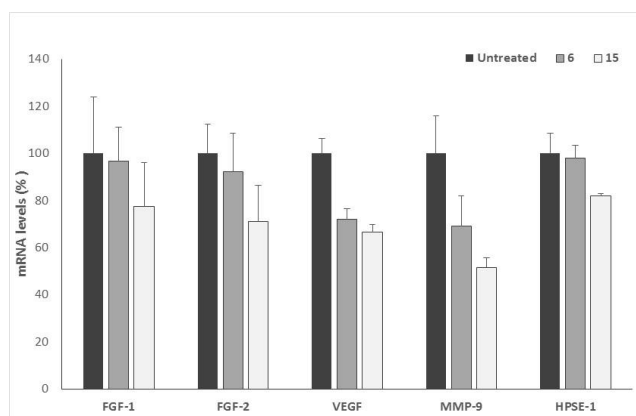
Reagenti: (i) Et_3N ; (ii) PTSA; (iii) NaBH_4 ; (iv) LiOH .

La maggior parte dei derivati neosintetizzati ha mostrato attività inibitoria a concentrazioni micro e submicromolari in saggi enzimatici, confermando il ruolo essenziale dell'atomo di fluoro per l'inibizione del target enzimatico. Studi di docking al sito attivo di Hpse condotti sui due derivati amminoacidi più attivi della serie in confronto con i corrispondenti benzazoli acetici hanno mostrato che: (i) il legame degli inibitori impedisce l'accomodazione del substrato al sito attivo; (ii) interazioni addizionali sono possibili per i derivati amminoacidici; (iii) sia lo scaffold benzimidazolico che benzossazolico sono efficaci nell'interazione con il sito attivo.





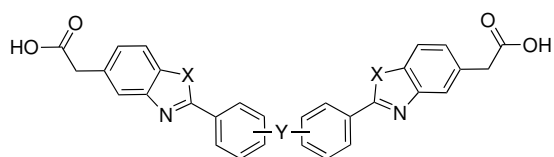
Inoltre, i derivati più attivi in saggi enzimatici hanno dimostrato di non interferire con la proliferazione cellulare, confermando il loro potenziale anti-metastatico in saggi di invasività su cellule tumorali. Consistentemente con la capacità inibitoria di Hpse, è stata dimostrata la diminuzione dell'espressione genica di geni codificanti per fattori proangiogenici quali MMP-9, VEGF, FGF-1 e FGF-2 in cellule tumorali (*J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 6918-6936).



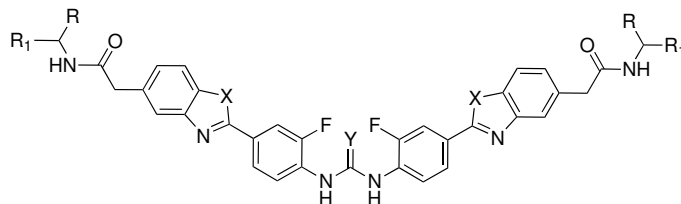
Tale progetto è stato condotto in collaborazione con un'azienda leader nel settore, la Leadiant Bioscience (ex Sigma-tau SpA), che ha precedentemente sviluppato il roneparstat, inibitore sopracitato di Hpse in trial clinico. Questo lavoro, inoltre, ha portato al deposito di un brevetto su derivati benzazolici come inibitori dell'enzima eparanasi (G. Giannini, G. Battistuzzi, R. Di Santo. R. Costi, V. N. Madia: "2-(4-(4-(Bromo-Methoxybenzamido)Benzylamino)Phenyl)Benzazole Derivatives and Their use as anti-heparanase" **2017**, EP 17163015.5).

Partendo dai risultati molto promettenti summenzionati e tenendo in considerazione la buona attività inibitoria anti-Hpse di inibitori a struttura simmetrica riportati in letteratura, abbiamo progettato e sintetizzato una nuova serie di derivati simmetrici caratterizzati dall'introduzione di una porzione centrale più rigida (tipicamente un gruppo 1,3-difenilureidico) rispetto ai composti precedentemente sintetizzati al fine di consentire un legame migliore con la tasca enzimatica. Più in dettaglio, i nuovi composti mostrano una o più delle seguenti caratteristiche: (i) uno scaffold benzossazolil-acetico o benzimidazolil-acetico; (ii) funzionalizzazione della porzione acetica con vari amminoacidi o acidi amminoalchil boronici; (iii) sostituzione della porzione benzossazolil-acetica con una 5,6-dimetilbenzossazolica; (iv) sostituzione dell'urea con una tiourea, una guanidina, un isopropanolo o un 2-propanone; (v) introduzione di una 1,3-di(piperidin-4-il)urea in sostituzione della 1,3-difenilurea; (vi) apertura dell'anello benzazolico e introduzione di una funzione *o*-idrossiammidica, ammidica o solfonammidica; (vii) sostituzione della porzione 2-(3-benzammidofenil)acetica con una 3-benzammidobenzoica o (3-benzammidofenil)boronica acida; (viii) shift del gruppo ureidico dalla posizione para a quella meta dell'anello interno e (ix) introduzione di un atomo di fluoro in posizione orto al gruppo ureidico o tioureidico.

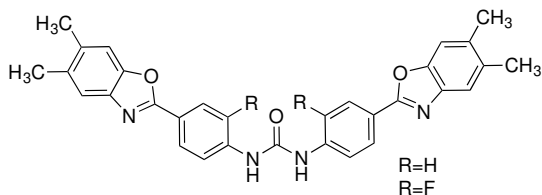
Abbiamo, così, ottenuto una nuova serie di derivati benzimidazolici e benzossazolici a struttura simmetrica come inibitori di Hpse.



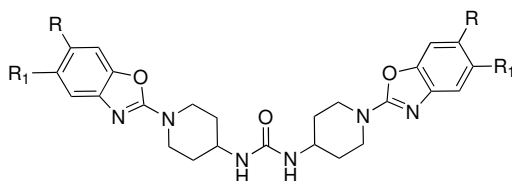
X=O, Y=4-NHCONH
 X=O, Y=3-NHCONH
 X=O, Y=3-F; 4-NHCONH
 X=O, Y=4-NHCSNH
 X=O, Y=3-F; 4-NHCSNH
 X=O, Y=4-C(NH)₃
 X=NH, Y=3-F; 4-NHCONH
 X=NH, Y=3-F; 4-NHCSNH



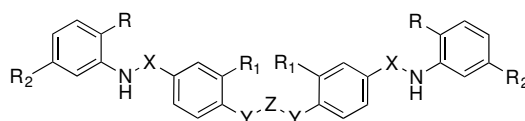
X=O, Y=O, R=H, R₁=COOH
 X=O, Y=O, R=CH₃, R₁=COOH
 X=O, Y=O, R=CH₂Ph, R₁=COOH
 X=O, Y=O, R=H, R₁=CH₂CH₂CH(CH₃)₂
 X=O, Y=O, R=CH₂CH(CH₃)₂, R₁=B(OH)₂
 X=O, Y=O, R=H, R₁=B(OH)₂
 X=O, Y=S, R=H, R₁=COOH
 X=NH, Y=O, R=H, R₁=COOH
 X=NH, Y=O, R=CH₂Ph, R₁=COOH
 X=NH, Y=O, R=H, R₁=B(OH)₂



R=H
 R=F



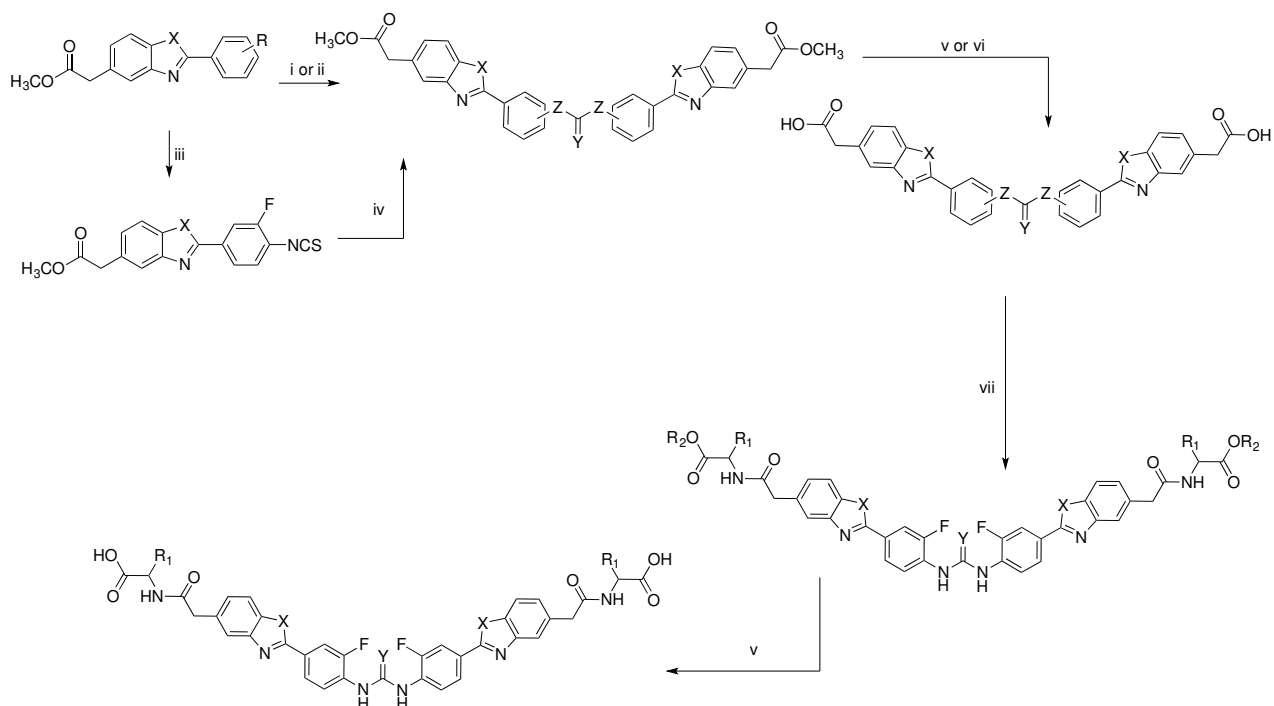
R=H, R₁=CH₂COOH
 R=R₁=CH₃



X=CO, Y=NH, Z=CO, R=OH, R₁=H, R₂=CH₂COOH
 X=CO, Y=NH, Z=CO, R=H, R₁=H, R₂=CH₂COOH
 X=SO₂, Y=NH, Z=CO, R=H, R₁=H, R₂=CH₂COOH
 X=CO, Y=NH, Z=CS, R=H, R₁=F, R₂=CH₂COOH
 X=CO, Y=CH₂, Z=CHOH, R=OH, R₁=H, R₂=CH₂COOH
 X=CO, Y=CH₂, Z=CHOH, R=H, R₁=H, R₂=CH₂COOH
 X=CO, Y=CH₂, Z=CO, R=H, R₁=H, R₂=CH₂COOH
 X=CO, Y=NH, Z=CO, R=H, R₁=H, R₂=COOH
 X=CO, Y=NH, Z=CO, R=H, R₁=H, R₂=B(OH)₂

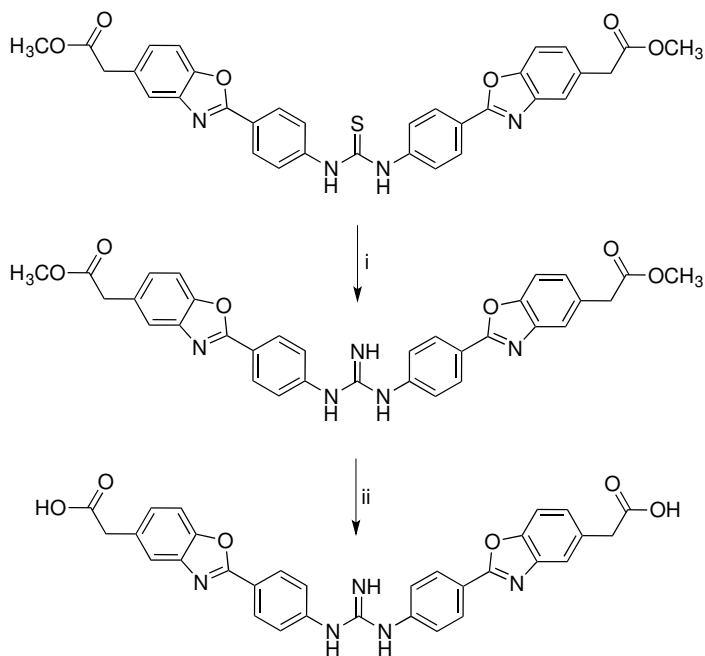
I derivati benzossazolil-acetici e benzimidazolil-acetici ed i loro analoghi caratterizzati dalla funzionalizzazione della porzione acetica con residui amminoacidici o acidi amminoalchil boronici sono stati sintetizzati a partire da una reazione di condensazione dell'appropriato derivato anilnico con trifosgene o tiocarbonildiimidazolo (tio-CDI), ottenendo i corrispondenti derivati ureidici o tioureidici i quali sono stati idrolizzati in ambiente basico a fornire i derivati acidi. E' interessante sottolineare che per la sintesi dei derivati tioureidici caratterizzati dalla presenza di un atomo di fluoro sull'anello centrale si è ricorso ad una reazione assistita da microonde dell'opportuno derivato anilnico con i corrispettivi isotiocianati precedentemente sintetizzati per reazione delle stesse ammine con tiofosgene. Successivamente, i derivati acetici acidi sono stati sottoposti a reazione di coupling con l'appropriato amminoestere in presenza di EDCI e DMAP usando la DIPEA come base, a fornire i corrispondenti esteri che per reazione di idrolisi basica hanno condotto ai corrispettivi derivati amminoacidici.

Alberto Benincà



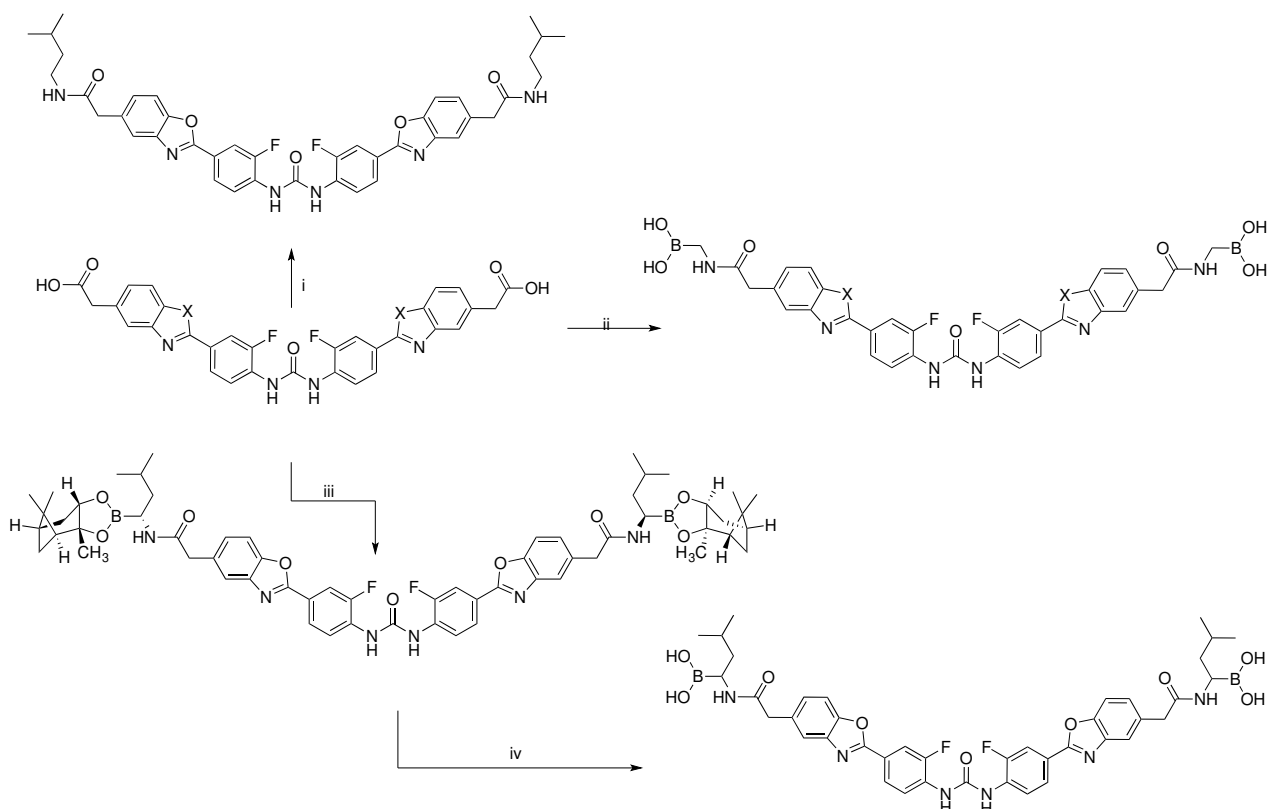
Reagenti: (i) trifosgene, Et₃N; (ii) tio-CDI; (iii) tiofosgene; (iv) appropriata anilina, MW; (v) LiOH, H₂O; (vi) NaOH, H₂O; (vii) appropriato amminoestere, EDCI, DMAP, DIPEA.

Per quanto concerne la sintesi del derivato guanidinico, esso è stato ottenuto per idrolisi basica a partire dal corrispondente derivato estereo a sua volta sintetizzato dall'analogo tioureidico per reazione con esametildisilazano in presenza di EDCI.



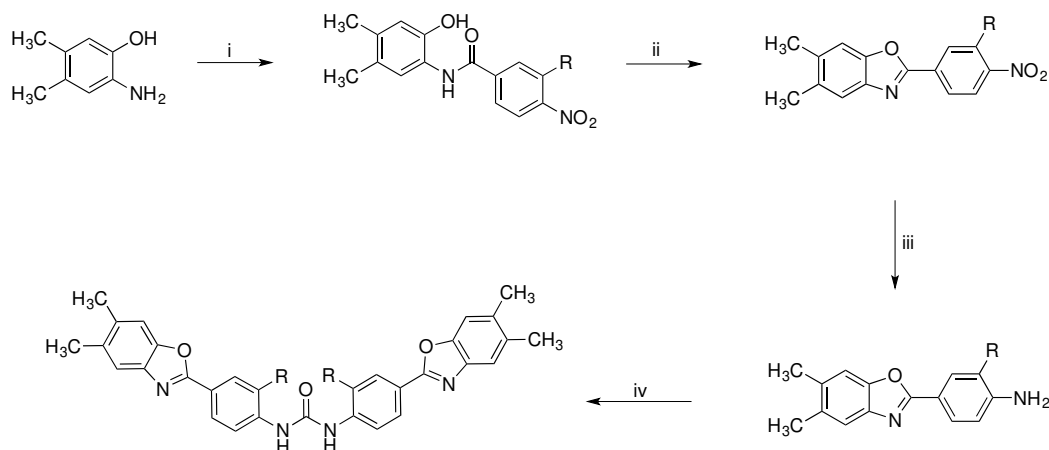
Reagenti: (i) esametildisilazano, EDCI; (ii) LiOH, H₂O.

I derivati acidi amminoalchil boronici e il derivato isopentilico sono stati sintetizzati mediante reazione di coupling dell'opportuno estere amminoalchil boronico con l'appropriato derivato benzazolico acido in presenza di TBTU e DIPEA a basse temperature, a fornire l'estere boronico del pinandiolo o direttamente gli acidi boronici nel caso di gruppi esterei boronici meno ingombranti (nel caso del pinacolo). Abbiamo ipotizzato a tal proposito che gli esteri del pinandiolo siano più resistenti all'idrolisi e pertanto abbiamo deciso di ricorrere ad un clivaggio ossidativo del pinandiolo impiegando il sodio metaperiodato in presenza di una soluzione acquosa di acetato d'ammonio 0,1 N. L'utilizzo di tale elettrofilo ossidante ha rappresentato una scelta oculata a causa della ben nota suscettibilità degli acidi boronici a nucleofili ossidanti. E' interessante, inoltre, sottolineare che, modificando sia le condizioni della reazione di coupling che l'agente di coupling stesso, si poteva ottenere il derivato isopentilacetamidico. Infatti, tale derivato è stato sintetizzato impiegando il (*R*)- boroLeu-(+)-pinandiolo cloridrato in presenza di EDCI, DMAP e DIPEA a temperatura ambiente.



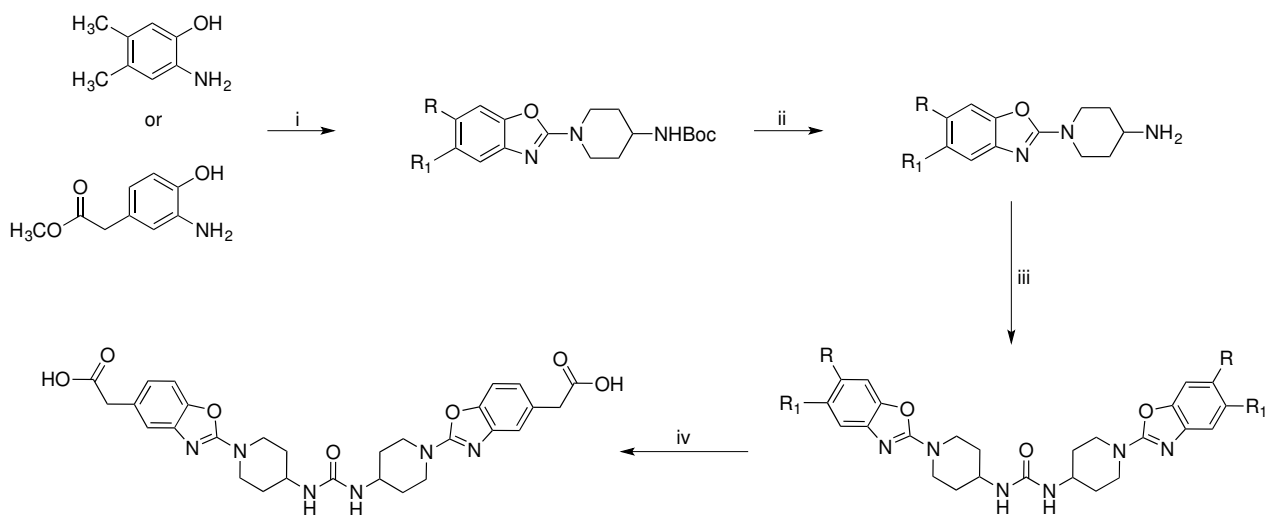
Reagenti: (*R*)-boroLeu-(+)-pinandiolo cloridrato, EDCI, DMAP, DIPEA; (ii) (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)metanaminio cloruro, TBTU, DIPEA; (iii) (*R*)-boroLeu-(+)-pinandiolo cloridrato, TBTU, DIPEA; (iv) $\text{NH}_4\text{OAc}_{\text{aq}}$ 0.1 N, NaIO_4 .

I derivati 5,6-dimetilbenzossazolici sono stati sintetizzati mediante iniziale reazione di acilazione del 2-ammino-4,5-dimetilfenolo con l'appropriato cloruro acilico in presenza di trietilammina, ottenendo le ammidi corrispondenti le quali sono andate incontro a ciclizzazione termica in presenza di acido *p*-toluensolfonico come catalizzatore a fornire i corrispettivi derivati benzossazolico. Si è eseguita, quindi, una reazione di riduzione catalitica del gruppo nitro e le ammine corrispondenti così ottenute sono state sottoposte a reazione di condensazione con trifosgene, portando così ai derivati ureidici finali.



Reagenti: (i) appropriato cloruro acilico, Et₃N; (ii) PTSA; (iii) H₂, Pd/C; (iv) trifosgene, Et₃N.

Le uree alicicliche sono state ottenute a partire dall'iniziale reazione del 2-ammino-4,5-dimetilfenolo o del metil 2-(3-ammino-4-idrossifenil)acetato con *O*-etil xantogenato di potassio il quale può comportarsi come un doppio elettrofilo, fornendo pertanto una valida alternativa sintetica al tiofosgene. Gli intermedi instabili mercaptobenzossazolici così ottenuti sono stati immediatamente sottoposti a reazione di sostituzione nucleofila con la 4-(*N*-Boc-ammino)piperidina e quindi deprotetti sull'azoto esociclico in ambiente acido da CF₃COOH. Infine, tali intermedi amminici hanno fornito le corrispondenti uree per reazione di condensazione con trifosgene e successiva idrolisi basica.



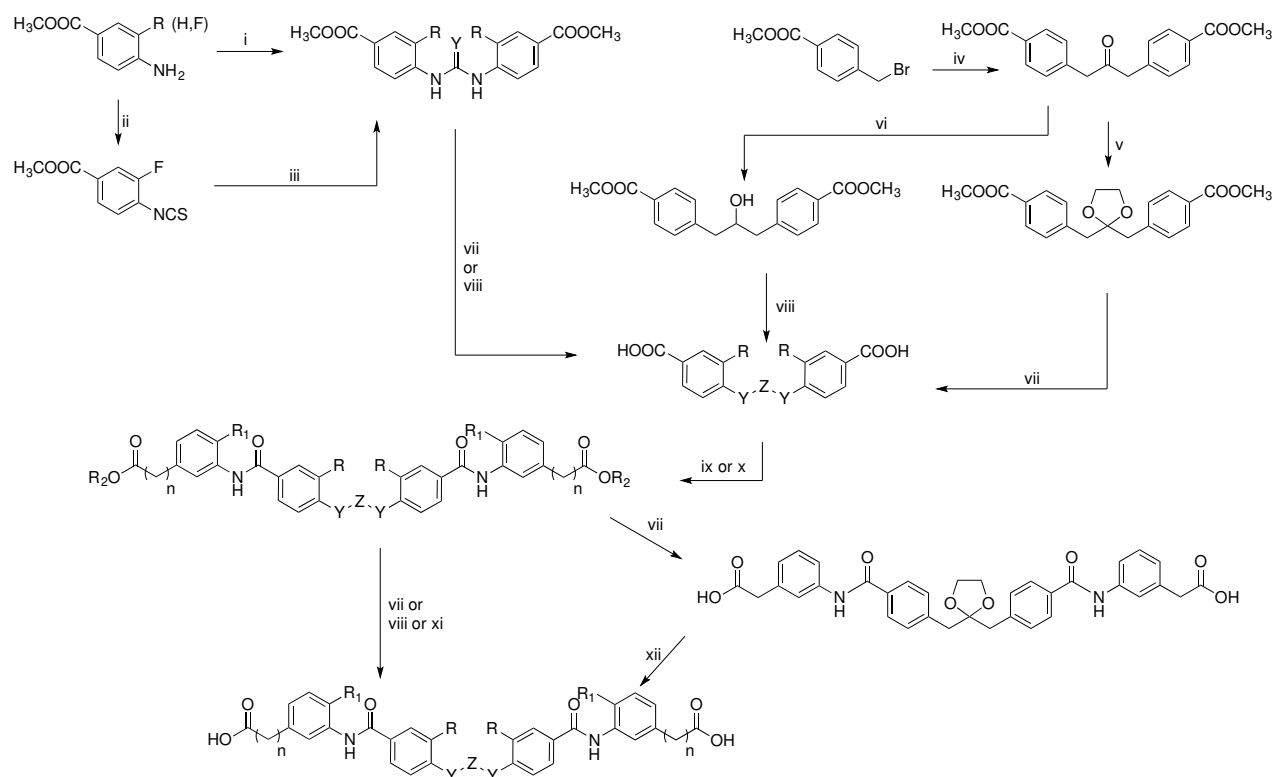
Reagenti: (i) 1) O-etil xantogenato di potassio, piridina, 2) 4-(N-Boc-ammino)piperidina; (ii) CF_3COOH ; (iii) trifosgene, Et_3N ; (iv) LiOH , H_2O .

I derivati ammidici caratterizzati dall'apertura dell'anello benzazolico sono stati sintetizzati come riportato nei due schemi seguenti. In particolare, nel primo dei due schemi è mostrato un approccio sintetico divergente che ha previsto una prima formazione della porzione centrale difenilureidica, tioureidica, isopropanolica o 2-propanonica, mentre nel secondo dei due schemi è riportata la via sintetica seguita che ha previsto la formazione della funzione ammidica come step iniziale.

Per quanto concerne il primo dei due approcci, il core centrale caratterizzato dal gruppo carbossilico del derivato ureidico e tioureidico è stato sintetizzato per idrolisi alcalina degli esteri corrispondenti i quali, a loro volta, sono stati ottenuti per reazione del 4-amminobenzoato di metile con trifosgene usando la trietilammina come base (nel caso del derivato ureidico) o per reazione assistita da microonde del 4-ammino-3-fluorobenzoato di metile con l'isotiocianato corrispondente (previamente sintetizzato mediante condensazione dell'anilina summenzionata con tiofosgene). Diversamente, il core centrale del derivato chetale o di quello isopropanolico è stato sintetizzato in seguito ad idrolisi basica degli esteri corrispondenti, a loro volta ottenuti a partire dal 1,3-difenilacetone come intermedio comune per reazione con glicole etilenico (nel caso del chetale) o per riduzione con NaBH_4 (nel caso dell'isopropanolo). L'1,3-difenilacetone a sua volta è stato previamente sintetizzato mediante reazione del 4-(bromometil)benzoato di metile in presenza del *p*-toluensulfonilmetil isocianuro. E' seguita, quindi, una reazione di formazione del gruppo ammidico mediante coupling (in presenza di EDCI, HOBt e *N*-metilmorfolina) o via cloruro acilico con l'opportuna ammina. Infine, la funzione esterea è stata idrolizzata in ambiente alcalino fornendo i

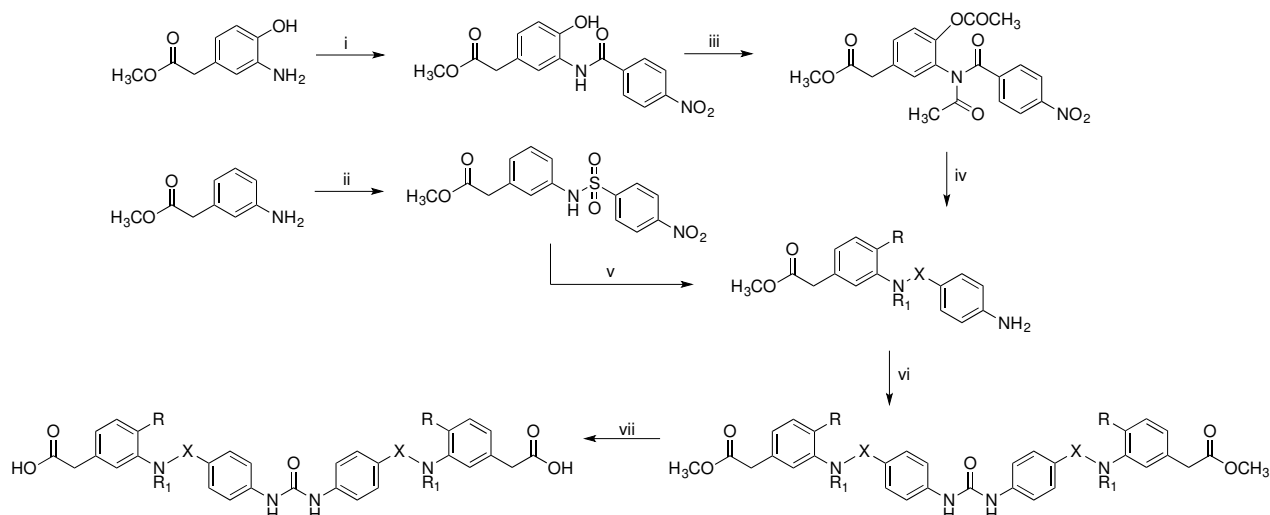
corrispettivi acidi finali. Per quanto riguarda il derivato chetaleico, si è resa necessaria un'ulteriore reazione di deprotezione con acido trifluoroacetico a fornire il corrispondente chetone finale.

Per quanto concerne la sintesi dei derivati riportati nel secondo dei due schemi, si è partiti da una reazione di acilazione del metil 2-(3-amminofenil)acetato o del metil 2-(3-ammino-4-idrossifenil)acetato rispettivamente con *p*-nitrobenzoil cloruro e con *p*-nitrobenzensulfonil cloruro che ha condotto alle ammidi corrispondenti. Sono seguite, quindi, una reazione di riduzione del gruppo nitro (previa protezione con gruppo acetilico nel caso del derivato ossidrilato) e una reazione di condensazione dei derivati amminici così ottenuti con trifosgene, ottenendo i derivati ureidici esterei che per idrolisi basica hanno condotto agli acidi corrispondenti.



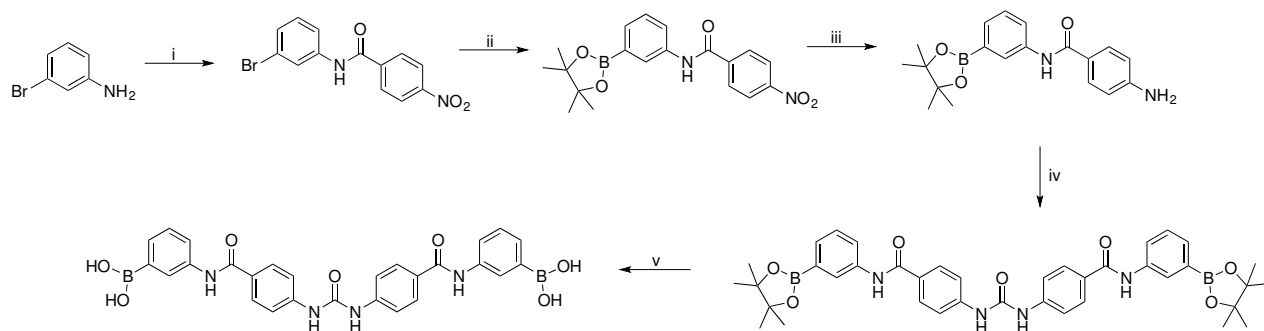
Reagenti: (i) trifosgene, Et₃N; (ii) tiofosgene; (iii) metil 4-ammino-3-fluorobenzoato, MW; (iv) 1) TosMIC, NaOH 40%, TBAI, 2) HCl 37%; (v) glicole etilenico, PTSA; (vi) NaBH₄; (vii) LiOH, H₂O; (viii) NaOH 20%; (ix) metil 2-(3-amminofenil)acetato o etil 3-amminobenzoato, EDCI, HOBt, NMM; (x) 1) ossalil cloruro, 2) metil 2-(3-amminofenil)acetato o metil 2-(3-ammino-4-idrossifenil)acetato, Et₃N; (xi) LiOH; (xii) CF₃COOH.

Alberto Benincà



Reagenti: (i) *p*-nitrobenzoyl cloruro, Et₃N; (ii) *p*-nitrobenzensulfonil cloruro, piridina; (iii) anidride acetica, Et₃N; (iv) H₂, Pd/C; (v) ammonio formiato, Et₃N, Pd/C; (vi) trifosgene, Et₃N; (vii) LiOH, H₂O.

Infine, la sintesi del derivato acido arilboronico è stata eseguita partendo dalla reazione di acilazione della 3-bromoanilina con *p*-nitrobenzoyl cloruro che ha condotto all'ammide corrispondente la quale è stata a sua volta sottoposta a reazione di cross-coupling con bis(pinacolato)diboron in presenza di una quantità catalitica di PdCl₂(PPh₃)₂, ottenendo l'estere boronico corrispondente. In seguito a riduzione catalitica del nitro gruppo, l'ammina così ottenuta è stata sottoposta a condensazione con trifosgene per dare il derivato ureidico corrispondente che a seguito del clivaggio ossidativo dell'estere pinacolico ha condotto all'acido boronico finale.

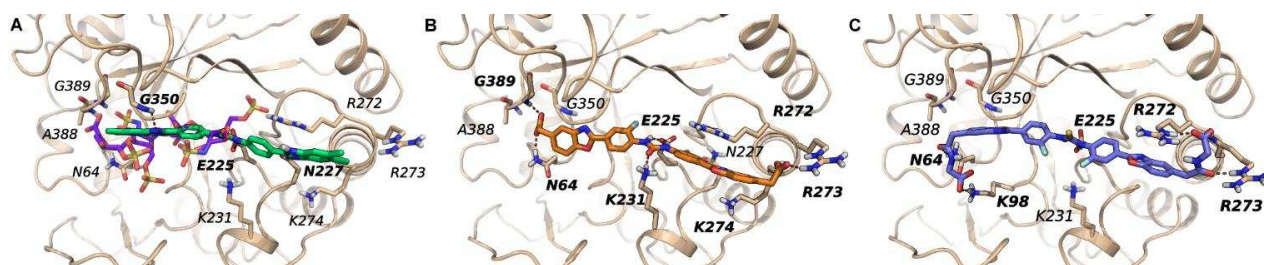


Reagenti: (i) *p*-nitrobenzoyl cloruro, Et₃N; (ii) KOAc, pinacol diborano, PdCl₂(PPh₃)₂; H₂, Pd/C; trifosgene, Et₃N; NH₄OAc_{aq} 0,1 N, NaIO₄.

La maggior parte dei derivati neosintetizzati ha mostrato attività inibitoria a concentrazioni micro e submicromolari in saggi enzimatici, con particolare riferimento ai derivati benzossazolil-

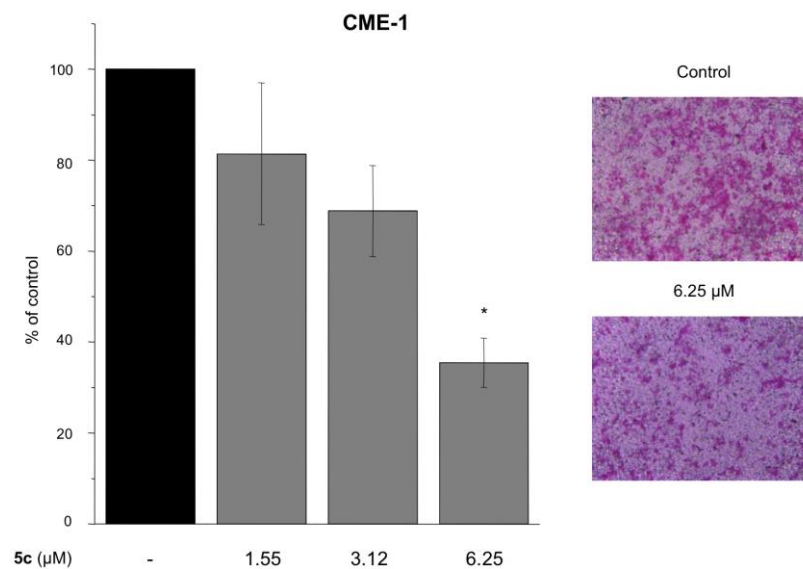
acetici e benzimidazolil-acetici ureidici e tioureidici ed i loro analoghi caratterizzati dalla funzionalizzazione della porzione acetica con residui amminoacidici. Tali derivati, infatti, hanno mostrato attività anti-Hpse nel range del basso micromolare o nanomolare e, tra essi, il derivato benzossazolico coniugato con un residuo di glicina caratterizzato da un gruppo tioureidico rappresenta il più attivo tra i composti neosintetizzati con un valore di IC_{50} pari a 80 nM. Al contrario, i derivati 5,6-dimetilbenzossazolici, le uree alicicliche ed i derivati ammidici caratterizzati dall'apertura dell'anello benzazolico hanno riportato risultati meno promettenti, con soli 4 composti (sui 13 testati) attivi nel range del micromolare. E', inoltre, interessante sottolineare che in generale i derivati simmetrici si sono dimostrati più potenti nell'inibire l'enzima rispetto ai benzazoli asimmetrici precedentemente riportati dal nostro gruppo di ricerca.

Analogamente a quanto precedentemente osservato, l'introduzione di un atomo di fluoro in posizione orto al gruppo ureidico migliora notevolmente il profilo inibitorio. Allo stesso modo si può notare che l'introduzione di un core centrale tioureidico può rappresentare una strategia utile ai fini dell'attività. Inoltre, risulta essere confermato il trend secondo cui la presenza di una catena laterale flessibile come il gruppo acetico e/o la sua funzionalizzazione con residui amminoacidici aumenti l'attività inibitoria, suggerendo che tali catene dotate di maggior livello di libertà conformazionale possano legare meglio la tasca di binding di Hpse.



Studi di docking al sito attivo di Hpse condotti sui due derivati più attivi della serie in confronto con il composto di letteratura 5,6-dimetilbenzimidazolico hanno mostrato pose di legame simili (il legame degli inibitori impedisce l'accomodazione del substrato al sito attivo), evidenziando però che i derivati neosintetizzati sono in grado di stabilire interazioni polari addizionali, fornendo una possibile spiegazione alla loro maggiore potenza inibitoria.

La valutazione in vitro della capacità di influenzare la proliferazione cellulare e l'invasività di cellule tumorali condotta sui derivati più attivi ha confermato il potenziale antimetastatico e antiangiogenico di tali inibitori. Inoltre, essi si sono dimostrati in grado di ridurre l'espressione genica di geni codificanti per fattori proangiogenici quali MMP-9, VEGF, FGF-1 e FGF-2 in cellule tumorali (*J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 10834-10859).



Anche tale progetto è stato condotto, analogamente al precedente, in collaborazione con un'azienda leader nel settore, la Leadiant Bioscience (ex Sigma-tau SpA), che ha precedentemente sviluppato il roneparstat, inibitore di Hpse in trial clinico.

RICERCHE SU METODI ESTRATTIVI

Gli estratti di cannabis (*Cannabis sativa* L.) stanno richiamando sempre più attenzione grazie al loro potenziale terapeutico per il trattamento di pazienti affetti da cancro, AIDS, sclerosi multipla e varie altre patologie. Abbiamo quindi deciso di analizzare l'impiego di tre metodiche alternative ai protocolli attualmente utilizzati dai farmacisti per l'estrazione dell'olio di cannabis: l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE), l'estrazione assistita da microonde (MAE) e l'estrazione mediante impiego di Tween 20 come surfattante. I metodi comunemente usati dai farmacisti prevedono l'impiego di etanolo o olio d'oliva come solvente di estrazione, a temperatura ambiente o a caldo. L'obiettivo del nostro studio è consistito nel proporre una valida alternativa (in termini di composizione dell'estratto) che potesse essere realizzata con facilità dai farmacisti. Sono state condotte estrazione mediante sonicazione, impiego del microonde o semplice reflusso della cosiddetta "cannabis light" (Eletta campana e Carmagnola selezionata) e della cannabis di grado farmaceutico (Bediol[®], FM2[®] and Bedrocan[®]) in varie condizioni di temperatura (60° C – 120° C) tipo di solvente (etanolo o soluzione acquosa di Tween 20) e tempo di estrazione.

Al fine, quindi, di valutare la migliore metodica estrattiva alternativa, è stata determinata la composizione dell'estratto (mediante HPLC) nei principali cannabinoidi: CBD-A, CBD, THC, THC-A e CBN. Grazie ai risultati ottenuti, è stato possibile evincere che le condizioni di estrazioni migliori si ottengono impiegando il microonde o gli ultrasuoni e che la MAE consente di accorciare drasticamente i tempi di estrazione mentre la UAE permette di lavorare a temperature più basse rispetto alle metodiche comunemente utilizzate (*Nat. Prod. Res.* **2019**, 34(20), 2952-2958).

Amaranto spp. (famiglia delle Amaranthaceae), note come amaranto, sono piante originarie dell'America Centrale, oggi prodotte in molte parti del mondo a causa della loro popolarità popolare come alimento salutare. Per la sua composizione, l'amaranto può essere considerato attraente non solo come alimento ma anche per usi farmaceutici e cosmetici. Ad oggi, l'attività antimicotica degli estratti di amaranto non è stata completamente studiata, pertanto lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'effetto antimicotico della frazione apolare dell'estratto di semi di *Amaranthus cruentus* L., da solo e in associazione con farmaci antimicotici terbinafina, un comune antimicotico agente, che di per sé ha solo effetto fungistatico sui ceppi di *Candida albicans* senza esercitare attività fungicida. Tali risultati dimostrano che questo olio di amaranto in combinazione

con terbinafina ha attività fungistatica e fungicida sinergica, con FICI rispettivamente di 0,466 e 0,496. Non è stata osservata alcuna attività fungistatica e fungicida della sola terbinafina a concentrazioni fino a 64 µg/mL e del solo olio di amaranto a concentrazioni fino a 2000 µg/mL, contro tutti i ceppi di *C. albicans* testati. Non mostra attività nei confronti di ceppi di *Candida albicans* ma può potenziare efficacemente l'attività antimicotica della terbinafina, un comune agente antimicotico. Questo risultato suggerisce la possibile applicazione dell'olio di amaranto nella preparazione con terbinafina per uso topico (*Nat. Prod. Res.* **2019**, 1-6. Published online: DOI: 10.1080/14786419.2019.1696335).

Asphodelus ramosus L. è un genere comprendente diverse specie erbacee, conosciute con il nome banale Asphodelus. Queste piante sono note fin dall'antichità sia per usi alimentari che terapeutici, in particolare per il trattamento di diverse malattie associate a situazioni infiammatorie e infettive della pelle. Studi fitochimici hanno rivelato la presenza di diversi costituenti, principalmente antrachinoni, triterpenoidi, acidi fenolici e flavonoidi. Sebbene sia stata pubblicata un'ampia letteratura su questi costituenti, è stata riportata una scarsità di informazioni sulla composizione dei carboidrati, come fruttani e derivati simile ai fruttani. L'estrazione dei polisaccaridi neutri idrosolubili viene comunemente eseguita mediante estrazione ad acqua, talvolta assistita da microonde e ultrasuoni. Pertanto, lo scopo dello studio è stata l'estrazione alcalina di tuberi-radici di *Asphodelus ramosus* L., analizzando i polisaccaridi idrosolubili ottenuti per precipitazione dall'estratto alcalino e la sua successiva purificazione mediante cromatografia. Un polisaccaride è stato isolato mediante estrazione alcalina; lo studio HPTLC per determinarne la composizione ha mostrato che il fruttosio è il principale monosaccaride. L'analisi FT-IR ha mostrato la presenza di una struttura di tipo inulina e le analisi NMR ci hanno permesso di concludere che le radici di *A. ramosus* contengono polisaccaride con un fruttooligosaccaride di tipo inulina con un grado di polimerizzazione di 7-8 (*Pharmaceuticals* **2021**, 14(3), 278).

Commiphora myrrha (Nees) Engl è l'essudato resinoso prodotto da *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. è comunemente noto come vera mirra ed è stato utilizzato fin dall'antichità per diverse applicazioni medicinali. Finora sono stati identificati centinaia di metaboliti nel componente volatile della mirra, principalmente sesquiterpeni. Sebbene diversi sforzi siano stati dedicati all'identificazione di questi sesquiterpeni, le analisi fitochimiche sono state eseguite mediante gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC-MS) dove l'alta temperatura impiegata può favorire la

degradazione dei componenti. Lo studio ha riportato l'estrazione di *C. myrrha* mediante CO₂ supercritica, un metodo di estrazione noto per le condizioni di estrazione blande che consentono di evitare reazioni chimiche indesiderate durante il processo. Inoltre, le analisi dell'olio di mirra e dei suoi metaboliti sono state eseguite mediante HPLC e GC-MS. Inoltre, è stata valutata l'attività antivirale contro il virus dell'influenza A degli estratti di mirra, che è stato possibile apprezzare dopo l'aggiunta di vitamina E acetato (α -tocoferil acetato) all'estratto. Inoltre, sono stati testati i singoli principali componenti bioattivi dell'olio di *C. myrrha* disponibili in commercio. È interessante notare che sia il furanodienone che il curzerene influenzano la replicazione virale agendo su diverse fasi del ciclo di vita del virus (*Pharmaceuticals* **2021**, 14(3), 243).

Roma, 16 ottobre 2021

