



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

**COMPLESSI DI METALLI DI TRANSIZIONE COME
PROMETTENTI AGENTI ANTIVIRALI CONTRO IL SARS-CoV-2**

Relatore: Dott. Thomas Scattolin

Laureando: Diletta Castellucci

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Complessi di metalli di transizione come promettenti agenti antivirali contro il SARS-CoV-2

INDICE

INTRODUZIONE		6
1. SARS-CoV-2		6
1.1 Struttura	7	
1.2 Fattori epidemiologici	10	
1.3 Patologie	10	
2. VACCINI COVID-19 COME PRINCIPALE MISURA DI PREVENZIONE		12
2.1 Vaccini ad intero virus	13	
2.2 Vaccini a base di proteine	13	
2.3 Vaccini a vettore virale	14	
2.4 Vaccini ad acido nucleico	14	
3. TERAPIE PER IL TRATTAMENTO DEI SINTOMI DA SARS-CoV-2		17
ANTIVIRALI ORGANICI		17
3.1 Remdesivir		17
3.2 Nirmatrelvir-Ritonavir		18
3.3 Molnupiravir		20
3.4 Antivirali organici in fase di sperimentazione clinica		21
4. TERAPIA IMMUNOMODULANTE	23	
4.1 Corticosteroidi		23
4.2 Inibitori di interleuchina-6		24
4.3 Inibitori di Janus chinasi		25
4.4 Direzioni future per le terapie a base di anticorpi nel COVID-19		25

5. ANTIVIRALI CONTENENTI METALLI	27
5.1 Le proteine bersaglio per i metallo-farmaci	28
5.2 DNA come bersaglio per i metallo-farmaci	32
6. ESEMPI DI COMPLESSI METALLICI COME ANTIVIRALI	36
6.1 Complessi di oro (Au) per la cura di malattie virali	36
6.2 Complessi di ferro (Fe) per la cura di malattie virali	38
SCOPO	44
7. ANTIVIRALI A BASE METALLICA PER LA CURA DEL COVID-19	45
7.1 Complessi metallici come inibitori dell'interazione tra la proteina Spike (S) e il recettore ACE2	46
7.2 Complessi metallici come inibitori della proteasi-papaina (PLpro)	46
8. COMPLESSI DI ORO	47
9. COMPLESSI DI RAME	51
10. COMPLESSI DI ALTRI METALLI COME INIBITORI DELLA PAPAINA PROTEASI PL _{pro}	53
11. POLIOSSOMETALATI (POM)	57
CONCLUSIONE	60
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	63

Complessi di metalli di transizione come promettenti agenti antivirali contro il SARS-CoV-2

INTRODUZIONE

1. SARS-CoV-2

Il COVID-19, abbreviazione di "COroNaVirus Disease 2019", appartiene alla famiglia dei coronavirus, comprendente il già noto SARS-CoV (Sindrome Respiratoria Acuta Grave) e il MERS-CoV (Sindrome Respiratoria Mediorientale).

Definito anche come SARS-CoV-2, il virus è stato sequenziato genomicamente su un campione prelevato da un paziente colpito da polmonite, di cui non si conosceva la causa, all'inizio della pandemia del 2019-2023 a Wuhan.

È un ceppo sottogenere della Sarbecovirus, della sottofamiglia dei coronavirus, responsabili di patologie che vanno da raffreddore comune a malattie più gravi come la sindrome respiratoria mediorientale (MERS) e la sindrome respiratoria acuta grave (SARS).

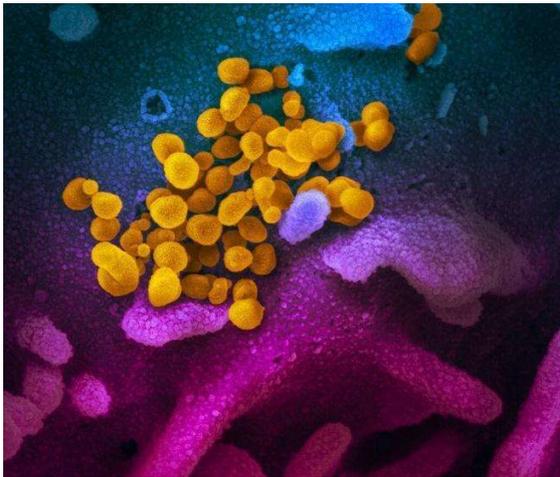


Figura 1: virioni di SARS-CoV-2 (giallo) che emergono dalla superficie di cellule infette (blu-rosa) coltivate in laboratorio

Il genoma del SARS-CoV-2 è formato da 29.881 nucleotidi di cui l'89% identici a quelli del SARS-CoV-1; tuttavia soltanto il 40% degli amminoacidi coincide con quelli dei coronavirus legati alla SARS.

Inoltre, recentemente sono state recentemente identificate delle specie di pipistrelli residenti nelle caverne del Laos settentrionale con un'identità di sequenza genomica superiore al 96% ed elevata similarità strutturale delle proprie proteine vitali ai fini della capacità replicativa ed infettiva, indicandoli come i virus animali più prossimi al SARS-CoV-2.

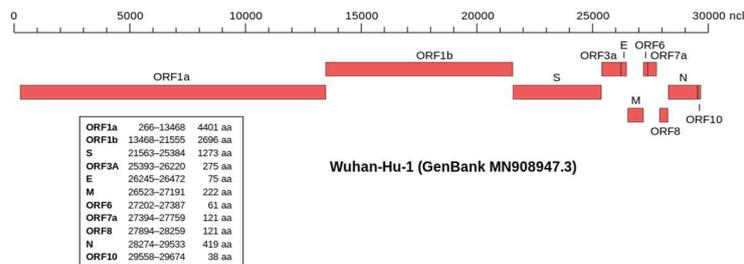


Figura 2: organizzazione del genoma del SARS-CoV-2

Gli istituti di ricerca e per il controllo delle malattie cinesi hanno identificato il genoma costituito da una singola elica di RNA di circa 30 kb (30000 basi).

1.1 Struttura

Ogni virione ha un diametro di circa 50-200 nanometri.

Come altri coronavirus, SARS-CoV-2 presenta 4 proteine strutturali note come:

- Proteina S (spike o spinula)
- Proteina E (involucro)
- Proteina M (membrana)
- Proteina N (nucleocapside)

La proteina N contiene il genoma del RNA, mentre le proteine S, E ed M creano insieme il capsido virale.

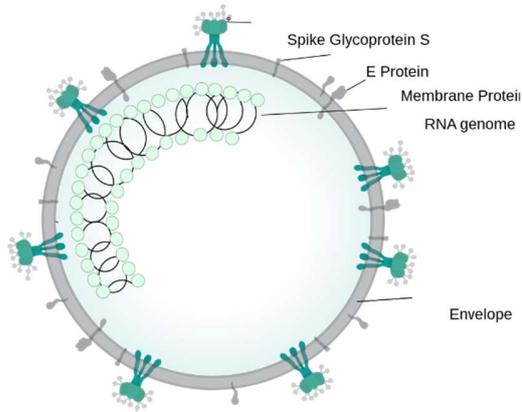


Figura 3: struttura del virione

La proteina spike, che è stata analizzata a livello atomico mediante microscopia crioelettronica, è quella che permette al virus di attaccarsi alla membrana di una cellula ospite.

Gli esperimenti di modellizzazione sulla proteina S del virus hanno suggerito che SARS-CoV-2 ha affinità con i recettori dell'enzima 2 di conversione dell'angiotensina (ACE2) delle cellule umane per usarle come “porta” di entrata nella cellula.

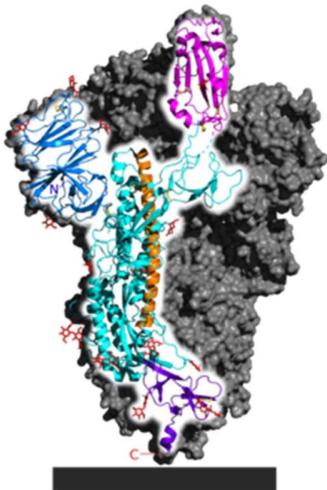


Figura 4: proteina S del SARS-CoV-2 con evidenza sulla subunità proteica. il dominio del legame per l'ACE2 è magenta

La proteina S è suddivisa in due subunità S1 ed S2; la subunità S1 contiene il dominio di unione al recettore (DUR) ed è responsabile dell'attacco iniziale del virus alla cellula ospite tramite unione S1-recettore cellulare, mentre la subunità S2 è responsabile della fusione della membrana cellulare per l'inserimento del RNA virale all'interno.



Figura 5: rappresentazione schematica della proteina S

Nei virus maturi la proteina S è presente come un trimero a forma di fungo con un DUR localizzato su ognuna delle tre subunità S1 che fanno a testa poggiando su uno stelo molto flessibile composto dalla subunità S2.

I DUR cambiano continuamente tra posizione alzata e sdraiata. A differenza della proteina S del SARS-CoV in cui i DUR sono preferibilmente in posizione alzata, la proteina S del SARS-CoV-2 mantiene prevalentemente i DUR in posizione sdraiata; questo spiega il fatto che, nonostante il DUR del SARS-CoV-2 mostri maggiore affinità per l'ACE, la sua minore accessibilità fa risultare un'affinità SARS-CoV-2/ACE comparabile o minore dell'affinità SARS-CoV/ACE.

Tuttavia, questa caratteristica di avere un DUR più nascosto rende più facile l'evasione dell'immunosorveglianza dell'organo ospite.

Come le proteine di fusione di molti altri virus, la proteina S è attivata da proteasi cellulari presenti sulla superficie delle cellule umane. L'attivazione di tale proteina del SARS-CoV-2 è un processo che richiede il taglio proteolitico in due distinti punti, S1/S2 e S2', che separa le due subunità S1 e S2 che però rimangono unite non covalentemente.

I tagli sono dovuti a due proteine presenti sulla membrana della cellula ospite al punto S1/S2 tramite la furina, una proteina transmembrana che normalmente catalizza il rilascio di proteine

mature a partire da precursori, e al punto S2' tramite la serina proteasi 2 transmembranica (TMPRSS2), il cui ruolo fisiologico è tuttora ignoto.

In seguito al taglio si ha lo sbloccaggio del peptide di fusione (PF) che a questo punto di protende per fondersi alla membrana cellulare.

Una variante della proteina S originale di Wuhan, nota come D614G, si progressivamente sparsa in tutto il mondo divenendo la più diffusa.

Grazie alla mutazione missenso, con il cambio di una glicina con un aspartato nella posizione 614, il virus è risultato, da esperimenti *in vitro* ed *in vivo*, molto più affine per l'ACE2 della cellula ricevente.

A causa della rilevanza della proteina S nell'attacco alle cellule ospiti per la proliferazione del virus, una pressione selettiva continua, causata da persone immunizzate naturalmente o tramite vaccinazione, ha portato a far prevalere la diffusione di varianti virali con modifiche nella sequenza di questa proteina. Questo ha portato a riscontrare varianti virali del SARS-CoV-2 con capacità di maggiore infettività e/o di migliore evasione.

1.2 Fattori epidemiologici

È stato osservato che i coronavirus vengono trasmessi principalmente attraverso uno stretto contatto con un altro individuo, in particolare tossendo e starnutando nel raggio di circa 1-2 metri da un altro soggetto.

Si ritiene infatti, che nella maggior parte dei casi la diffusione tra persone avvenga attraverso le goccioline respiratorie emesse da un individuo infetto mediante tosse o starnuti.

Sebbene i virus respiratori siano trasmissibili solitamente quando il soggetto malato presenta anche i sintomi, sembrerebbe che il SARS-CoV-2 possa diffondersi anche in occasione di un contatto ravvicinato con un paziente asintomatico.

1.3 Patologie

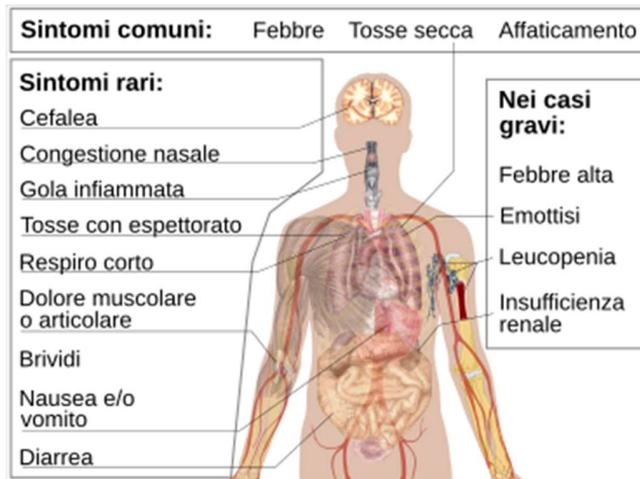


Figura 6: sintomi della malattia COVID-19 dovuta all'infezione da SARS-CoV-2

I pazienti contagiati dal virus accusano solitamente sintomi simili all'influenza come febbre, tosse secca, stanchezza, respiro corto e difficoltà di respiro.

Dall'analisi dei dati condotta dall'Istituto Superiore della Sanità (ISS), sono meno comuni sintomi gastrointestinali, congiuntivite ed eruzioni cutanee, e anche l'emottisi, ovvero l'emissione di sangue dalle vie respiratorie, ad esempio, con un colpo di tosse.

Sintomi che si hanno in una fase avanzata dell'infezione sono la parziale (disosmia), o totale (anosmia) perdita olfattiva, o del gusto (disgeusia) che, al momento, non è chiaro se siano transitorie e possano terminare con la guarigione, o siano permanenti.

I casi di infezione grave possono causare polmonite, insufficienza renale acuta, fino ad arrivare al decesso.

Similmente all'influenza e al SARS-CoV, il SARS-CoV-2 infetta e danneggia gli alveoli.

Al collasso della barriera cellulare separante gli alveoli dai vasi sanguigni, il liquido dai vasi penetra gli alveoli bloccando il trasporto dell'ossigeno al sangue. Una reazione eccessiva del sistema immunitario può peggiorare il danno ai tessuti che, se irreversibile, può risultare letale.

Complessi di metalli di transizione come promettenti agenti antivirali contro il SARS-CoV-2

Analogamente al SARS-CoV e MERS-CoV il danno non si ferma ai polmoni. Un'infezione da SARS-CoV-2 può scatenare una risposta immunitaria eccessiva e può causare una tempesta di citochine che può condurre a un'insufficienza multipla d'organo e alla morte del soggetto.¹

2. VACCINI COVID-19 COME PRINCIPALE MISURA DI PREVENZIONE

Negli ultimi anni sono stati compiuti sforzi massicci per trovare vaccini sicuri ed efficaci nei confronti del COVID-19. Entro luglio 2021 erano presenti 184 candidati vaccini anti COVID-19 in fase di sviluppo preclinico, 105 in fase clinica e 18 vaccini approvati per l'uso di emergenza da almeno un'autorità regolatoria. Questi vaccini includevano interi virus vivi attenuati o inattivati, vaccini a base di proteine, vettori virali e vaccini a base di acidi nucleici. A metà 2021 erano state somministrate nel mondo tre miliardi di dosi di vaccino anti COVID-19, principalmente nei paesi ad alto reddito.

In linea generale, il processo per lo sviluppo di un vaccino efficace è solitamente lungo e tedioso.

Tuttavia, gli sviluppi recenti nella creazione di vaccini contro il COVID-19 hanno indicato che le innovazioni nella ricerca sono cumulative, ossia basate su conoscenze già esistenti su virus simili; questo ha contribuito alla rapidità con cui i vaccini anti-COVID-19 sono stati sviluppati.

I vaccini sono preparati biologici che forniscono un'immunità attiva acquisita per una particolare malattia infettiva; lo fanno stimolando una risposta immunitaria ad un determinato antigene, una molecola trovata sul patogeno.⁴

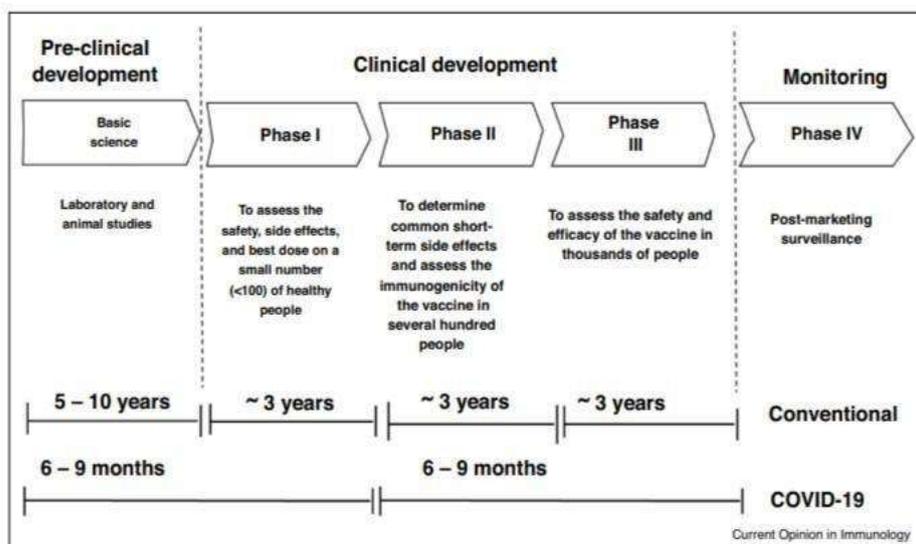


Figura 7: Sviluppo di vaccini contro il COVID-19 rispetto allo sviluppo di vaccini convenzionali

I vaccini anti-COVID-19 rientrano in quattro categorie principali:

- Vaccini ad intero virus
- Vaccini a base di proteine
- Vaccini a vettore virale
- Vaccini ad acidi nucleici

2.1 Vaccini ad intero virus

I vaccini ad intero virus utilizzano una forma attenuata o inattivata del virus del SARS-CoV-2 per innescare l'immunità protettiva.⁴

In particolare, i vaccini vivi attenuati costituiscono una forma indebolita del virus, che può ancora crescere e replicarsi ma non provoca malattie.

Al contrario, i vaccini inattivati contengono virus il cui materiale genetico è stato distrutto dal calore, da sostanze chimiche o da radiazioni, e per questo non possono infettare le cellule o replicarsi, ma possono ancora innescare una risposta immunitaria.

Tra i vaccini esistenti a virus vivi attenuati ci sono quelli contro il morbillo, il poliovirus orale e la febbre gialla, mentre i vaccini inattivati includono quelli contro la polio inattivata e l'influenza stagionale.

Attualmente esistono 16 vaccini a SARS-CoV-2 inattivati e vivi attenuati in fase di sviluppo clinico.

Tuttavia, l'uso di un vaccino a SARS-CoV-2 vivo attenuato potrebbe aumentare il rischio di ricombinazione tra il ceppo del vaccino e il virus *wild-type* circolante, generando nuove

varianti virali; inoltre, la produzione e la formulazione di un vaccino vivo attenuato richiede un lavoro intensivo e rigorosi controlli di qualità, il che rallenterebbe la produzione su larga scala del vaccino.⁴

2.2 Vaccini a base di proteine

I vaccini a base di proteine si dividono in vaccini a subunità e quelli a particelle simili a virus.⁴

I vaccini a subunità proteica sono composti da frammenti antigenici virali prodotti mediante tecniche di proteina ricombinante; sono facili da produrre, relativamente sicuri e ben tollerati rispetto ai vaccini ad intero virus. Il limite di tali vaccini è la loro bassa immunogenicità.

Tra i vaccini a subunità esistenti ci sono quelli contro la pertosse, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* di tipo b.

Sono stati candidati 33 vaccini a subunità proteica contro il SARS-CoV-2, di cui uno ha dimostrato di indurre alte produzioni di anticorpi neutralizzanti in fase III di sperimentazione clinica.

Oltre ai vaccini a subunità, altri vaccini candidati SARS-CoV-2 a base di proteine utilizzano involucri vuoti di virus che imitano la struttura del coronavirus ma non sono infettivi perché mancano di materiale genetico. Vaccini esistenti che utilizzano questa tecnologia includono quelli contro il papillomavirus umano.⁴

2.3 Vaccini a vettore virale

I virus sopravvivono e si replicano invadendo le cellule del loro ospite e dirottandole alla lettura del codice genetico virale e alla generazione di nuovi virus.⁴

Queste particelle virali contengono l'antigene, molecole capaci di innescare una risposta immunitaria; un principio simile sostiene vaccini a vettore virale, in cui le cellule ospiti ricevono solo un codice per produrre specifici antigeni.

Il vettore virale funge da sistema di consegna, fornendo un mezzo per invadere la cellula ed inserire il codice per gli antigeni del SARS-CoV-2.

Il virus utilizzato come vettore è chimicamente indebolito in modo che non possa causare malattie. In questo modo, il corpo può generare in modo sicuro una risposta immunitaria, senza sviluppare la malattia.

Ci sono due categorie di vettori virali: quelli che possono ancora replicarsi all'interno delle cellule e quelli che non possono farlo a causa della disabilitazione dei geni chiave.

Prima dell'insorgenza del SARS-CoV-2, solo un vaccino a vettore virale era stato approvato per l'uso nella popolazione umana contro la malattia da virus Ebola.

Uno svantaggio dei vaccini a vettore virale è che, se le persone sono state precedentemente esposte al vettore virale e hanno sviluppato una risposta immunitaria contro di esso, ciò potrebbe potenzialmente attenuare l'efficacia del vaccino.⁴

2.4 Vaccini ad acido nucleico

Le vaccinazioni ad acido nucleico anti-SARS-CoV-2 utilizzano istruzioni genetiche, sottoforma di acido deossiribonucleico (DNA) o acido ribonucleico (RNA), di una proteina del SARS-CoV-2 che stimola la risposta immunitaria.⁴

Prima del COVID-19 questa tipologia di vaccino non era stata ancora testata, poiché nessun vaccino autorizzato utilizzava questa tecnologia.

I vaccini a DNA utilizzano un frammento di DNA che codifica per l'antigene, il quale viene prima inserito in un plasmide batterico. I plasmidi batterici sono pezzi circolari di DNA utilizzati per conservare e condividere geni che possono favorire la sopravvivenza del batterio.

I plasmidi possono replicare il DNA cromosomico principale in modo indipendente e forniscono uno strumento semplice per trasferire geni fra le cellule.

Grazie a questo sono già ampiamente utilizzati nell'ingegneria genetica. Ciò consente alla macchina ospite di tradurre il messaggio dell'antigene in proteine all'interno delle cellule.

I vaccini a RNA, d'altra parte, codificano l'antigene di interesse in un acido ribonucleico messaggero (mRNA) o in un RNA auto-amplificante, che è un modello molecolare utilizzato dalla cellula per produrre proteine.

L'RNA può essere iniettato da solo, incapsulato in nanoparticelle o introdotto nelle cellule utilizzando alcune delle stesse tecniche sviluppate per i vaccini a DNA. Una volta che il DNA o l'RNA è all'interno della cellula e inizia a produrre antigeni, questi vengono quindi esposti sulla sua superficie, dove possono essere rilevati dal sistema immunitario, innescando una risposta. Questa risposta include le cellule T killer (che cercano e uccidono le cellule infette) e le cellule B che producono anticorpi e le cellule T helper che supportano la produzione di anticorpi.

Diversi vaccini a RNA contro il SARS-CoV-2 sono stati approvati per l'uso d'emergenza in diverse parti del mondo. Questo rappresenta la prima volta nella storia della vaccinologia che un vaccino ad acido nucleico, sia esso a RNA o DNA, è stato approvato per l'uso nei programmi di sanità pubblica.

Entro la metà del 2021, erano state somministrate oltre tre miliardi di dosi di vaccini anti-COVID-19 in tutto il mondo, e il 24% della popolazione mondiale aveva ricevuto almeno una dose di un vaccino anti-COVID-19.

Nello stesso periodo, venivano somministrate più di 40 milioni di dosi di vaccino anti-COVID-19 ogni giorno in tutto il mondo. Paesi che avevano vaccinato almeno il 50% dei loro cittadini contro il COVID-19 entro la metà del 2021 includevano il Regno Unito, il Cile, l'Uruguay, Israele, il Bahrain, l'Ungheria, l'Italia, la Spagna, la Germania, gli Stati Uniti d'America e la Francia. Tuttavia, solo l'1% delle persone nei paesi a basso reddito aveva ricevuto una dose di vaccino anti-COVID-19 entro la fine di giugno 2021. Per esempio, in Africa erano state somministrate solo 53 milioni di dosi di vaccino.

I progressi nei vaccini anti-COVID-19 sono davvero incoraggianti, segnando la prima volta di uno sviluppo così rapido di un vaccino. Gli avanzamenti nella ricerca in vaccinologia hanno svolto un ruolo cruciale nel velocizzare la creazione di un intervento vitale per la salute pubblica. Guardando al futuro, diverse considerazioni per i futuri vaccini anti-COVID-19 includono lo sviluppo di vaccini termo-stabili, rendendoli facilmente somministrabili in contesti tropicali con risorse limitate.

Inoltre, la comunità globale, indipendentemente dalle ideologie politiche, ha il potenziale per unirsi e collaborare per raggiungere una distribuzione rapida e di successo dei vaccini anti-COVID-19 in tutto il mondo. Questa collaborazione sottolinea l'importanza degli sforzi collettivi nell'affrontare le sfide globali della salute ed evidenzia il significato della cooperazione internazionale di fronte a una pandemia.⁴

3. TERAPIE PER IL TRATTAMENTO DEI SINTOMI DA SARS-CoV-2

È doveroso ricordare che i vaccini sono in linea generale una misura preventiva ma non una terapia da adottare in presenza di sintomi dovuti al SARS-CoV-2.

Pertanto, con l'obiettivo di curare i pazienti (anche vaccinati) che presentano sintomi rilevanti sono necessarie delle vere e proprie terapie.

Il trattamento per il COVID-19 è evoluto rapidamente dall'inizio della pandemia e ora consiste principalmente in agenti antivirali organici e immunomodulatori.

I trattamenti sono stati valutati in pazienti con diverse gravità di malattia: COVID-19 lieve o moderato in pazienti non ospedalizzati, COVID-19 grave, in cui i pazienti sono stati ricoverati e hanno richiesto ossigeno supplementare, e malattia critica, in cui i pazienti hanno avuto bisogno di ventilazione non invasiva o meccanica.³

ANTIVIRALI ORGANICI

3.1 Remdesivir

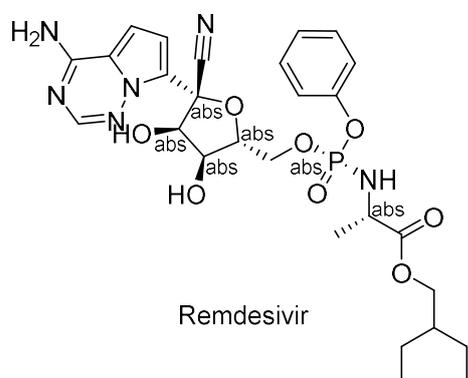


Figura 8: struttura chimica del Remdesivir

Il Remdesivir, un inibitore della RNA polimerasi dipendente da RNA virale, è stato uno dei primi agenti identificati a mostrare efficacia in uno studio controllato randomizzato (RCT) durante i primi mesi della pandemia.

La sua efficacia è stata trattata su un gruppo di 1062 pazienti non vaccinati ricoverati che necessitavano di ossigeno supplementare.

Lo studio ha evidenziato un tempo di recupero di dieci giorni nel gruppo trattato con Remdesivir con il beneficio più evidente per coloro che necessitavano di ossigeno convenzionale rispetto a pazienti con solo l'insorgenza dei primi sintomi.

Uno studio RCT condotto in Canada, non ha mostrato una diminuzione della mortalità rispetto alle cure standard, ma ha mostrato una diminuzione del tasso di progressione verso la ventilazione meccanica; allo stesso modo, lo studio Solidarity, un consorzio di studi multinazionali, non ha mostrato una diminuzione della mortalità per i pazienti ventilati meccanicamente. Tuttavia, è stato osservato un modesto beneficio sulla mortalità (14,6% vs 16,3%, $p = 0,03$) per i pazienti che necessitavano di ossigeno supplementare ma non di ventilazione meccanica.

Oltre al suo ruolo nei pazienti ricoverati, l'uso precoce del remdesivir previene anche la progressione nei pazienti ad alto rischio non ricoverati con COVID-19 lieve o moderato.

Nella pratica clinica, le Linee Guida per il Trattamento COVID-19 del *National Institutes of Health* (NIH) raccomandano il remdesivir come terapia di prima linea nei pazienti ricoverati per il COVID-19 (in associazione con immunomodulatori se il paziente necessita di ossigeno) e come terapia di seconda linea (dopo il nirmatrelvir-ritonavir) per pazienti ambulatoriali ad alto rischio.

3.2 Nirmatrelvir-Ritonavir

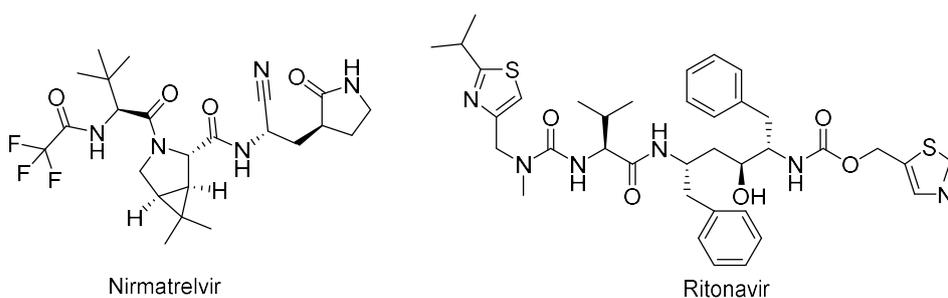


Figura 9: struttura chimica del Nirmatrelvir-Ritonavir

Il Nirmatrelvir è un farmaco somministrato per via orale che mira alla proteasi del SARS-CoV-2 e viene associato al ritonavir, un potenziatore farmacologico.

Lo studio principale che ha valutato questo agente è stato l'EPIC-HR (Valutazione dell'Inibizione della Proteasi per il COVID-19 nei Pazienti ad Alto Rischio), che ha coinvolto pazienti ambulatoriali ad alto rischio non vaccinati e ha mostrato una riduzione del rischio del 89% di ospedalizzazione o morte.

Diversi studi osservazionali hanno suggerito un beneficio di nirmatrelvir-ritonavir in individui vaccinati.

Ad esempio, uno studio su pazienti ambulatoriali ad alto rischio e vaccinati ha mostrato una riduzione del rischio relativo del 45% nell'esito combinato di visita al pronto soccorso, ospedalizzazione o morte nel gruppo nirmatrelvir-ritonavir, confermando la sua rilevanza continua per la pratica clinica.

Poiché milioni di pazienti in tutto il mondo sono stati trattati con il farmaco, è sorta la preoccupazione per il "rimbalzo" virale o la ricomparsa dei sintomi da COVID-19 dopo il completamento del corso di trattamento.

Tuttavia, i dati principali degli studi EPIC-HR ed EPIC-SR non hanno mostrato una differenza significativa nel tasso di rimbalzo tra i gruppi di trattamento e di controllo al giorno 10 o 14.

Una limitazione significativa del farmaco è la presenza di interazioni farmaco-farmaco dovute al potenziatore ritonavir, che in alcuni pazienti può renderne proibitivo l'uso.

Le Linee Guida per il Trattamento COVID-19 del *National Institutes of Health* (NIH) raccomandano l'uso di nirmatrelvir-ritonavir per via orale come terapia di prima linea per pazienti ad alto rischio non ricoverati.

Poiché la maggior parte dei dati su nirmatrelvir-ritonavir riguarda individui immunocompetenti, un'importante area di ricerca in corso è il ruolo di terapie prolungate nei pazienti immunocompromessi, che talvolta possono avere una replicazione persistente del SARS-CoV-2.

3.3 Molnupiravir

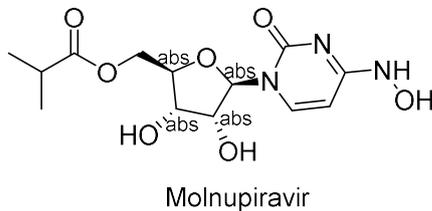


Figura 10: struttura chimica del Molnupiravir

Il Molnupiravir è un profarmaco della piccola molecola *N*-idrossicitidina, che causa l'accumulo di mutazioni nel SARS-CoV-2 e la perdita di vitalità virale.

Lo studio controllato randomizzato (RCT) che ha portato alla sua autorizzazione è stato il MOVE-OUT, che ha valutato 1.433 pazienti ad alto rischio non vaccinati.

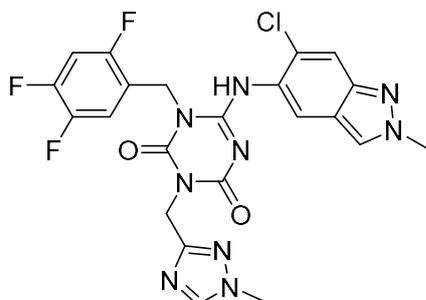
Il tasso di ospedalizzazione o mortalità per tutte le cause entro 30 giorni è stato significativamente più basso nel gruppo molnupiravir, con una riduzione del rischio relativo del 31%.

Tuttavia, uno studio successivo in aperto (PANORAMIC) su pazienti ad alto rischio, la maggior parte dei quali era stata vaccinata, non ha mostrato una diminuzione del tasso di ospedalizzazione o mortalità con il molnupiravir. Il gruppo che ha ricevuto il farmaco ha avuto un tempo di recupero auto-riferito sostanzialmente più breve; tuttavia, questo risultato è meno definitivo perché lo studio era in aperto, il che potrebbe aver influito sulla segnalazione dei sintomi da parte dei partecipanti allo studio.

Attualmente, le Linee Guida per il Trattamento COVID-19 del National Institutes of Health (NIH) raccomandano il molnupiravir solo quando non possono essere somministrati il Nirmatrelvir-Ritonavir e il Remdesivir.

3.4 Antivirali organici in fase di sperimentazione clinica

Ci sono diversi altri agenti in varie fasi di sperimentazione clinica, tra cui l'Ensirelvir e analoghi orali del Remdesivir.



Ensirelvir

Figura 11: struttura chimica del Ensirelvir

L'ensirelvir è un inibitore della proteasi del SARS-CoV-2 che non richiede potenziamento farmacologico, a differenza del nirmatrelovir-ritonavir. Tuttavia, ci sono molte interazioni farmaco-farmaco con questo agente.

In particolare, nella Conferenza sul Retrovirus e le Infezioni Opportunistiche del 2023, il team di studio ha presentato dati esplorativi che mostravano che il gruppo trattato con ensirelvir aveva una minore incidenza di persistente COVID-19 o sintomi neurologici, noti come long COVID o PASC.

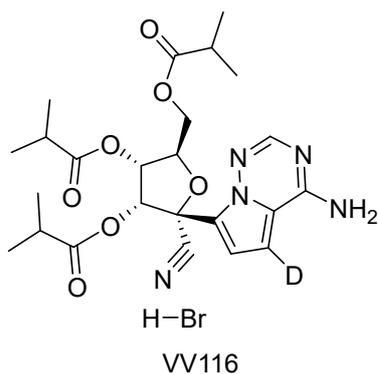
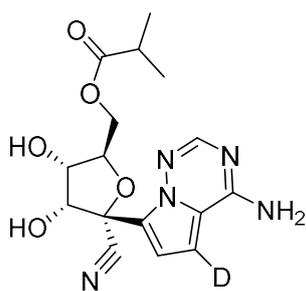


Figura 12: struttura chimica del VV116

Il VV116 è una versione modificata del Remdesivir che può essere assunta per via orale.

In uno studio controllo randomizzato che ha confrontato il VV116 con il Nirmatrelvir-Ritonavir in pazienti ambulatoriali ad alto rischio, il VV116 non è risultato inferiore al Nirmatrelvir-Ritonavir per quanto riguarda il tempo di recupero clinico e ha notevolmente avuto meno avventi avversi.

Un'altra forma orale di remdesivir, chiamata Obeldesivir, è attualmente in fase di valutazione in studi clinici.



Obeldesivir

Figura 13: struttura chimica del Obeldesivir

4. TERAPIA IMMUNOMODULANTE

La terapia immunomodulante è un tipo di immunoterapia che comprende una serie di trattamenti per le patologie che colpiscono il sistema immunitario umano. Tali trattamenti possono essere basati su farmaci immunostimolanti, che potenziano l'attività delle difese naturali, oppure su piante medicinali e integratori con proprietà immunostimolanti, che aiutano a prevenire le infezioni.

Di seguito verranno elencati alcuni importanti composti studiati ed applicati in tale campo.³

4.1 Corticosteroidi

Uno degli studi più importanti che ha cambiato la traiettoria iniziale della pandemia è stato lo studio RECOVERY sul dexametasone.

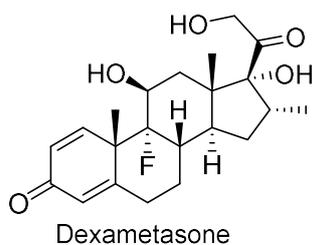


Figura 14: struttura chimica del dexamethasone

Si trattava di uno studio in aperto su 6.425 pazienti ospedalizzati non vaccinati, confrontando un ciclo di 10 giorni di dexametasone con le cure abituali da sole. I risultati hanno mostrato una drammatica riduzione della mortalità a 28 giorni per i pazienti che necessitavano di ventilazione meccanica e per pazienti che ricevevano ossigeno supplementare.

Lo studio RECOVERY ha utilizzato una dose standard di 6 mg di dexametasone al giorno, e si è posto il dubbio se dosi più elevate potessero offrire un beneficio ancora maggiore. Tuttavia, quando 20 mg di dexametasone sono stati confrontati con la dose standard nei pazienti che necessitavano di supporto di ossigeno convenzionale, il gruppo ad alta dose ha avuto un tasso di mortalità più elevato.

Nel contesto di steroidi ad alta dose, è stata riportata la possibilità di infezioni secondarie o riattivazione dell'infezione (ad esempio, infezioni fungine invasive, strongiloidiasi, epatite B, tubercolosi) e ciò richiede attenzione quando si inizia la terapia.

La dexametasone rimane una pietra angolare della terapia COVID-19 per i pazienti ricoverati che necessitano di ossigeno convenzionale, ossigeno ad alto flusso, o ventilazione non invasiva o meccanica. Viene raccomandata come terapia di prima linea dalle Linee Guida per il Trattamento COVID-19 del *National Institutes of Health* (NIH) per questi gruppi di pazienti.

4.2 Inibitori di interleuchina-6

L'Interleuchina-6 (IL-6) è una citochina proinfiammatoria e anticorpi monoclonali (mAb) che la inibiscono sono stati precedentemente approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento di condizioni autoimmuni.

Il tocilizumab è un mAb anti-recettore IL-6 ricombinante umanizzato che blocca la via di segnalazione della citochina IL-6 a valle.

Le Linee Guida per il Trattamento COVID-19 del National Institutes of Health (NIH) raccomandano l'aggiunta di tocilizumab alla dexametasone per i pazienti che necessitano di cannula nasale ad alto flusso, ventilazione non invasiva, ventilazione meccanica o ossigenazione a membrana extracorporea (ECMO), o pazienti in ossigenoterapia convenzionale con rapido aumento del fabbisogno di ossigeno e evidenza di infiammazione sistemica (ad esempio, CRP elevata).

Il Sarilumab è consigliato come alternativa se il Tocilizumab non è disponibile.

Il Tocilizumab è approvato dalla FDA per il trattamento del COVID-19 in adulti ospedalizzati che stanno ricevendo un corticosteroide sistemico e necessitano di ossigeno supplementare, ventilazione meccanica non invasiva o invasiva, o ECMO.

4.3 Inibitori di Janus chinasi

Il baricitinib è un inibitore della *Janus kinase* (JAK) che blocca l'attivazione della via di segnalazione dei trasduttori del segnale e degli attivatori della trascrizione (STAT), che porta alla produzione di citochine, compresa l'IL-6.

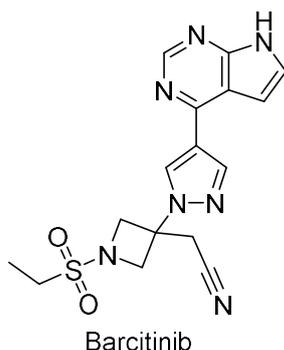


Figura 15: struttura chimica del Baricitinib

I pazienti ospedalizzati per COVID-19 che ricevevano baricitinib rispetto alle cure standard da sole avevano una diminuzione della mortalità a 28 giorni per tutte le cause; le Linee Guida per il Trattamento COVID-19 del *National Institutes of Health* (NIH) raccomandano l'aggiunta di baricitinib alla dexametasone per i pazienti che necessitano di cannula nasale ad alto flusso, ventilazione non invasiva, ventilazione meccanica o ECMO, o pazienti in ossigenoterapia convenzionale con rapido aumento del fabbisogno di ossigeno e evidenza di infiammazione sistemica (ad esempio, CRP elevata).

Il baricitinib è approvato dalla FDA per il trattamento del COVID-19 in adulti ospedalizzati che richiedono ossigeno supplementare, ventilazione meccanica non invasiva o invasiva, o ECMO.

4.4 Direzioni future per le terapie a base di anticorpi nel COVID-19

Poiché tutti i trattamenti con anticorpi monoclonali (mAb) che avevano ricevuto l'autorizzazione d'uso d'emergenza dalla FDA hanno perso efficacia contro le varianti più

recenti del virus (VOCs), sono stati proposti nuovi approcci per evitare la forte elezione evolutiva nel dominio RBD della proteina spike.

Il primo approccio è stato quello di mirare al dominio S2 della spike, una regione più conservata tra i beta-coronavirus responsabile della fusione tra il virus e la membrana cellulare dell'ospite.

Diversi gruppi hanno sviluppato combinazioni di mAb mirati a S1 e S2 che hanno mostrato promesse per la profilassi e il trattamento in modelli animali con diverse VOCs.

Un secondo approccio è quello di sviluppare mAb mirati alla proteina nucleocapsidica del SARS-CoV-2. Studi recenti hanno dimostrato che la nucleocapside, precedentemente considerata solo una proteina virale interna, è esposta sulla superficie delle cellule infettate dal SARS-CoV-2 e attiva la via del complemento con la *lectina mannose-binding*.

La ricerca sui meccanismi della terapia con plasma convalescente ha dimostrato l'importanza degli anticorpi antinucleocapsidici e ha riscontrato una correlazione tra la citotossicità mediata dalle cellule dipendente dagli anticorpi antinucleocapsidici e migliori esiti nel COVID-19.

In seguito a questi nuovi sviluppi, esperimenti su modelli animali hanno mostrato che gli anticorpi antinucleocapsidici possono migliorare gli esiti del SARS-CoV-2. Sebbene molto lavoro debba essere fatto per caratterizzare il potenziale meccanismo di protezione nei modelli animali e poi tradurre questi studi in sperimentazioni umane, un anticorpo monoclonale antinucleocapsidico ha il potenziale di rimanere attivo nonostante l'evoluzione continua delle VOCs.³

5. ANTIVIRALI CONTENENTI METALLI

I complessi metallici sono composti costituiti da uno o più centri metallici che sono legati a molecole o ioni circostanti, noti come leganti. Questi legami tra il metallo e i leganti sono generalmente di natura coordinativa/dativa, dove il centro metallico funge da acido di Lewis mentre i leganti da basi di Lewis. La formazione di legami coordinativi porta alla creazione di strutture molecolari note come complessi metallici.

Nonostante la loro crescente importanza in chimica farmaceutica, i complessi metallici sono ancora minoritari nei processi di *screening* per lo sviluppo di nuovi farmaci contro una determinata patologia.

L'introduzione di metallo-farmaci nel corpo li espone a reazioni con molte sostanze nel sistema biologico. Sebbene i principali bersagli di questi agenti siano proteine e DNA, il passaggio attraverso il sangue e, infine, nelle cellule consente al complesso metallico di entrare in contatto con sostanze che possono modificarne la composizione.

Quindi risulta necessario studiare la reattività dei metallo-farmaci nei sistemi biologici, delineando sia i loro effetti farmacologici che collaterali, in virtù di una possibile approvazione come farmaci.²

5.1 Le proteine bersaglio per i metallo-farmaci

Formula	Nome	Formula	Nome
	glicina (Gly)		serina (Ser)
	alanina (Ala)		treonina (Thr)
	valina (Val)		cisteina (Cys)
	leucina (Leu)		metionina (Met)
	isoleucina (Ile)		prolina (Pro)
	acido aspartico (Asp)		asparagina (Asn)
	acido glutammico (Glu)		glutammina (Gln)
	fenilalanina (Phe)		lisina (Lys)
	tirosina (Tyr)		arginina (Arg)
	triptofano (Trp)		istidina (His)

Tabella 1: amminoacidi principali

Il corpo umano contiene decine di migliaia di proteine diverse coinvolte in una varietà di ruoli catalitici, di trasporto e strutturali. Se uno ione metallico introdotto nel corpo sotto forma di metallo-farmaco si lega a una parte della proteina critica per la sua funzione, l'abilità della proteina di svolgere il suo compito biologico potrebbe essere compromessa, e quindi sufficiente a portare alla morte della cellula.

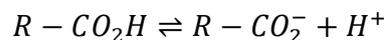
Ad esempio, molte proteine cataliticamente attive chiamate metallo-enzimi hanno ioni metallici di origine naturale come Zn^{2+} o Cu^{2+} nei loro siti attivi. Poiché gli stessi leganti sulla proteina che si legano allo ione metallico di origine naturale potrebbero anche fungere da atomi

donatori per lo ione metallico in un metallo-farmaco, l'aggiunta del farmaco alla proteina potrebbe causare la sostituzione dello ione metallico naturale, rendendo l'enzima cataliticamente inattivo.

Molte proteine nel corpo utilizzano ioni metallici come mezzo per organizzare la propria struttura. Poiché alcune di queste metallo-proteine sono coinvolte nell'espressione genica e interagiscono direttamente con il DNA, la perturbazione della loro struttura sostituendo lo ione metallico naturale con uno fornito da un metallo-farmaco potrebbe influenzare la specificità e l'affinità dell'interazione, alterando così la capacità della cellula di produrre le proteine necessarie per la sopravvivenza.

Tra i 20 aminoacidi comuni presenti nelle proteine, solo sette - acido aspartico, acido glutammico, istidina, lisina, metionina, cisteina e tirosina - hanno atomi donatori nelle loro catene laterali che, dal punto di vista della chimica di coordinazione, sono potenziali bersagli per i metallo-farmaci.

Ad esempio, i primi due, acido aspartico e acido glutammico, hanno catene laterali di acidi carbossilici, che a pH fisiologico sono presenti come ioni carbossilato.



Uno ione metallico che interagisce con il gruppo carbossilato potrebbe legarsi a uno degli atomi di ossigeno oppure ad entrambi gli atomi di ossigeno, producendo un anello chelato a quattro membri.

Poiché il carbossilato è una *base hard*, le catene laterali degli acidi aspartico e glutammico su una proteina preferiscono legarsi a ioni metallici che sono *acidi hard*.

L'istidina ha come gruppo funzionale caratteristico un composto eterociclico a cinque membri, l'imidazolo. Questo gruppo è una base eterociclica che ha due atomi di azoto, uno dei quali può essere protonato per formare lo ione imidazolio. Una coppia solitaria di elettroni sull'azoto è esposta, ed è quindi un buon sito di coordinazione per gli ioni metallici.

Essendo la pKa dell'imidazolo istidinico approssimativamente 6, suggerisce che a pH neutro la maggior parte delle molecole in soluzione è nella forma non protonata e disponibile per

legarsi a uno ione metallico. L'imidazolo è considerato una base *borderline* e preferisce legarsi a ioni metallici di tipo *borderline*.

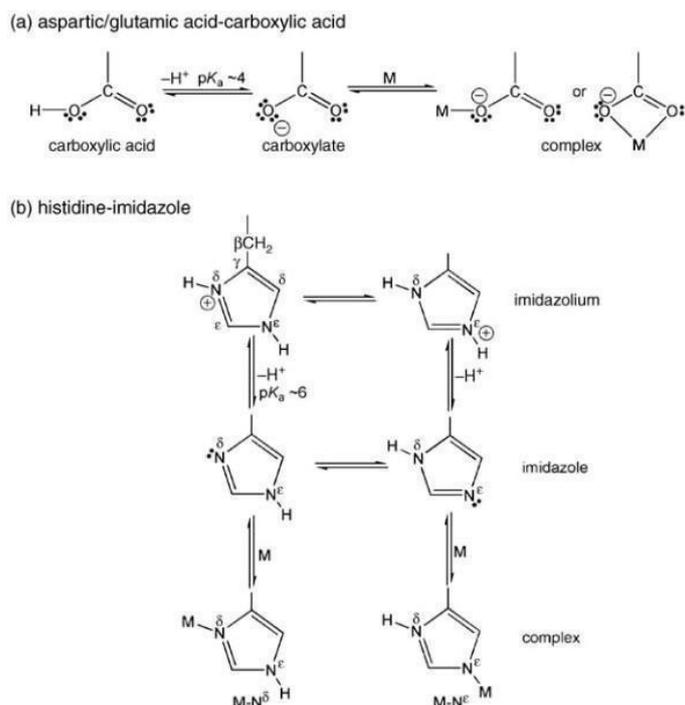


Figura 16: Complessazione degli atomi donatori situati nelle catene laterali di vari aminoacidi con uno ione metallico (M) per formare un complesso 1:1. I valori di pK_a forniti sono approssimativi per l'aminoacido libero. (a) Il gruppo acido carbossilico di acido aspartico o glutammico, mostrando la coordinazione mono- e bidentata con lo ione metallico. A causa della risonanza, la carica negativa nel complesso bidentato può essere scambiata tra i due atomi di ossigeno. (b) Il gruppo imidazolo dell'istidina. Lo ione imidazolio dell'istidina ha due forme di risonanza e l'imidazolo due forme tautomeriche. Uno ione metallico può legarsi a una delle forme tautomeriche dell'imidazolo, per formare un complesso $M-N_\delta$ o $M-N_\epsilon$.

Il gruppo funzionale dell'aminoacido lisina è un gruppo amminico primario situato sul carbonio ϵ nella catena laterale. Poiché la pK_a per la deprotonazione di questo gruppo è approssimativamente 10, solo circa lo 0.1% delle molecole in soluzione a pH 7 esiste nella forma completamente deprotonata. Tuttavia, se la costante di legame dello ione metallico per

L'ammina primaria è elevata, come con l'imidazolo, la reazione con un eccesso di ione metallico spingerà l'equilibrio verso destra a favore del complesso metallico, rilasciando un protone in soluzione. Poiché un'ammina primaria è una *base hard*, preferisce legarsi a ioni metallici che sono *acidi hard*.

La cisteina contiene il gruppo funzionale tiolo, un sito di legame importante nelle metalloproteine.

Poiché la pKa per la deprotonazione di questo gruppo è leggermente superiore al pH neutro ($pK_a \approx 8$), lo ione tiolato può reagire con lo ione metallico di un metallo-farmaco per formare un complesso, che, se la stabilità è alta, spingerà il sistema a favore del complesso stesso con il rilascio di un protone in soluzione. Tuttavia, è anche possibile che il tiolo agisca anche come nucleofilo nella reazione e che l'intermedio con lo ione metallico e il protone legato all'atomo di zolfo si decomponga nel complesso tiolato con la perdita di un protone in un processo di deprotonazione assistita dal metallo. Il tiolato è una *base soft*, di conseguenza reagisce con ioni metallici che hanno comportamento di *acidi soft*.

Infine, il residuo fenolico è presente nella catena laterale dell'aminoacido tirosina. Anche se la pKa per la deprotonazione di questo gruppo è circa 10, e quindi molto poco fenolato è presente a pH neutro, l'interazione con uno ione metallico attraverso una coppia solitaria di elettroni del fenolo, seguita da una deprotonazione assistita dal metallo o tramite attacco diretto dello ione fenolato, ci si aspetta che spinga l'equilibrio a favore del complesso.

Il fenolato, che è una *base hard*, reagisce preferibilmente con metalli classificati come *acidi hard*.

Come il tiolato, il fenolato, avendo tre coppie solitarie di elettroni, può potenzialmente legare contemporaneamente tre ioni metallici.²

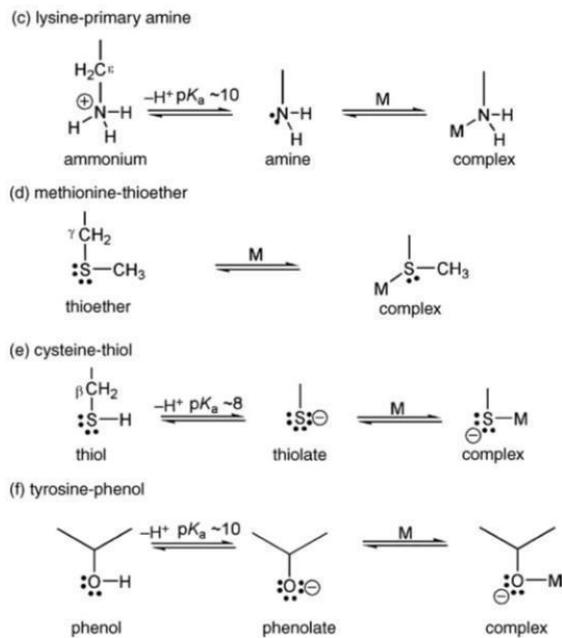


Figura 17: (c) Il gruppo amminico primario della lisina. (d) Il gruppo tioetere della metionina. (e) Il gruppo tiolo della cisteina. (f) Il gruppo fenolo della tirosina.

5.2 DNA come bersaglio per i metallo-farmaci

Una biomolecola importante che può essere il bersaglio di metallo-farmaci è l'acido desossiribonucleico o DNA. Questa molecola, che contiene tutte le informazioni genetiche per tutte le cellule che compongono il corpo, è un polimero a doppio filamento lungo 3 miliardi di unità monomeriche. Sorprendentemente, solo una frazione del polimero, circa il 5%, codifica per le proteine presenti nel corpo, mentre il resto è definito DNA "spazzatura".

Per adattare un polimero molto lungo, circa 1 metro, nel nucleo della cellula, la molecola di DNA è avvolta attorno a proteine chiamate istoni, e la particella risultante è chiamata nucleosoma.

Le particelle di nucleosoma, di cui ce ne sono circa 10 milioni nel genoma umano, fungono da unità organizzative che consentono a tutto il DNA di adattarsi allo spazio nucleare relativamente piccolo nella cellula. Ciò richiede diversi livelli superiori di organizzazione e alla fine porta a un complesso proteina-DNA chiamato cromatina. A causa degli effetti

bloccanti degli istoni, il DNA nella cromatina è molto meno vulnerabile all'attacco dei metallo-farmaci rispetto al DNA purificato, ma quando un gene nella cromatina viene trascritto, ovvero quando la sequenza del DNA viene letta per produrre una proteina, un segmento di DNA viene esposto e diventa suscettibile all'attacco di farmaci e altre molecole. Se questi agenti si legano al DNA e ne alterano la struttura, l'abilità del sistema cellulare di leggere con precisione il codice del DNA potrebbe essere compromessa, il che spesso comporta la prevenzione della sintesi di una proteina o la produzione di una proteina non completamente funzionale. Poiché entrambi i risultati possono avere un effetto disastroso sulla cellula, il DNA è un bersaglio molto comune per i metallo-farmaci.²

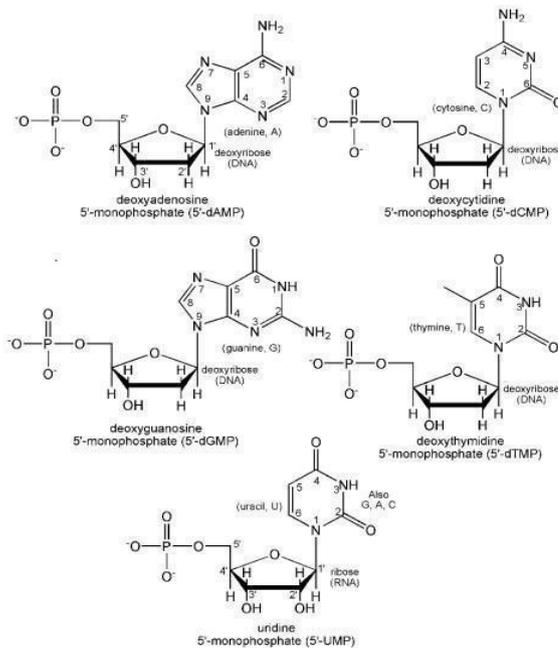


Figura 18: nucleotidi del DNA e del RNA

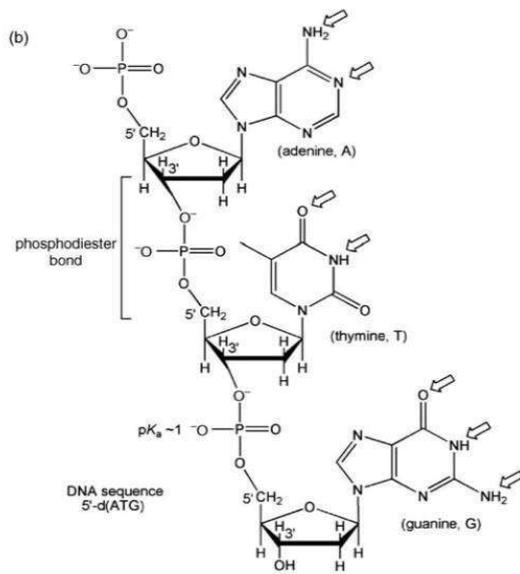


Figura 19: connettività di un filamento di DNA. Sono mostrati i siti di legame a idrogeno (freccette) tra una base eterociclica e il suo complemento in una doppia elica di Watson-Crick

Gli atomi sulle basi che possono agire come nucleofili nei confronti dei metallo-farmaci si trovano sui bordi esposti delle coppie di basi (Figura 5), che formano il fondo delle scanalature del DNA.

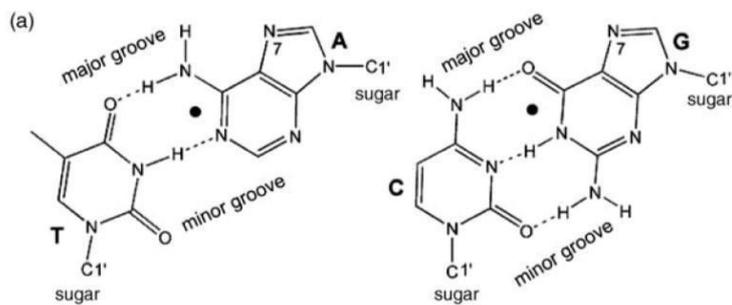


Figura 20: Coppie di basi di Watson-Crick (bp) di DNA che mostrano l'adenina (A) accoppiata con la timina (T) attraverso due legami a idrogeno (linee tratteggiate) e guanina (G) accoppiata con citosina (C) attraverso tre legami a idrogeno; il punto nero indica la posizione dell'asse dell'elica per il B-DNA.

I siti di legame più importanti sono N-7 di adenina e guanina, entrambi situati nella scanalatura maggiore del DNA a doppia elica. Poiché la pKa per la rimozione di protoni da questi siti è molto al di sotto del pH fisiologico, ossia i doppietti solitari sugli atomi di azoto sono debolmente basici nei confronti di un protone, i metallo-farmaci sono spesso legati a questi atomi donatori. Entrambi questi atomi sono considerati basi *borderline* nella scala HSAB, e quindi formano i loro complessi più stabili con ioni metallici che sono acidi *borderline*. Disponibili anche per legare ioni metallici sono gli atomi di ossigeno carichi negativamente del legame fosfodiesterico, che fanno parte dello scheletro del DNA. Poiché questo ossigeno è una *base hard*, spesso si lega a ioni metallici che sono *acidi hard*.

Se lo ione metallico ha più di un sito di coordinazione in grado di interagire con il DNA, può legare due basi sullo stesso filamento per produrre un legame crociato intrafilamento. In alternativa, potrebbe reagire con siti su entrambi i filamenti, collegando efficacemente i filamenti tra loro, per formare un legame crociato interfilamento, o potrebbe collegare atomi donatori nei gruppi laterali su una proteina al DNA in un legame crociato proteina-DNA (figura 6.a)

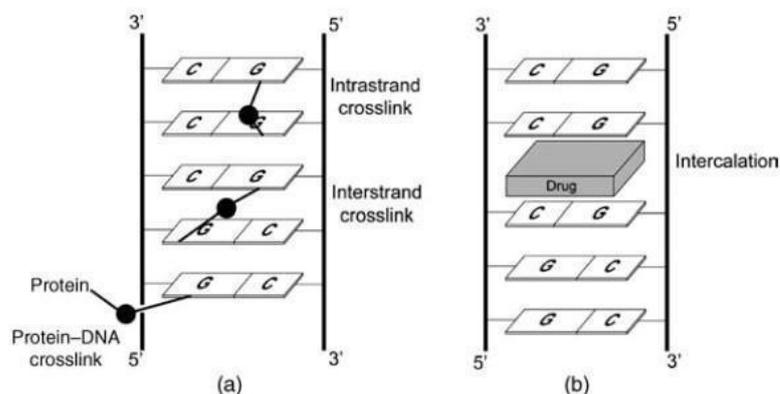


Figura 21: (a) Diagramma che mostra alcuni dei possibili addotti che possono formarsi tra uno ione metallico (cerchio nero) e le basi del DNA a doppio filamento. (b) intercalazione di una molecola farmaco fra le coppie di basi de DNA.

Una delle caratteristiche interessanti del DNA a doppia elica è che piccole molecole planari (generalmente contenenti residui aromatici) e idrofobiche possono inserirsi tra le coppie di basi del DNA attraverso un processo chiamato intercalazione (Figura 6.b).

Tuttavia, per farlo, lo spazio tra le coppie di basi del DNA deve aumentare per accettare lo "spessore" della molecola di intercalazione, il che aumenta la lunghezza dell'elica del DNA e porta di solito a un aumento della temperatura di fusione del DNA, cioè la temperatura a cui i due filamenti di Watson-Crick si separano attraverso la rottura dei legami ad idrogeno tra i filamenti.

La forza trainante dal punto di vista termodinamico per questa interazione è la tendenza delle porzioni idrofobiche delle molecole dei farmaci o di altre strutture piccole a associarsi con le coppie di basi idrofobiche del DNA, che è un modo per "nascondere" la regione idrofobica della molecola del farmaco dall'acqua, che è molto polare. Pertanto, oltre a legarsi semplicemente a un atomo donatore sul DNA attraverso una reazione di spostamento del legante che coinvolge il centro metallico, alcuni complessi metallici che contengono residui aromatici planari possono legarsi al DNA per intercalazione, influenzando anche la funzione del modello del DNA nell'espressione genica.²

6. ESEMPI DI COMPLESSI METALLICI COME ANTIVIRALI

In seguito, verranno riportati alcuni esempi di complessi metallici utilizzati in medicina per la cura e il trattamento di alcune malattie virali.

6.1 Complessi di oro per la cura di malattie virali

È stata riscontrata l'efficacia di complessi di oro per il trattamento del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) che causa l'AIDS.²

Lo ione oro(I) dicianuro ($[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$), si è rivelato efficiente per l'inibizione della proliferazione dell'HIV in una linea di cellule $\text{CD4}^+\text{T}$, una tipologia di globulo bianco (linfocita) che svolge un ruolo importante nel sistema immunitario.

Le concentrazioni di $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ a cui si verifica l'inibizione sono nel range del basso nanomolare.

Inoltre, un complesso di oro(I) contenente due leganti tiosaccarosio ha dimostrato di proteggere le cellule MT-4 del virus dell'HIV legandosi a un residuo specifico della cisteina su una proteina che fa parte dell'involucro esterno del virus, gp120.

Tale complesso potrebbe funzionare legandosi a un residuo di cisteina sulla proteina, causando il rilascio della proteina gp120 dalla superficie del virus e prevenendo così che l'HIV riconosca la sua cellula bersaglio.

Il composto di oro(II) $[\text{bpza}][\text{AuCl}_4]$, dove bpza è un legante di tipo bis-pirazolico, inibisce sia la trascrittasi inversa, RT, che la proteasi HIV-1, PR.

Poiché questi enzimi svolgono funzioni diverse nel ciclo di vita del virus HIV, è insolito inibirli entrambi con un singolo composto. La trascrittasi inversa è responsabile della conversione dell'RNA virale in DNA a doppio filamento prima dell'integrazione di quest'ultimo nel DNA genomico della cellula T, mentre la proteasi HIV-1 controlla la maturazione e la produzione di virioni infettivi (particelle virali).

Poiché $[\text{bpza}][\text{AuCl}_4]$ è atossico nei confronti delle cellule mononucleate del sangue periferico nel sistema immunitario, il composto potrebbe avere potenziale come agente anti-HIV.

La *Malaria* rappresenta una sfida di rilievo a livello internazionale e, a causa della frequente comparsa di ceppi resistenti, c'è un continuo bisogno di nuovi farmaci e agenti per il trattamento della malattia.² Un recente studio condotto da *Sannella et al.* ha dimostrato che l'auranofin e altri composti dell'oro(I) inibiscono la crescita di *Plasmodium falciparum*, un parassita protozoo trasmesso dalle zanzare *Anopheles* che provoca la malaria.

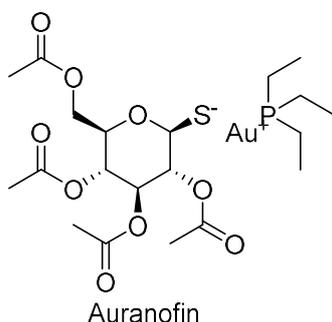


Figura 22: formula chimica dell'Aurano-fin

I ricercatori hanno suggerito che il meccanismo con cui i composti dell'oro(I) inibiscono la crescita di *P. falciparum* è correlato alla capacità dei complessi di bloccare la funzione dell'enzima tioredossina riduttasi, TrxR.

Poiché *P. falciparum* è sensibile agli ossidanti rilasciati nella cellula durante lo stress ossidativo e TrxR aiuta a ridurre il livello di questi ossidanti, l'inibizione dell'enzima con i composti dell'oro(I) altererebbe l'equilibrio redox della cellula, il che potrebbe essere il motivo per cui i composti dell'oro sono efficaci nel rimuovere il parassita.

6.2 Complessi di ferro per la cura di malattie virali

Il ferro è un elemento essenziale per la maggior parte degli organismi viventi. Questo elemento è cruciale per regolare le attività degli enzimi cellulari, compresi quelli coinvolti nel metabolismo cellulare e nella replicazione del DNA.⁷ I meccanismi che sottendono al controllo rigoroso dei livelli di ferro sono importanti nella mediazione dell'interazione tra microrganismi e il loro ospite e, di conseguenza, nella diffusione dell'infezione.

I microrganismi, inclusi virus, batteri e funghi, hanno meccanismi diversi di acquisizione/utilizzo del ferro per supportare la loro capacità di ottenere/utilizzare il ferro (ad esempio, ioni ferro liberi o gruppi *eme*).

Questi percorsi di assorbimento del ferro sono associati alla promozione della loro crescita e virulenza e, di conseguenza, alla loro patogenicità. Pertanto, controllare la sopravvivenza dei microrganismi limitando la disponibilità di ferro può dimostrarsi fattibile attraverso l'uso di

agenti mirati ai loro percorsi di assorbimento del ferro e/o l'uso di chelanti del ferro come mezzo per ostacolare lo sviluppo delle infezioni.

Il ferro sembra essere un elemento critico per sostenere molti elementi che supportano la propagazione di un virus, compreso il suo ingresso, la replicazione e la maturazione. Vengono presentate prove a sostegno dell'uso di chelanti del ferro per contrastare la propagazione virale. Ad esempio, è stata segnalata una correlazione positiva tra il contenuto di ferro epatico e l'HCV (epatite C).

Il ferro, sotto forma di complesso con isonicotinilidene-salicilaldeide (chelante del ferro trifunzionale lipofilo, Fe-SIH), potrebbe mediare effetti antivirali riducendo l'espressione di proteine virali.

Sebbene sia stato suggerito che le terapie che riducono i livelli di ferro potrebbero essere utilizzate come adiuvanti alle terapie esistenti per l'HCV, sono necessari ulteriori studi per fornire supporto all'uso dei chelanti del ferro come regime terapeutico adiuvante nei pazienti infetti da HCV.

Si è osservata una notevole efficacia di chelanti a base di ferro per la cura dell'HIV.

I meccanismi alla base di questi effetti cellulari associati al ferro sulla trascrizione dell'HIV-1 sono stati chiariti essere mediati attraverso NF- κ B (un fattore di trascrizione che svolge un ruolo nella regolazione di molteplici attività cellulari), che si lega alla sequenza di ripetizione terminale lunga dell'HIV (il centro di controllo per la regolazione dell'espressione genica dell'HIV con sequenze di legame per proteine ospiti e virali) su elementi di risposta di NF- κ B. Questo percorso potrebbe essere contrastato dal chelante del ferro con DFO (*Desferroxamine*).

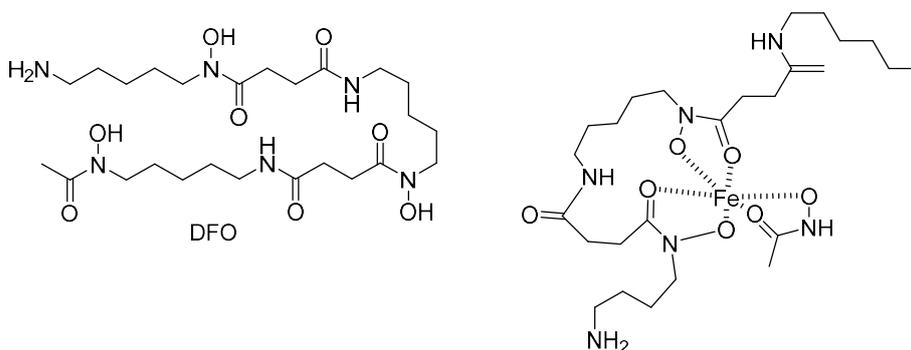


Figura 23: struttura chimica del DFO legante (*Desferroxamine*) e del Fe-DFO

Un altro metodo per l'inibizione della replicazione virale dell'HIV è l'utilizzo di chelanti del ferro come DFRA (*Deferasirox*) e DFP (*Deferiprone*), che fungono da inibitori dell'enzima di replicazione del DNA, RNR, nei linfociti.

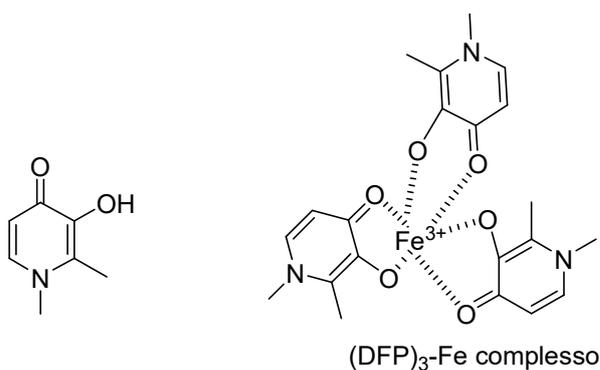


Figura 24: struttura chimica del DFP complesso

La bleomicina (BLM, un antibiotico isolato da *Streptomyces verticillus* che forma complessi di ferro generando ROS che porta a modifiche delle basi nel DNA virale) potrebbe anche ridurre la capacità replicativa dell'HIV senza influire sulla vitalità cellulare nei linfociti del sangue periferico; se gli effetti di BLM sono dovuti all'attività di chelazione del ferro non è ancora del tutto chiaro.⁸

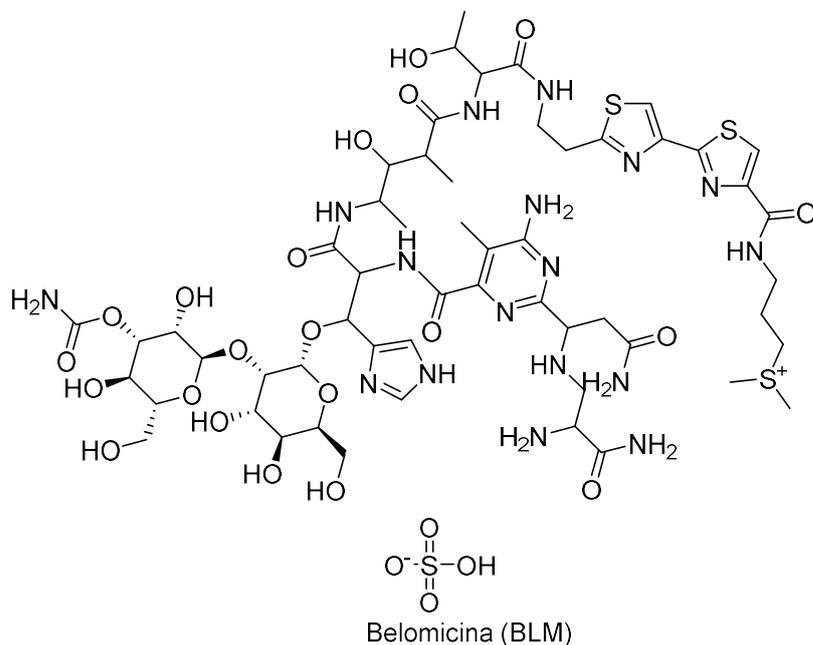


Figura 25: struttura chimica della Belomicina (BLM)

Sono stati eseguiti studi cellulari *in vitro* per identificare cambiamenti nell'espressione e nelle attività di mediatori del ciclo cellulare da parte dei chelanti del ferro nelle cellule infettate da HIV-1. In particolare, i chelanti del ferro DFO e 311 (2-idrossi-1-naftilaldeide isonicotinilidrato) hanno ridotto la trascrizione virale dell'HIV-1.

Una rilevante importanza hanno i derivati del ferrocene.

Il ferrocene (Fc) è forse il composto organometallico più conosciuto; stabile all'aria e all'umidità, il Fc subisce un'ossidazione reversibile a Fc^+ ed è quindi uno standard interno ideale in elettrochimica. La robustezza del Fc consente ai suoi anelli di essere derivatizzati utilizzando reazioni comuni in chimica organica, offrendo facile accesso a molti composti organometallici.

Oltre a questi ambiti, i composti organometallici, non ultimo il Fc e i suoi derivati, hanno ricevuto attenzione anche in un campo di ricerca molto distinto rispetto a quelli descritti sopra, ossia la *medicinal chemistry*.

Un composto particolarmente importante in questo campo è la ferrochina (FQ).

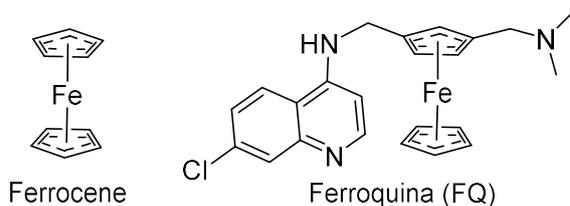


Figura 26: struttura chimica del ferrocene e della ferrochina (FQ)

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel 2015 sono stati stimati 212 milioni di nuovi casi di malaria in tutto il mondo, con 429.000 morti correlate alla malaria nello stesso anno. La metà della popolazione umana è esposta a questa malattia; questo carico endemico richiede soluzioni, tra cui lo sviluppo di nuovi farmaci e vaccini efficaci e metodi di prevenzione. In termini di sviluppo di farmaci, la più grande sfida è la resistenza che i parassiti della malaria sviluppano, che rende inefficaci diversi farmaci.

In questo contesto la ferrochina (FQ) è stato il primo di una serie di derivati ferroceniliclorochinilici che sono stati preparati.

La combinazione di FQ e *artefenomel* (un triossolano antiparassitario a rapida azione) si trova, al momento della stesura, in fase IIb di sperimentazioni cliniche; in una tale situazione, una singola dose del medicinale antimalarico elimina i parassiti in qualsiasi stadio del loro ciclo vitale: dai parassiti asessuati ematici persistenti (l'eradicazione dei quali cura i sintomi della malaria) agli ipnozoiti a lunga vita nel fegato (la cui morte impedisce le ricadute).

L'attività biologica di FQ deriva da due principali modalità d'azione: grazie alla presenza di uno scheletro di 4-amminochinolina, i centri basici consentono l'accumulo nell'ambiente acido del vacuolo digerente parassitario.

Nel vacuolo digerente, FQ impedisce la biomineralizzazione dell'emozoina (cioè la precipitazione di prodotti tossici della digestione dell'emoglobina). Quando la biomineralizzazione di questi pigmenti malarici a base di emoglobina è inibita, il parassita muore.

La seconda modalità d'azione di FQ coinvolge il gruppo ferrocenilico che genera $\bullet\text{OH}$ in condizioni ossidanti attraverso una reazione:



Un'altra ragione che è stata proposta per contribuire all'attività di questi candidati farmacologici è la loro capacità di inibire un passaggio chiave nella propagazione del parassita, ovvero la formazione di merozoiti, una forma invasiva che entra nei globuli rossi. Tale attività, che assicura che le cellule evitino la reinfezione, è stata ipotizzata risultare dalla generazione di radicali $\bullet\text{OH}$ da parte di un gruppo metallocene. Di conseguenza, la formazione di merozoiti è inibita da FQ.

Oltre al collasso della membrana, si ipotizza che $\bullet\text{OH}$ nel vacuolo digerente ossidi il glutatione, una molecola coinvolta nella detossificazione dell'emoglobina. Inoltre, FQ^+ può essere ridotto a FQ in presenza di glutatione, in modo che la produzione di $\bullet\text{OH}$ sia catalitica.

I complessi contenenti ferrocene non solo sono stati incorporati in farmaci organici ma anche in vari complessi di metalli di transizione biologicamente attivi.

In questo modo, è possibile sfruttare le attività di due (o più) frammenti metallici per scopi di *targeting multi-modale*. I derivati contenenti Fc sono presumibilmente indirizzati verso più organelli intracellulari o hanno azioni terapeutiche multi-modali che derivano da un effetto additivo o sinergico dei siti metallici ausiliari.

Esempi classici di chemioterapici anticancro eterobimetallici includono metalloceni incorporati in leganti convenzionali legati a Pd, Pt o Au, con esempi di complessi di Cu, Ru, V, Rh, Al e Sn che ora stanno emergendo. Finora, la maggior parte degli studi su composti eterobimetallici sono stati limitati alla sintesi e alla valutazione della citotossicità *in vitro*; presi insieme, questi studi suggeriscono che la potenza dei composti eterobimetallici contenenti Fc biologicamente attivi dipende molto dal caso specifico, e sfortunatamente non ci sono principi di design molecolare chiari che possano essere seguiti per migliorare l'attività.

Rispetto allo studio dell'attività dei derivati eterobimetallici del ferrocene contro il cancro, si sa poco dell'attività antimalarica di questi composti.⁷

SCOPO

L'attuale pandemia da COVID-19 ha stimolato una corsa senza precedenti verso lo sviluppo di terapie efficaci contro il virus SARS-CoV-2. In questo contesto, la ricerca scientifica si è concentrata sulla scoperta di nuovi farmaci che possano contrastare la replicazione virale e alleviare i sintomi della malattia. Tra le molteplici vie di ricerca, l'impiego di complessi metallici come potenziali inibitori dei meccanismi di replicazione virale ha guadagnato crescente attenzione.

Una recente revisione della letteratura ha evidenziato l'ampia diversità di complessi metallici testati come potenziali inibitori di due meccanismi critici per la replicazione del virus SARS-CoV-2: l'interazione della proteina spike con il recettore ACE2 e l'attività della proteasi papaina PLpro. Oltre ai tradizionali complessi metallici mononucleari, la ricerca ha coinvolto anche terapie metalliche approvate, come la sulfadiazina d'argento, e i poliossometallati (POMs).

Lo scopo di questa tesi è di fornire in maniera critica una panoramica dei complessi metallici recentemente investigati per l'inibizione di tali meccanismi di replicazione virale, con particolare attenzione all'identificazione di potenziali candidati farmacologici. Tra i vari complessi testati, verrà dato particolare risalto ai complessi di oro, argento e rutenio, in quanto hanno dimostrato una promettente attività inibitoria contro la proteasi PLpro, cruciale per la replicazione del virus. Inoltre, sono emersi dati interessanti riguardanti l'interazione della proteina spike con il recettore ACE2, suggerendo potenziali vie per la progettazione di nuovi farmaci antivirali.

In sintesi, questo studio fornisce una panoramica approfondita sul ruolo dei complessi metallici come potenziali agenti antivirali contro il COVID-19 e identifica promettenti candidati per ulteriori studi e sviluppi terapeutici.

7. ANTIVIRALI A BASE METALLICA PER LA CURA DEL COVID-19

Sulla base di diversi dati sperimentali presenti in letteratura, sono stati selezionati più di 100 complessi metallici strutturalmente diversi come inibitori di due meccanismi di replicazione di SARS-CoV-2 rilevanti, ovvero l'interazione della proteina spike (S) con il recettore ACE2 e la proteasi papaina PLpro.⁵

Oltre a molti tipi di complessi metallici mononucleari ben consolidati, il pool di composti testati è stato esteso a terapie metalliche approvate come la sulfadiazina d'argento e il tiomersale, così come ai poliossometallati (POMs).

Tra i complessi metallici mononucleari, solo un piccolo numero di inibitori attivi dell'interazione S/ACE2 è stato identificato, con il dicloruro di titanocene come unico forte inibitore. Tuttavia, tra i complessi contenenti oro e argento molti si sono rivelati efficaci inibitori dell'attività di PLpro. Un'attività altamente promettente contro entrambi i bersagli è stata riscontrata per molti POM. Tutti i complessi selezionati sono stati valutati in saggi antivirali SARS-CoV-2.

Questi studi potrebbero fornire punti di partenza per la progettazione di agenti antivirali SARS-CoV-2 a base di metalli.

Infatti, gli sforzi nello sviluppo di terapie per la malattia da coronavirus 2019 si sono finora concentrati su strategie di riuso di farmaci commercialmente disponibili con successo limitato. Gli inibitori dei bersagli proteici virali, come gli inibitori della polimerasi Remdesivir o Favipiravir, così come i farmaci immunomodulatori diretti alla cellula ospite (ad esempio, il desametasone), sono stati valutati in studi clinici e offrono ora una gamma molto limitata e ancora insufficiente di opzioni terapeutiche.

I progetti di chimica farmaceutica per sviluppare nuovi inibitori delle proteine bersaglio del SARS-CoV-2 hanno portato a candidati farmacologici molto interessanti, che potrebbero essere tradotti in terapie per soddisfare il bisogno urgente di farmaci efficaci.

Il gruppo di complessi metallici studiati include 93 composti mononucleari e 11 poliossometalati (POMs).

Il gruppo delle specie mononucleari contiene 36 complessi di oro (I/III), 17 di rutenio (II/III), 13 di ferro(II/III), 11 di rodio(I), 4 di platino(II), 3 di argento(I), 2 di palladio(II), 2 di titanio(IV), 2 di renio(I), 2 di manganese(II) e 1 di mercurio(II).

I POMs includono i seguenti elementi metallici o metalloidi: As(V), Co(II), Cs(I), Ge(IV), Mo(VI), Pb(II), Pd(II), Rb(I), Sn(IV), Te(IV), Ti(IV) e W(VI).⁵

7.1 Complessi metallici come inibitori dell'interazione tra la proteina Spike (S) e il recettore ACE2

Il ciclo vitale del SARS-CoV-2 inizia con l'ingresso del virus nella cellula ed è mediato dalla proteina S sulla superficie del virus, che si lega al recettore ACE2 nella membrana della cellula ospite.⁵

Questo fatto rende la proteina S un importante bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci contro il SARS-CoV-2 che possono agire come inibitori dell'ingresso.

La subunità S1 della proteina S contiene un dominio di legame al recettore (RBD), che si lega con specifici residui nell'elica N-terminale di ACE2 per consentire l'attaccamento virale. È importante notare che il RBD contiene nove residui di cisteina, di cui otto formano quattro legami disolfuro, che potrebbero essere potenziali partner di legame per ioni metallici.

Per quanto riguarda le interazioni tra il RBD di S e ACE2, è stato osservato che le interazioni polari, i legami idrogeno e i ponti salini sono importanti all'interfaccia tra il RBD e ACE2. Considerando che qualsiasi metallo o legante in grado di interferire con il riconoscimento RBD-ACE2 potrebbe destabilizzare l'interazione S/ACE2 e quindi prevenire l'ingresso cellulare del SARS-CoV-2.⁵

7.2 Complessi metallici come inibitori della proteasi-papaina (PLpro)

Le proteasi sono bersagli ben consolidati nello sviluppo di farmaci antivirali.⁵

Gli inibitori selettivi delle proteasi virali possono interrompere il ciclo vitale del virus senza influenzare le cellule ospiti.

Riguardo al SARS-CoV-2, in particolare due proteasi virali cisteiniche, la papaina-proteasi (PLpro) e la 3-chimotripsina-proteasi (3CLpro, anche chiamata proteasi principale Mpro), sono criticamente importanti per la replicazione virale e quindi rappresentano ottimi bersagli per lo sviluppo di inibitori.

Le PLpro di SARS-CoV e SARS-CoV-2 presentano diversi domini simili, dei quali il presunto dominio di legame labile dello zinco e il dominio di rottura della cisteina catalitica contengono residui di cisteina conservati che possono essere bersagliati da sonde reattive al tiolo.⁵

8. COMPLESSI DI ORO

I complessi dell'oro hanno una lunga tradizione in medicina e per molti esempi sono stati confermati effetti antireumatici, antitumorali o antinfettivi.⁶

È stato valutato il composto guida Auranofin e cinque complessi organometallici di oro selezionati come bersagli farmacologici rilevanti per l'inibizione della proteina spike del SARS-CoV-2, con il recettore ospite dell'enzima convertitore dell'angiotensina 2 (ACE2) e che quindi potrebbero interferire con il processo di ingresso virale.

I complessi di oro sono risultati anche efficienti inibitori della papaina-proteasi (PLpro), enzima chiave nella replicazione virale.

È importante osservare che l'attività dei complessi contro entrambi gli enzimi è correlata alla capacità degli inibitori di rimuovere gli ioni di zinco(II) dall'enzima.

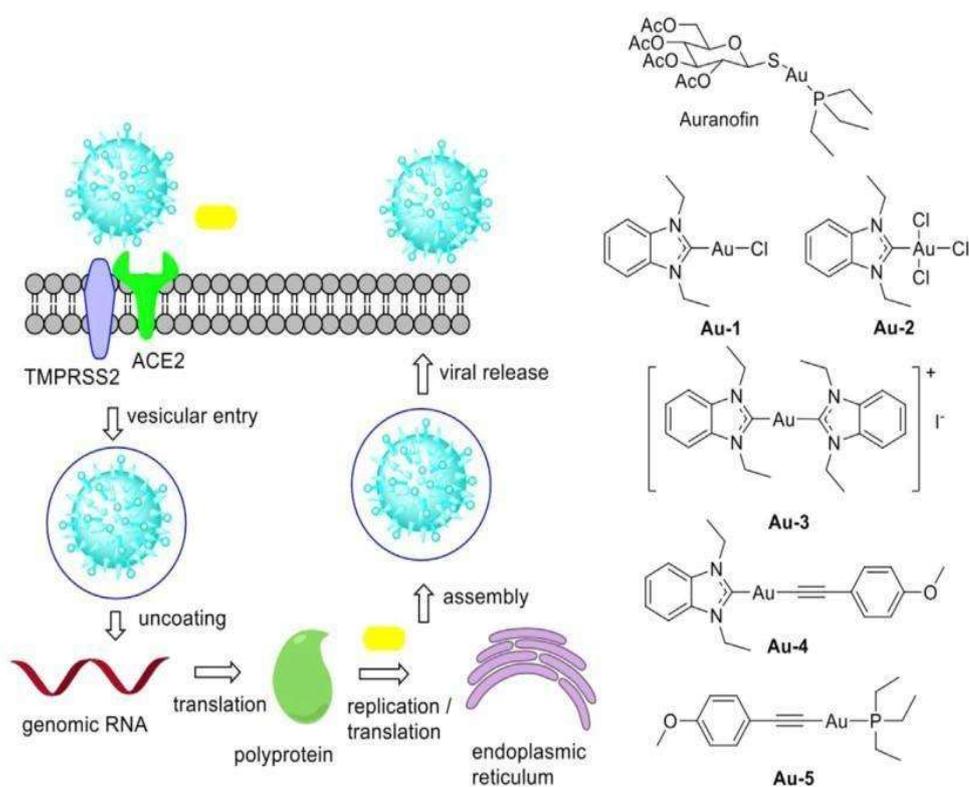


Figura 27: a sinistra il ciclo di vita semplificato del SARS-CoV-2, i farmaci d'oro che hanno come bersaglio l'ingresso e la replicazione virale sono simboleggiati da rettangoli gialli; a destra sono rappresentati i principali composti metallici d'oro esaminati

I complessi **Au-1** fino a **Au-5** contengono un legante carbenico *N*-eterociclico (NHC) e/o un legante alchilico.

In questi studi, i complessi di oro hanno mostrato buoni valori di inibizione e si sono dimostrati più attivi rispetto al farmaco di riferimento (Cloroquina).

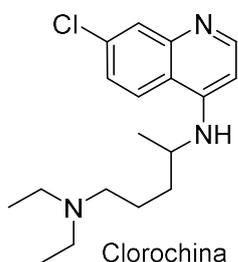


Figura 28: struttura chimica della cloroquina

Un passaggio essenziale nella replicazione dei coronavirus è l'elaborazione della poliproteina replicasi da parte di proteasi, come la proteasi-papaina (PLpro), che produce una serie di proteine non strutturali coinvolte in eventi di legame e replicazione a valle.

Essendo una proteasi ricca di cisteina, la PLpro è un probabile bersaglio per i farmaci a base di oro, che in generale sono noti per interagire con bersagli molecolari contenenti zolfo.

Auranofin, **Au-1**, **Au-2**, **Au-5** così come l'inibitore di riferimento Disulfiram, hanno mostrato un'attività inibitoria forte con valori di IC_{50} vicino a $1.0 \mu M$ (IC_{50} o *concentrazione inibente* è la concentrazione di un inibitore enzimatico necessaria per inibire il 50% del bersaglio in esame).⁶

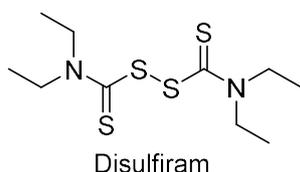


Figura 29: struttura chimica del Disulfiram (inibitore di riferimento)

È stato osservato che i composti **Au-3** e **Au-4** sono inattivi contro la PLpro del SARS-Cov-2 con valori di IC_{50} superiori a $50 \mu M$.

La mancanza di attività di **Au-3** e **Au-4** contro la PLpro del SARS-CoV-2 rispetto agli altri composti di oro indicano che l'assenza dei leganti cloruro e fosfine, più facilmente sostituibili, impedisce un'interazione più forte tra il centro metallico e l'enzima.

È importante notare che i complessi **Au-3** e **Au-4**, con la loro moderata attività contro la PLpro del SARS-CoV-1, hanno seguito la tendenza opposta rispetto agli altri composti, che erano più attivi contro la PLpro del SARS-CoV-2 rispetto all'enzima del SARS-CoV-1.

I residui di cisteina in entrambi i tipi di PLpro del SARS-CoV studiati sono i probabili siti di legame per i complessi metallici dell'oro e questa interazione sarà facilitata dalle reazioni di sostituzione del legante con l'oro.⁶

Tabella 2: inibizione dell'interazione dell'attività spike-ACE2 e dell'attività della PLpro; benzilimidazolo è stato utilizzato come riferimento negativo nei test

	Spike ACE-2 (IC₅₀ μM)	PLpro SARS-CoV-1 (IC₅₀ μM)	PLpro SARS-CoV-2 (IC₅₀ μM)
Benzilimidazolo	>100	>100	>100
Clorochina	31,9±5,4	n.d.	n.d.
Disulfiram	n.d.	6,5±0,4	1,05±0,34
Auranofin	22,2±2,8	25,5±1,2	0,75±0,13
Au-1	19,4±5,7	6,3±1,6	1,04±0,02
Au-2	20,0±2,3	5,5±0,5	1,44±0,22
Au-3	21,3±6,8	14,2±0,3	>100
Au-4	25,0±4,2	14,1±2,1	>50
Au-5	16,2±2,4	6,7±0,9	0,96±0,07

Oltre alla cisteina catalitica, la PLpro ospita diversi residui di cisteina in un dominio di legame Zn labile, che è responsabile della corretta piegatura della proteina e della stabilizzazione della geometria locale. L'espulsione dello Zn^{2+} da questo sito rappresenta un altro meccanismo probabile di inibizione della PLpro.

È stata valutata la capacità degli inibitori di sostituire gli ioni di zinco della PLpro misurando lo zinco rilasciato con un colorante fluorescente selettivo per lo zinco.

Negli studi con la PLpro del SARS-CoV-2, tutti i composti, tranne **Au-3** e **Au-4**, sono in grado di sostituire efficientemente gli ioni zinco(II). Questi risultati sono in ottimo accordo con l'inattività di **Au-3** e **Au-4** contro la PLpro del SARS-CoV-2, così come l'alta attività dell'Auranofin contro questo enzima.

In definitiva, i risultati degli esperimenti di espulsione dello zinco correlano molto bene con il profilo di attività dei complessi dell'oro nei saggi enzimatici e spiegano le differenti attività dei complessi contro i due tipi di PLpro.

In conclusione, è stato dimostrato che i complessi dell'oro possono mirare a due vie rilevanti nel ciclo vitale del coronavirus.

La maggiore attività è stata riscontrata contro la PLpro del SARS-CoV-2 con l'Auranofin e complessi organometallici **Au-1**, **Au-2** e **Au-5**; la loro attività correla molto bene con la loro efficacia nell'espellere lo zinco.

Tuttavia, per **Au-1**, **Au-3** e **Au-5** sono stati segnalati forti effetti citotossici sulle cellule ospiti; tali effetti ostacolerebbero una caratterizzazione accurata dei possibili effetti antivirali in modelli cellulari.⁶

9. COMPLESSI DI RAME

Le ciasiopeine sono composti ben noti a base di rame(II) con leganti fenentrolina o biperidina; anche se la loro importanza è riconosciuta sulla cura di tumori e di malattie batteriche, nuove ricerche sono state condotte per identificare il loro effetto inibitorio contro la principale proteasi, Mpro, responsabile della replicazione e della trascrizione primaria del materiale genetico del virus SARS-CoV-2.⁸

Seguendo la ricerca di farmaci contro il SARS-CoV-2, in questo lavoro, diversi analoghi di ciasiopeina contenenti aminoacidi sono stati sottoposti a studi comparativi per determinare le loro modalità di legame contro l'enzima TMPRSS2 (proteasi di membrana di tipo II con ampia espressione nelle cellule epiteliali del tratto respiratorio, gastrointestinale, della prostata e di altri organi). TMPRSS2 funge da importante cofattore nell'ingresso del SARS-CoV-2 e di conseguenza, l'inibizione dell'attività TMPRSS2 è una strategia promettente per bloccare l'infezione del virus.

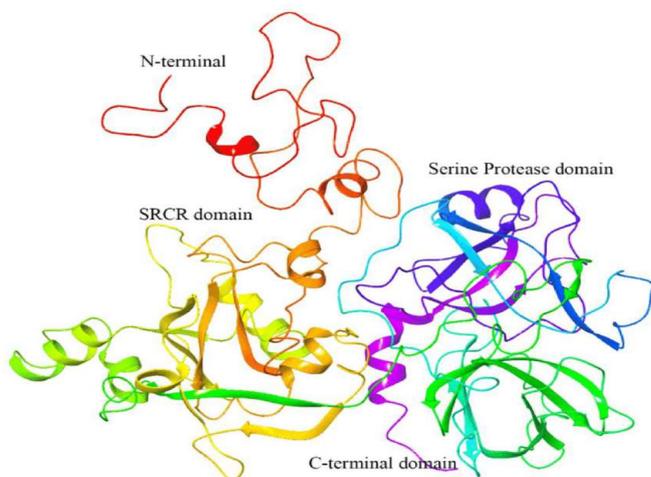


Figura 30: struttura chimica dell'enzima TMPRSS2

Complessi di metalli di transizione come promettenti agenti antivirali contro il SARS-CoV-2

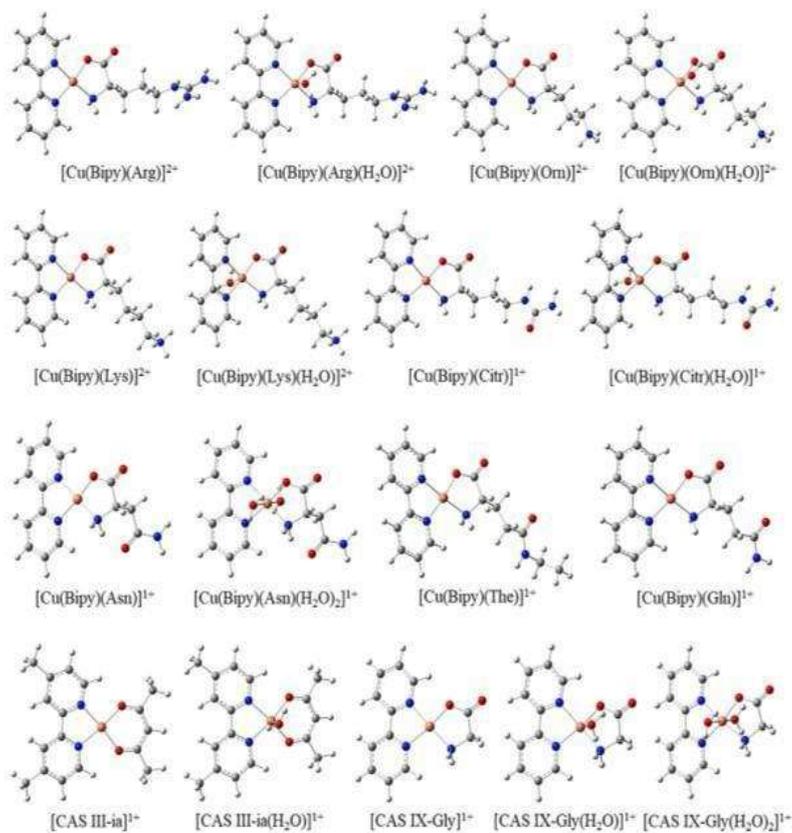


Figura 31: composti a base di Ciasopeine studiati per l'inibizione di Mpro

Per le analisi sono stati utilizzati composti di coordinazione di rame(II) con leganti bidentati del tipo diimmine (N,N),2,2-bipiridina e (N,O) L-amminoacidi di arginina, citrullina, aspargina, glicina, lisina, ornitina, glutamina e teanina.

Il composto che ha mostrato la migliore energia libera di legame è stato il [Cu(Bipy)(Lys)]²⁺ seguito da [Cu(Bipy)(Orn)]²⁺ e [Cu(Bipy)(Arg)]²⁺.

Si è osservata una maggiore interazione fra il complesso e l'enzima quando all'interno della struttura è presente almeno una molecola di acqua; ciò è dovuto alla presenza di un legame a idrogeno in più che porta a un piccolo aumento dell'energia libera di legame.

I migliori risultati sono stati ottenuti per i composti $[\text{Cu}(\text{Bipy})(\text{Arg})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{Bipy})(\text{Orn})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{Bipy})(\text{Lys})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$.

Tali composti interagiscono tramite formazione di interazioni a idrogeno con il sito di rottura TMPRSS2 C-terminale (Arg-815-Ser686) della proteina spike del SARS-CoV-2; questo sito è considerato più suscettibile agli interventi farmacologici rispetto al sito di rottura N-terminale (Arg685-Ser686).

Gli studi effettuati hanno dimostrato che i complessi di rame(II) possono interagire con bersagli cruciali del SARS-CoV-2 come Mpro, PLpro, proteina spike e ACE2; tra questi il complesso planare quadrato di struttura $[\text{Cu}(\text{L})_2]$ dove L= 2-(4-morfolinobezilideneammino)fenolo, mostra un'energia di legame più alta rispetto ai complessi di rame con Arg, Orn e Lys, qui studiati.

In generale, date le sue promettenti funzioni all'inizio delle infezioni da SARS-CoV-2 e altri virus respiratori, si ritiene che la regolazione nell'espressione o dell'attività del TMPRSS2 rappresenti un bersaglio adatto per i futuri trattamenti del COVID-19.⁸

10. COMPLESSI DI ALTRI METALLI COME INIBITORI DELLA PAPAINA PROTEASI PL_{pro}

Il processo di screening ha rivelato un'attività molto bassa o trascurabile per tutti i complessi contenenti ferro, manganese, mercurio, renio e titanio. Per quanto riguarda i complessi con palladio, platino e rutenio, sono stati identificati alcuni esempi con attività promettenti.⁵

Tra i metalli del gruppo 10, complessi di platino e di palladio sono state le specie con maggiore attività inibitoria nei confronti della PL_{pro} del SARS-CoV-2.

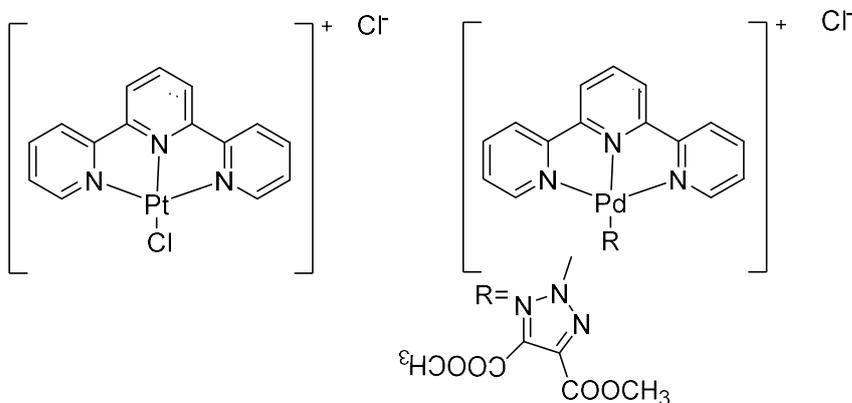


Figura 32: complessi di platino e palladio con buono IC₅₀

In aggiunta, tre composti a base di [Ru(II)Cl₂(*p*-cimene)(NHC)] e due specie polipiridiliche, hanno mostrato attività inibitoria contro la PL_{pro} del SARS-CoV-2, che potrebbe risultare un punto di partenza per lo sviluppo di ulteriori farmaci.

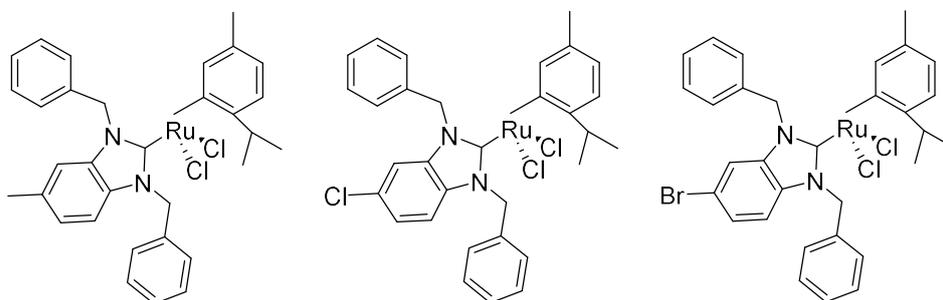


Figura 33: composti a base (*p*-cimene)(NHC)Ru(II)Cl₂

Per quanto riguarda i complessi polipiridilici di rutenio, la doppia carica positiva posseduta dal complesso offre un contributo nell'inibizione in quanto i composti con la specie monocarica sono risultati significativamente meno attivi.⁵

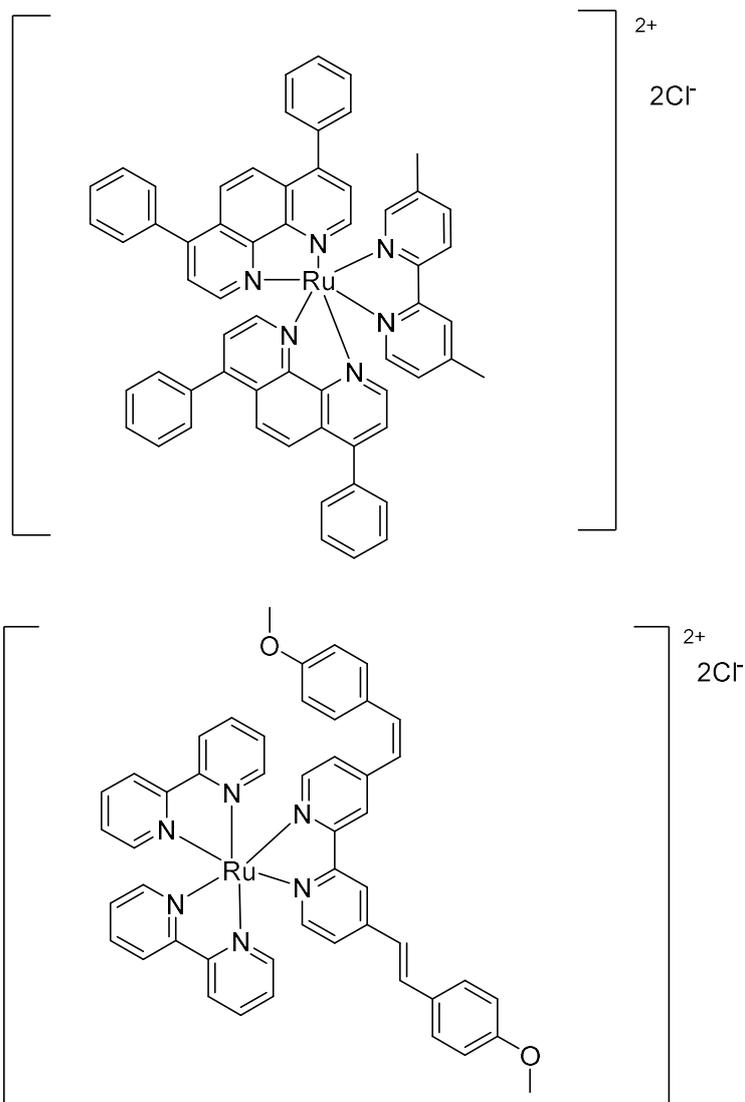


Figura 34: complessi di rutenio aventi doppia carica positiva

Sono stati identificati buoni inibitori dell'enzima PLpro anche complessi a base di rodio(I) con formula generale $[RhX(cod)(NHC)]$ (con X =alogenuro, cod =1,5-cicloottadiene e NHC =carbene N -eterociclico).⁵

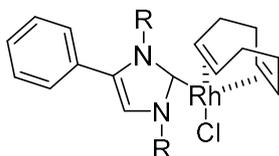


Figura 35: complesso di rodio con maggiore IC_{50} riscontrato

Infine, è stata osservata una notevole inibizione dell'enzima da parte del nitrato di argento e di altri composti a base di argento come la solfadiazina di argento, nella quale il metallo è saldamente coordinato (ad esempio da un legante NHC).⁵

È importante sottolineare che i complessi di argento hanno mostrato un'attività inibitoria comparabile ai complessi a base di oro.

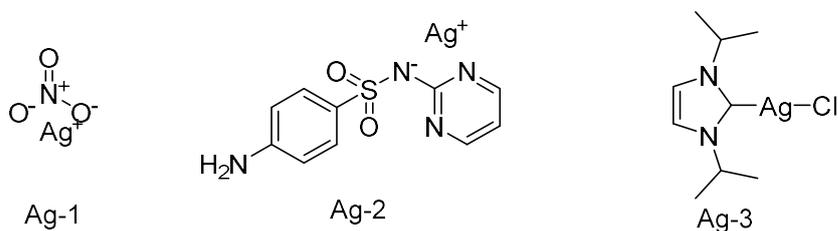


Figura 36: complessi di argento con una buona inibizione contro l'enzima PLpro

Tabella 3: valori di IC₅₀ dei composti di argenti studiati e messi a confronto con i valori di attività inibitoria rilevati per i composti di oro

	SARS-COV-1 PLpro	SARS-COV-2 PLpro
	IC₅₀ (μM)	IC₅₀ (μM)
Ag-1	12±2	0,45±0,21
Ag-2	29±7	1,03±0,04
Ag-3	11,4±0,05	0,18±0,07
Au-1	6,3±1,6	1,04±0,02
Au-2	5,5±0,5	1,44±0,22
Au-5	6,7±0,9	0,96±0,07

11. POLIOSSOMETALATI (POM)

I polioossometalati (POM) sono aggregati di ossidi metallici che mostrano una vasta gamma di strutture contenenti ioni metallici di transizione in stati di ossidazione elevati.⁵

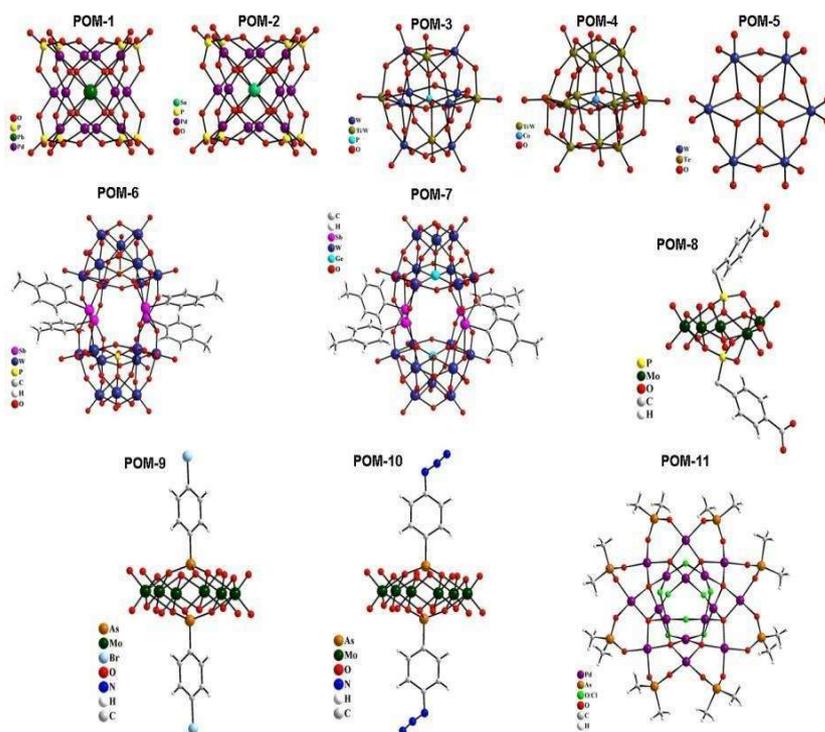


Figura 37: polioossoanioni studiati contro l'enzima PLpro del SARS-CoV e SARS-CoV-2

La maggior parte dei POM ha mostrato un'ottima attività come inibitori della PLpro.

Contro l'enzima del SARS-CoV-2, sei su undici tra i composti studiati hanno mostrato significativi effetti ad una concentrazione pari a 1,0 μ M; si è osservato che **POM-4** è inattivo nei confronti del SARS-CoV-2, mentre **POM-8** a **POM-10** sono inattivi contro entrambi gli enzimi.

In generale, si è osservata una maggiore attività contro l'enzima del SARS-CoV-2 rispetto a quello del SARS-CoV.⁵

Ad eccezione di **POM-5**, che presenta un IC₅₀ di 5,8 µM, tutti i composti si sono rivelati altamente attivi contro PLpro del SARS-CoV-2 (IC₅₀ = 0,1-0,5 µM), ed i più efficaci sono risultati **POM-1**, **POM-6** e **POM-11**.

Tabella 4: IC₅₀ di complessi metallici selezionati contro PLpro di SARS-CoV e SARS-CoV-2

	<i>SARS-COV-1 PLpro</i>	<i>SARS-COV-2 PLpro</i>
	<i>IC₅₀ (µM)</i>	<i>IC₅₀ (µM)</i>
<i>Rh-1</i>	6,7±2,4	2,0±1,0
<i>Ag-1</i>	12±2	0,45±0,21
<i>Ag-2</i>	29±7	1,03±0,04
<i>Ag-3</i>	11,4±0,05	0,18±0,07
<i>POM-1</i>	0,95±0,06	0,17±0,11
<i>POM-2</i>	0,82±0,17	0,54±0,08
<i>POM-5</i>	19,3±4,6	5,8±1,8
<i>POM-6</i>	9,1±1,6	0,20±0,03
<i>POM-7</i>	2,4±1,6	0,46±0,19
<i>POM-11</i>	0,71±0,2	0,13±0,04

È stata riscontrata un'attività più marcata per i POMs polinucleari; in questo gruppo, sette derivati hanno mostrato più del 50% di inibizione dell'interazione S/ACE2, mentre i restanti quattro (**POM-5**, **POM-8 a POM-10**) sono risultati inattivi mostrando meno del 10% di inibizione.

Di conseguenza il complesso mononucleare titanocene dicloruro e i POMs **POM-6**, **POM-7** e **POM-11** sono stati selezionati per studi dose-risposta più dettagliati. Con un valore di IC_{50} di $0,2\mu M$, POM-6 è stato il composto più attivo contro l'interazione S/ACE2.⁵

Tabella 5: valori di IC_{50} dei complessi selezionati come inibitori dell'interazione S/ACE2

	<i>IC_{50} (μM)</i>
<i>Titanocenedicloruro</i>	$3,9\pm 0,3$
<i>POM-6</i>	$0,2\pm 0,1$
<i>POM-7</i>	$0,3\pm 0,1$
<i>POM-11</i>	$2,5\pm 0,3$

CONCLUSIONE

L'approccio innovativo di esaminare i complessi metallici come potenziali farmaci antivirali per il COVID-19 ha fornito una prospettiva affascinante e promettente nel campo della ricerca farmaceutica. Attraverso una vasta gamma di composti, che spaziano dalle terapie a base metallica consolidate ai poliossometallati, è emersa una ricchezza di dati che ha fornito preziose informazioni sulle potenziali vie terapeutiche contro tale virus.

Particolarmente sorprendenti sono stati i risultati riguardanti l'efficacia di alcuni complessi metallici, tra cui quelli contenenti oro, argento e rutenio, nel contrastare la replicazione virale attraverso l'inibizione della proteasi PLpro. Questi composti hanno dimostrato una forte attività *in vitro*, suggerendo la possibilità di sviluppare nuovi farmaci antivirali che potrebbero rivoluzionare il trattamento del COVID-19.

Diversi complessi metallici hanno dimostrato un maggiore successo o una struttura chimica interessante:

- Auranofin ha mostrato un'attività inibitoria forte la proteasi PLpro del SARS-CoV-2 con un valore di IC_{50} vicino a $1,0 \mu M$.

È importante ricordare che tale composto è stato efficace anche nell'espellere gli ioni di zinco dall'enzima, il che suggerisce un meccanismo di azione interessante.

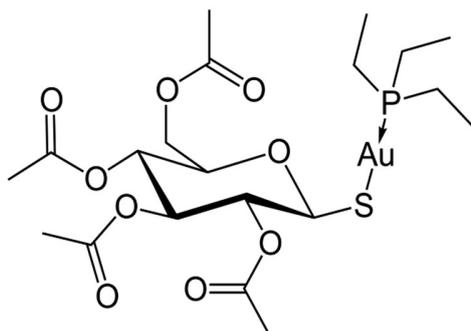


Figura 38: struttura chimica del Auranofin

- Complessi di rame contenenti aminoacidi come arginina, ornitina e lisina hanno mostrato un'attività inibitoria contro l'enzima TMPRSS2, che è coinvolto nell'ingresso del virus nella cellula ospite; in particolare il composto $[\text{Cu}(\text{Bipy})(\text{Arg})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ha dimostrato una buona energia di legame e un'interazione significativa con il sito di rottura TMPRSS2 C-terminale.

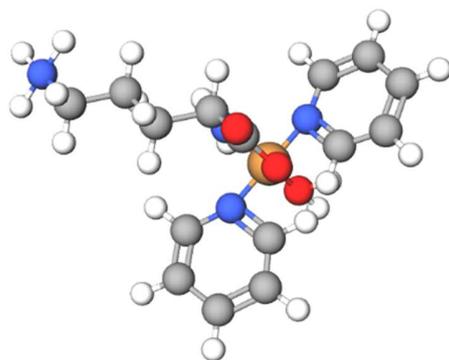


Figura 39: struttura chimica di $[\text{Cu}(\text{Bipy})(\text{Arg})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$

- Dei polioossometallati (POM), POM-1, POM-6 e POM-11 hanno mostrato un'interessante attività inibitoria contro la proteasi PLpro del SARS-CoV-2 con valori di IC₅₀ compresi fra 0,1 e 0,5 µM.

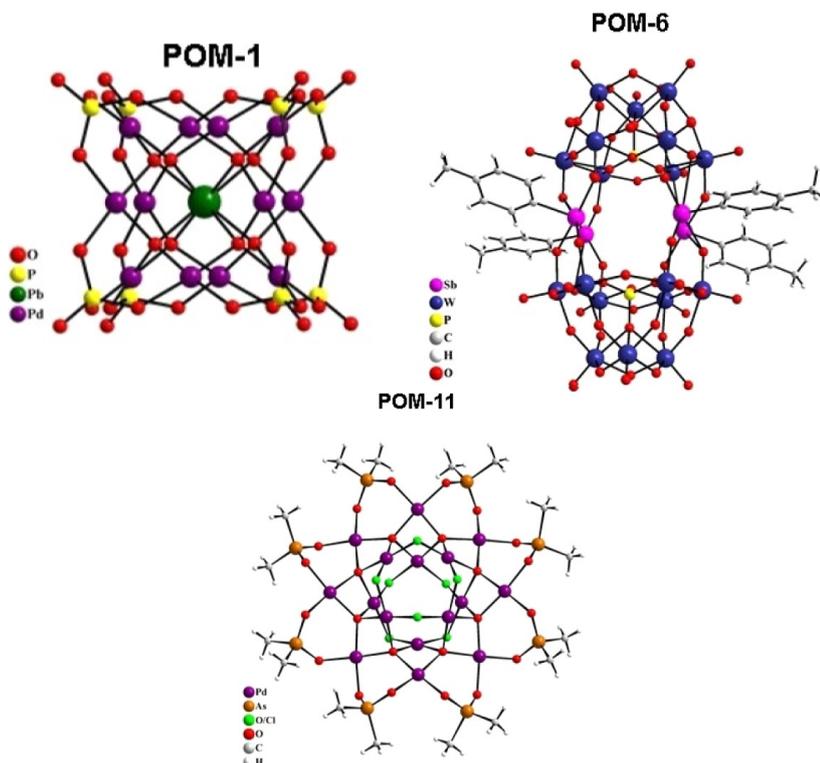


Figura 40: struttura chimica dei POM-1, POM-6 e POM-11

Tuttavia, nonostante i risultati davvero incoraggianti, è essenziale considerare anche gli aspetti relativi alla sicurezza e alla tollerabilità di tali composti. L'efficacia terapeutica deve essere bilanciata con la necessità di minimizzare gli effetti collaterali e la tossicità per i pazienti.

Inoltre, la diversità dei risultati ottenuti, con alcuni composti che hanno mostrato la maggiore efficacia, sottolinea l'importanza di continuare la ricerca e lo sviluppo in questo campo. Identificare i composti più promettenti e comprendere appieno il loro meccanismo d'azione è fondamentale per garantire il successo nell'affrontare virus come quello che ha causato la pandemia COVID-19.

In conclusione, gli studi sui complessi metallici come potenziali agenti antivirali rappresentano un passo significativo nella ricerca di nuovi trattamenti per il COVID-19. Questi risultati aprono la strada a ulteriori indagini che potrebbero portare allo sviluppo di terapie innovative ed efficaci per combattere questa malattia globale ed i suoi eventuali sviluppi.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. <https://it.wikipedia.org/wiki/SARS-CoV-2>; accesso online 23/04/2024
2. Dabrowiak, J.C. *Metals in medicine*; John Wiley and Sons, Ltd., Publication; Department Of Chemistry, Syracuse University, New York (2009)
3. Andrews, H.S.; Herman, J.D.; Gandhi, R.T. *Treatments for COVID-1 – 2023, 2024*. *75:145–57*
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-052422-020316>
4. Ndwandwe, D.; Wiysonge, C.S.; *COVID-19 vaccines – 2021, 71:111–116*
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.07.003>
5. Gil-Moles, M.; Turck, S.; Basu, U.; Pettenuzzo, A.; Bhattacharya, S.; Rajan, A.; Ma, X.; Bussing, R.; Wolker, J.; Burmeister, H.; Hoffmeister, H.; Schneeberg, P.; Prause, A.; Lippmann, P.; Kusi-Nimarko, J.; Hassel-Hart, S.; McGown, A.; Guest, D.; Lin, Y.; Notaro, A.; Vinck, R.; Karges, J.; Cariou, K.; Peng, K.; Qin, X.; Wang, X.; Skiba, J.; Szczupak, L.; Kowalski, K.; Schatzschneider, U.; Hemmert, C.; Gornitka, H.; Milaeva, E.R.; Nazarov, A.A.; Gasser, G.; Spencer, J.; Ronconi, L.; Kortz, U.; Cinatl, J.; Bojkova, D.; Ott, I.; *Metallo-drug Profiling against SARS-CoV-2 Target Proteins Identifies Highly Potent Inhibitors of the S/ACE2 interaction and the Papain-like Protease PLpro – 2021, 27, 17928 – 17940*.
doi.org/10.1002/chem.202103258
6. Gil-Moles, M.; Basu, U.; Hoffmeister, H.; Turck, S.; Varchmin, A.; Ott, I.; *Gold Metallo-drugs to Target Coronavirus Proteins: Inhibitory Effects on the Spike-ACE2 Interaction and on PLpro Protease Activity by Auranofin and Gold Organometallics – 2020, 26, 15140 – 15144*
doi.org/10.1002/chem.202004112
7. Chhabra, R.; Saha, A.; Chamani, A.; Schneider, N.; Shah, R.; Nanjundan, M.; *Iron Pathways and Iron Chelation Approaches in Viral, Microbial, and Fungal Infections – 2020, 13, 275*.
[doi:10.3390/ph13100275](https://doi.org/10.3390/ph13100275)

8. Vazquez-Rodriguez, S.; Ramirez-Contreras, D.; Noriega, L.; Garcia-Garcia, A.; Sánchez-Gaytán, B.L.; Melendez, F.J.; Castro, M.E.; Filgueira de Azevedo Jr, W.; González-Vergara, E.; *Interaction of copper potential metallodrugs with TMPRSS2: A comparative study of docking tools and its implications on COVID-19 – 2023*, 11:1128859.
10.3389/fchem.2023.1128859