

### Gli enzimi essenziali del parassiti quale potenziale bersaglio nella chemioterapia antiparassitaria (\*\*)

In occasione della presentazione di risultati ottenuti nelle linee di ricerca afferenti al I Progetto Farmaci (1984-1988) fu proposto l'inserimento di uno studio sui Farmaci Orfani nel II Progetto Farmaci.

Fu allora sostenuto che nessuna istituzione italiana meglio dell'Istituto Superiore di Sanità potesse interessarsi di farmaci orfani in quanto l'I.S.S. non era istituzione a scopo di lucro, aveva carattere multidisciplinare ed era quindi in grado di portare avanti compiutamente una ricerca nella quale venivano coinvolte competenze di carattere chimico, farmacologico in generale, parassitologico, etc. Il Direttore dell'I.S.S., Prof. Pocchiari, suggerì in particolare di occuparsi di nuovi farmaci per l'idatidosi, la leishmaniosi e la tripanosomiasi dove le competenze in campo veterinario e parassitologico già preesistevano in Istituto. Queste raccomandazioni si tradussero poi praticamente in una prima linea di ricerca « Farmaci per malattie orfane: chemioterapia della idatidosi » responsabile Prof. Settimi, e in una seconda linea di ricerca « Chemioterapia della tripanosomiasi e della leishmaniosi » responsabile Prof. Iorio.

Queste due linee sono adesso raggruppate in un sottoprogetto creato ad hoc dal titolo « Sviluppo di nuovi farmaci per malattie orfane e tropicali dalla medicina tradizionale e per sintesi » al quale fa anche capo la linea di ricerca del prof. Galeffi: « Sviluppo di nuovi farmaci da piante della medicina tradizionale ».

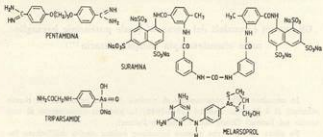
La linea di ricerca alla quale siamo interessati ha come obiettivo principale lo studio di nuovi farmaci contro la tripanosomiasi africana e la leishmaniosi.

I farmaci che si utilizzano contro *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *T.b. gambiense* sono essenzialmente la suramina, la pentamidina (considerata farmaco orfano) e il melarsopolo e per le leishmaniosi i sali antimoniali pentavalenti come il Glucantime [1] (Figura 1).

(\*) Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma.

(\*\*) Presentato al Convegno « Sanità Militare e Farmaci Orfani » (Firenze, 7 Ottobre 1989).

TRIPANOSOMIASI AFRICANA



TRIPANOSOMIASI AMERICANA (MALATTIA DI DAGAS)



LEISHMANOSI

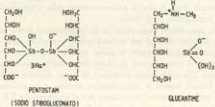


Fig. 1

Questi farmaci furono scoperti nella prima metà di questo secolo quando vi fu un'intensificarsi di ricerche collegate con la scoperta di Ehrlich sulla chemioterapia antimicrobica. Si può dire che la chemioterapia antiparassitaria seguita di pari passo la chemioterapia antimicrobica.

Dopo di allora nella seconda metà di questo secolo per molti decenni nessun nuovo farmaco è stato registrato per usi clinici e solo più recentemente studi clinici sono stati condotti con successo con l'alfadilfluometilornitina contro le tripanosomiasi africane. La rassegna bibliografica mostra tuttavia che in questo ultimo decennio vi è un rinnovato interesse verso la ricerca di nuove sostanze attive contro le malattie protozoarie fra le quali le leishmaniosi e le tripanosomiasi a seguito anche dell'interesse dell'Organizzazione Mondiale della Sanità che ha elaborato programmi prioritari di intervento in questo settore.

La strategia seguita adesso per progettare nuovi farmaci antiparassitari è profondamente mutata rispetto agli anni passati. Un esame di tutto l'insieme della letteratura mostra che mentre i primi farmaci antitripanosoma erano, si può dire, conseguenza dello sviluppo della chemioterapia antimicrobica, oggi i possibili farmaci antitripanosoma sono spesso sostanze che hanno subito una verifica come farmaci antitumorali. Si potrebbe quasi estrapolare questo concetto dicendo che oggi si tenta di vedere il parassita che infetta l'ospite più come una cellula « diversa » anziché un organismo estraneo.

Questo tipo di filosofia ha enfatizzato l'importanza di una ricerca biochimica comparativa tra l'ospite ed il parassita nell'intento di mettere in evidenza attività enzimatiche e/o metaboliche potenzialmente diverse e di utilizzare queste differenze per progettare sostanze capaci di una inibizione selettiva di quei meccanismi necessari al ciclo riproduttivo dei parassiti stessi.

E' in questa ottica che noi abbiamo progettato alcune classi di potenziali antiparassitari.

E' ben noto che tutti i parassiti protozoici non sono in grado di sintetizzare *ab novo* le basi puriniche e quindi sono metabolicamente dipendenti dall'ospite per la loro sintesi [2, 3].

Sia le leishmanie che i tripanosomi posseggono due enzimi di riserva, il nucleoside-fosfotransferasi capace di trasferire un gruppo fosfato da vari esteri monofosforici alla posizione 5' di nucleosidi purinici e un altro enzima purin-fosforibosil-transferasi capace di trasferire un gruppo fosforibosile da una base purinica all'altra. Questi due enzimi parassitari non sono però in grado di differenziare le basi puriniche o i loro ribosidi da analoghi strutturali molto simili e quindi riconoscono come substrati anche l'allopurinolo, l'aminopurinolo, il tiopurinolo e i loro rispettivi ribosidi, la formicina B etc. L'allopurinolo riboside è considerato un farmaco orfano.

Queste basi possono essere trasformate in ribonucleosidi MP, e dopo sostituzione dell'ossidrile con gruppo amminico in ribosidi trifosfati. In tal modo esse possono essere incorporate nel RNA inibendo la sintesi proteica o diventare inibitori di altri enzimi essenziali nel metabolismo purinico del parassita. Come

conseguenza questi analoghi strutturali delle purine si comportano come potenti agenti antileishmania e antitripanosoma in test *in vitro* e *in vivo*.

E' di particolare interesse che questi « falsi substrati » non riescono ad ingannare gli enzimi dell'ospite (mammifero) e non sono tossici per esso. Solo la Formicina B si trasforma in metaboliti tossici per la cellula dell'ospite.

La proprietà antiparassitaria dell'allopurinolo, dell'aminopurinolo e dei rispettivi ribosidi ci ha spinto a sintetizzare delle pirazolo [3,4-d] pirimidine con un residuo diidrossipropilico legato all'azoto pirazolico al posto del ribosio [4] (Figura 2). Lo scopo era quello di verificare se questi derivati di più semplice preparazione potessero sostituirsi ai corrispondenti ribosidi per le attività antileishmania e antitripanosoma.

Per il test *in vivo* sulla Leishmania è stato usato un ceppo MCAN/II/82/ISS29 isolato da un cane in Italia corrispondente a *L. infantum* [4].

Topini vengono inoculati con una sospensione contenente  $6 \times 10^6$  amastigoti attraverso la vena della coda. Dopo 7 giorni si verifica su un topino il grado di

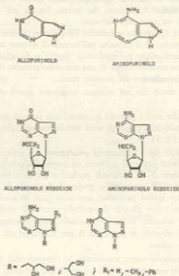


Fig. 2

infezione contando il numero di amastigoti presenti per 1000 nuclei di cellule epatiche, esprimendoli come unità LD: cioè il numero di parassiti per nucleo cellulare epatico moltiplicato per il peso dell'organo in mg.

Nel trattamento a breve termine i composti da saggiare vengono iniettati per via sottocutanea alla dose di 100 mg/kg per 5 giorni consecutivi dal giorno 10 al giorno 15 nel quale i topini vengono sacrificati.

Nel trattamento a lungo termine i topini vengono trattati con i prodotti in esame alla dose di 100 mg/kg per via sottocutanea per 42 giorni consecutivi. Gruppi di topini trattati e non trattati venivano sacrificati dopo 14, 28 e 42 giorni dall'inizio del trattamento ed il carico parassitico valutato come già detto.

Il valore medio della conta dei parassiti nei topini trattati viene espressa come percentuale della media della conta dei parassiti dei gruppi controllo. Come sostanza di riferimento si è usato il glucantime.

Nella Tabella I sono riportati i risultati dell'esperimento a breve termine su

TAB. I — Attività di alcune 1-(diidrossipropil)pirazolo[3,4-d]pirimidine su *Leishmania infantum* in topi Balb/c. I prodotti sono somministrati per via sc alla dose di 100 mg/kg per 5 giorni consecutivi. Il Glucantime è stato usato come riferimento.

Composto	% di inibizione parassitaria (± SE)
1	87.0 ± 0.4
2	86.6 ± 1.2
3	83.9 ± 13.5
4	78.1 ± 0.7
Glucantime	90.0 ± 3.1



quattro prodotti sintetizzati. Gli analoghi dell'aminopurinolo 1 e 2 sono un po' più attivi di quelli dell'allopurinolo ed in particolare il composto 1 si è mostrato il più attivo con un'attività molto simile a quella del glucantime stesso.

L'aminopurinolo 1 è stato scelto per il trattamento a lungo termine e i risultati sono riportati in Figura 3. Esso produce un elevato grado di inibizione, 96%, che si mantiene costante dal 14° giorno in poi senza però arrivare ad una inibizione completa. Il prodotto non è tossico fino alla dose di 3000 mg/kg. La sua alta attività inibitoria (96% nel test a lungo termine) e la sua non tossicità lo farebbero un buon candidato per una terapia in combinazione con altri farmaci leishmanicidi. Un altro importante aspetto di questo prodotto è che il suo processo di sintesi non è complicato, dà buone rese ed è economicamente conveniente.

Nel test *in vivo* sul *T. brucei brucei* non ha dato risultati positivi.

L'attività *in vivo* sul *Trypanosoma brucei brucei* è stata provata infettando i topici con 0,1 ml di sangue di ratto infettato contenente  $5 \times 10^5$  parassiti. Il farmaco viene somministrato sc o p.o., a seconda della solubilità, al tempo 0. Il ceppo utilizzato è molto virulento e uccide gli animali in pochi giorni. L'attività viene valutata dal tempo di sopravvivenza rispetto ai controlli espressa in percentuale.

Un altro sistema enzimatico che in quest'ultimo decennio è stato preso in considerazione come possibile bersaglio della terapia antiprotozoaria è l'ornitina-decarbossilasi piridossal-fosfato dipendente.

Questo enzima è quello che inizia con la decarbossilazione dell'ornitina e la formazione della putrescina quella sequenza di reazioni enzimatiche che porta alla formazione delle poliammine spermidina e spermina.

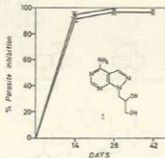


Fig. 3. Effetto del trattamento a lungo termine con 1 sulla *Leishmania infantum* in topi Balb/C. Il Glucantime è stato usato come riferimento. Le sostanze sono state somministrate per via sc alla dose giornaliera di 100 mg/kg. (○) 1, (●) Glucantime.

Queste poliammine sono essenziali per la crescita, la replicazione e differenziazione cellulare e ancor più necessarie per le cellule in rapido sviluppo. Il primo obiettivo è stato quindi quello di programmare degli inibitori delle ODC per impedire la sintesi delle poliammine. L'intento principale era quello di preparare sostanze antitumorali.

Un'interessante rassegna su « Chemotherapeutic implications of polyamine biosynthesis » è stata pubblicata da Sjoerdsma e Scheckter nel 1984 [5].

Il prodotto più noto di questa serie è l'eflornitina o DFMO cioè un'ornitina alfa-sostituita da un gruppo difluorometilico.

La caratteristica di questi prodotti è quella di bloccare l'enzima in modo irreversibile; sono infatti denominati anche « inibitori suicidi » in quanto vengono attivati dall'enzima modificando la struttura chimica e legandosi con legame covalente ad un centro nucleofilo dell'enzima in modo irreversibile [6].

La sostanza più sperimentata è stata l'eflornitina che è entrata in prove cliniche in alcune forme tumorali. Dopo questi successi ed essendo ben noto il ruolo importante della poliammine nei tripanosomi gli studi sono stati estesi anche nel campo delle infezioni parassitarie.

I risultati più sorprendenti si sono avuti verso i tripanosomi africani: l'eflornitina era in grado di curare infezioni acute di tripanosomiasi africane in animali di laboratorio (roditori).

Dopo questi risultati in laboratorio, la sperimentazione si è estesa dal 1981 in poi a prove cliniche in pazienti affetti da tripanosomiasi africane anche in casi di avanzata malattia ed invasione dei parassiti nel sistema nervoso centrale [7]. I risultati sono stati incoraggianti e continuano in collaborazione con l'O.M.S.

Noi abbiamo preparato alcuni prodotti che si possono considerare analoghi dell'alfa-difluorometilornitina e che possono essere considerati come derivati alfa-sostituiti della ornitina e della lisina. Alcuni di questi derivati sono stati provati in topini infettati con *L. infantum* nel test a breve termine [8] (Tabella II).

I due guanidino-derivati allo stato solido formano un anello imidazolidin-4-one, tipo creatinina; in soluzione a pH 7 vicino al pH fisiologico esistono ancora nella forma ciclica lattamica come risulta dall'esame degli spettri <sup>13</sup>C fatti a confronto con la creatina e la creatinina.

Il più attivo della serie che, da un punto di vista chimico, nella forma aperta, può considerarsi una « omoarginina inversa » è stato anche provato nel test a lungo termine con le modalità descritte precedentemente (Figura 4).

In questo esperimento oltre al glucantime, usato come riferimento, è stato provato anche l'alfa-difluorometilornitina che è risultata attiva. Alcuni studi sull'attività del DFMO verso la leishmania (forma pronastigote) erano stati portati avanti con risultati incerti. Per la prima volta il DFMO è stato provato nella forma intracellulare, amastigote, provocando una inibizione dei parassiti dell'85%.

Tuttavia né il DFMO né il composto 3 riescono a curare gli animali.

Curve dose-risposta del DFMO e dell'acido 6-ammino-2-guanidinoesanoico sono mostrate nella figura successiva.

I valori ED<sub>50</sub> (95% CI) sono: 0.35 (0.30-0.40) mg/kg×5 per il DFMO e

TAB. II — Attività di DFMO e analoghi sulla *Leishmania infantum* in topi Balb/c. Le sostanze sono state somministrate per via sc alla dose di 100 mg/kg per 5 giorni consecutivi. Il Glucantime è stato usato come riferimento.



Composto	n	R	R'	R''	% Inibizione del parassita ± SE
DFMO (MDL 71 782A)	3	NH <sub>2</sub>	ClF <sub>2</sub>	OH	85 ± 1
1	3	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -Cl <sub>2</sub>	OH	66 ± 2
DL-HAVA	3	H	NH-NH <sub>2</sub>	OH	67 ± 4
2*	3	H	— NHCl=NHNH	—	56 ± 5
3*	4	H	— NHCl(=NH)NH	—	75 ± 1
4*	4	H	NH-NH <sub>2</sub>	OH	69 ± 3
Glucantime <sup>b</sup>					93 ± 1

\* Forma lattamica: anello imidazolidin-4-onico.

<sup>b</sup> Sono evidenti segni di tossicità.

<sup>c</sup> N-Metilglucamina antimonato.

1.2 (1.0-1.4) mg/kg × 5 per il composto 3. Mentre il glucantime ha un ED<sub>50</sub> di 11 mg/kg × 5. A valori più alti di inibizioni le dosi di DFMO e quella del composto 3, sono maggiori di quelli del glucantime e non riescono comunque a curare gli animali.

Noi abbiamo intenzione di proseguire nella preparazione di potenziali inibitori della biosintesi delle poliammine.

Come si è accennato iniziando a parlare dell'ODC la formazione della putrescina rappresenta la prima tappa (rate-limiting step) per arrivare alla formazione delle poliammine.

Ora come è possibile bloccare questa sintesi intervenendo con inibitori dell'ODC così è anche possibile bloccare o antagonizzare questa sintesi inibendo le sequenze successive.

In questi ultimi anni dall'86 all'89 c'è stato un crescente interesse nella ricerca di sostanze capaci di interferire con la sintesi delle poliammine a vari livelli.

Nello Schema I è presentato un quadro di insieme di meccanismi enzimatici che portano alla formazione della spermidina e spermina, gli enzimi coinvolti nelle varie reazioni, e contemporaneamente alcuni inibitori specifici che possono interferire a vari livelli del processo totale.





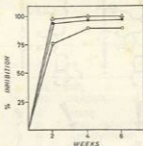
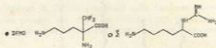


Fig. 4. Effetto del trattamento a lungo termine con DFMO e J sulla *Leishmania infantum* in topi Balb/c. Glucantime è stato usato come riferimento. Le sostanze sono state somministrate sc alla dose giornaliera di 200 mg/kg per DFMO, 10 mg/kg per J e 100 mg/kg per Glucantime. (●) DFMO, (○) J, (△) Glucantime.

Diciamo che l'intento principale di questi studi molto recenti (alcuni di essi sono riportati nella letteratura del 1989) è di trovare nuovi antitumorali, ma non è impensabile che questi risultati possano essere estesi alla ricerca di potenziali farmaci antiprotozoari.

Il Metilglossale bis-guanilidrazone è stato anche utilizzato come antitumorale in studi clinici ma a causa della sua tossicità questi studi sono stati sospesi [9]. Fra gli analoghi strutturali della MGBG sintetizzati meritano particolare attenzione quei derivati che nella molecola presentano sottostrutture in grado di inibire contemporaneamente più di un sistema enzimatico coinvolto nella sintesi della poliammine. Per es. Metilglossale bis (cicloesilamidinoidrazone) è un inibitore della biosintesi delle poliammine che inibisce contemporaneamente S-adenosilmetionina decarbossilasi e la spermidina sintasi [10].

Specifici inibitori della spermidina sintasi e della spermina sintasi, due enzimi coinvolti nella biosintesi delle poliammine, e precisamente l'S-adenosil-1,8-diammino-3-tio-2-ottano [11] e S-adenosil-1,12-diammino-3-tio-9-azadodecano [12], recentemente sintetizzati, possono aiutare a far comprendere meglio i meccanismi che regolano la biosintesi della spermidina e spermina.

Sarebbe interessante poter sfruttare queste conoscenze per programmare la sintesi di un inibitore polifunzionale che risulti più efficace nel diminuire il contenuto cellulare delle poliammine.

BIBLIOGRAFIA

- [1] GUTTERIDGE W.E., « *Brit. Med. Bull.* », 41, 162 (1985).
- [2] BERENS R.L., MARR J.J., LOOKER D.L., NELSON D.J. e LA FOU S.W., « *J. Infectious Diseases* », 150, 602 (1984).
- [3] HUXE D.J., « *Ann. Rep. Med. Chem.* », 21, 247 (1986).
- [4] GATTA F., PEROTTI F., GRADONI L., GRAMICCIA M., ORSINI S., PALAZZO G. e ROSSI V., « *Eur. J. Med. Chem.* », in stampa, (1990).
- [5] BEY P., VEVERT J.P., VAN DORSELAEER V. e KORB M., « *J. Org. Chem.* », 44, 2732 (1979).
- [6] SCHWICHTER P.J. e SJORDESSMA A., « *Paras. Today* », 2, 223 (1986).
- [7] GRADONI L., IORIO M.A., GRAMICCIA M. e ORSINI S., « *Il Farmaco* », 44, 1157 (1989).
- [8] NAKASHIMA K., HIRASAMI H., TSUKADA T. e MARIKAWA S., « *Eur. J. Med. Chem.* », 22, 553 (1987).
- [9] HIRASAMI H., TSUKADA T., MARIKAWA S. e NANASHIMA K., « *Biochem Pharmacol.* », 37, 364 (1988).
- [10] TANG K.-C., MARUZZA R. e COWARD J.K., « *J. Med. Chem.* », 24, 1277 (1981).
- [11] WOYTER P.M., BLACK A.Y., DUFF K.J., COWARD J.K. e PEGG A.E., « *J. Med. Chem.* », 32, 1300 (1989).