

Esempi di composti metallici strutturali: inibitori di proteine e enzimi

Verranno trattati separatamente da un lato le proteine e dall'altro gli enzimi e i metallo-enzimi, in quanto le strategie adottate per la loro inibizione, pur rientrando nello stesso ambito, hanno sostanziali differenze. Premettendo che non c'è ancora nessun farmaco a base di metalli il cui meccanismo d'azione riguardi (principalmente) l'inibizione di enzimi, in questo capitolo verranno trattati prevalentemente esempi di composti progettati come inibitori di enzimi. Vi sono in letteratura molti esempi di composti metallici dotati di attività farmacologica (e.g. antitumorali) il cui meccanismo d'azione non è noto ma i quali (forse) inibiscono (anche) degli enzimi. Non necessariamente questa inibizione, trovata *in vitro*, avviene anche *in vivo* e non necessariamente è la causa primaria della loro attività. In genere questi composti metallici sono sostituzionalmente più o meno labili, cioè *in vivo* rilasciano alcuni o tutti i leganti (vedi cisplatino). Quindi sono *composti funzionali*. Per esempio l'**Auranofin** è un complesso fosfinico di Au(I) usato (sempre meno) per il trattamento dell'artrite reumatoide. Recentemente si è trovato che il composto è anche attivo contro alcuni parassiti, apparentemente perché l'oro rilasciato dal complesso va a legarsi a una seleno-proteina, la *thioredoxin reductase*. L'oro si lega alla seleno-cisteina nel sito attivo dell'enzima (Au(I) è molto *soft* e ha forte affinità per lo zolfo e ancora di più per il selenio). Vi sono molti altri esempi simili in letteratura. Molto spesso questi composti sono poco selettivi e l'inibizione enzimatica evidenziata *in vitro* (che non necessariamente avviene anche *in vivo*!) è spesso solo una delle possibili interazioni che il complesso può avere con biomolecole.

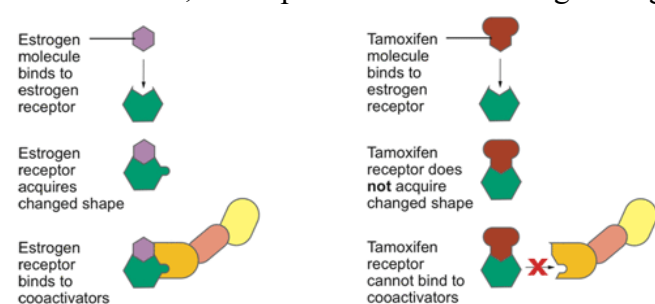
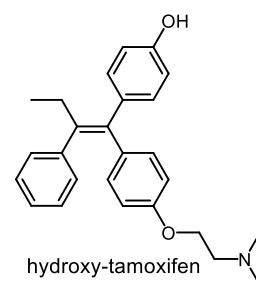
Questo capitolo tratterà invece **complessi coordinativamente saturi e inerti**, ossia **composti strutturali** che dovrebbero essere stabili *in vitro* e anche *in vivo* e non rilasciare alcun legante. Quindi il metallo non darà nessuna nuova interazione diretta, cioè non si coordinerà direttamente ad alcun bersaglio biologico. Questi composti possono essere considerati come degli oggetti tridimensionali, in cui il metallo ha un ruolo strutturale (*templante*), e possono essere progettati per interagire con siti di biomolecole (in particolare quando sia già nota la struttura di loro inibitori organici). Le interazioni avverranno tramite i leganti e saranno di tipo "supramolecolare", cioè non covalenti o coordinative (e.g. *stacking* π - π , legami a idrogeno, interazioni idrofobiche,...).

Verranno trattati gli esempi più significativi, suddivisi per classi di enzimi.

Inibitori di recettori ormonali

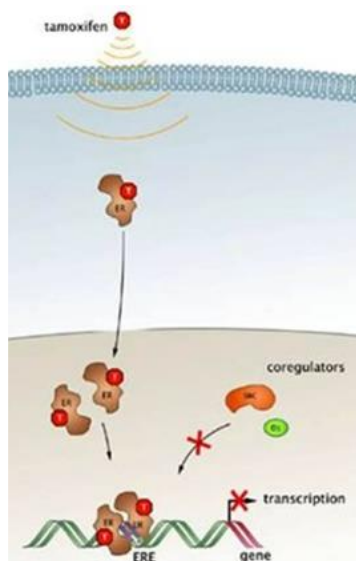
Il primo esempio che trattiamo riguarda in realtà l'inibizione di una proteina senza funzioni catalitiche, un recettore presente su alcune cellule tumorali che lega l'ormone steroideo estrogeno, e quindi si chiama *Estrogen Receptor*, ER. Le cellule tumorali che presentano la forma alfa di questi recettori ormonali, definite **ER α +**, hanno bisogno dell'estrogeno per proliferare e smettono di crescere, o muoiono, quando vengano trattate con sostanze che blocchino il legame dell'estrogeno al suo recettore.

Il **tamoxifen** è un potente farmaco antitumorale usato nel trattamento del tumore al seno ormone-dipendente (ER α +) . La molecola, o meglio il suo metabolita idrossi-tamoxifen (figura), compete efficacemente con l'estrogeno per legarsi al recettore. Normalmente, il complesso recettore-estrogeno raggiunge il nucleo dove si lega a certe sequenze del

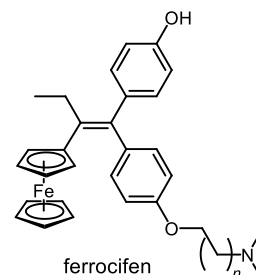


DNA (*estrogen response elements*) attivando la trascrizione di diversi fattori di proliferazione. L'addotto del tamoxifen con il recettore degli estrogeni ER α è ancora in grado di legarsi al DNA ma adotta una conformazione che impedisce il legame di altri cofattori e quindi inibisce la trascrizione dei fattori di proliferazione ER-dipendenti (figura). Alla fine degli anni 1990 è stato proposto per la prima

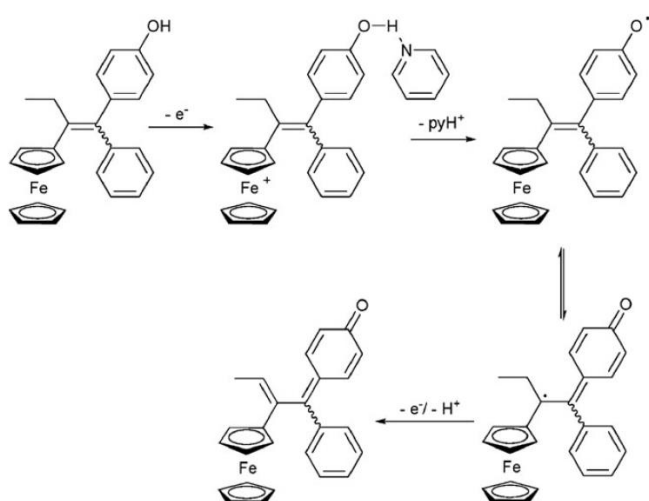
volta un approccio di tipo "inorganico" per cercare di migliorare questi farmaci, poi ripreso in



numerosi altri casi: la **sostituzione bioisosterica di anelli fenilici con ferrocene** (o con altri frammenti organometallici simili). In pratica un anello fenilico dell'idrossi-tamoxifen è stato sostituito da un ferrocene, creando il cosiddetto **ferrocifen** (figura), primo esempio di una serie di derivati di questo tipo. Il ferrocene è molto stabile, non altera la carica della molecola, tipicamente non introduce tossicità ed è molto lipofilo. I derivati ferrocenilici hanno dimostrato un'attività citotossica potente contro le linee cellulari del tumore al seno ma significativamente diversa rispetto al composto originale. Infatti, mentre il tamoxifen è attivo soltanto verso quelle linee cellulari di tumori al seno che sovra-esprimono il recettore per l'estrogeno, cioè quelli $ER\alpha+$ (circa 2/3 del totale), i ferrocifen sono attivi verso le linee $ER\alpha+$ **ma anche** verso quelle che non esprimono il recettore, cioè le $ER\alpha-$.



Quindi l'introduzione del frammento metallico permette, in linea di principio, di ampliare lo spettro di azione del farmaco e di superare il problema della resistenza acquisita al tamoxifen che a volte i tumori presentano. Il meccanismo d'azione proposto prevede che avvenga il *docking* del frammento organico del ferrocifen nel recettore, come per il tamoxifen, ma che questo sia accompagnato anche da processi redox reversibili a carico dell'unità ferrocene, due ossidazioni mono-elettroniche



successive che trasformano il gruppo fenolico in un *para* chinone-metide (figura), che è poi in grado di formare addotti con nucleofili biologici. Evidentemente questo meccanismo di extra-citotossicità dipende molto dalle proprietà redox dell'unità ferrocenica e quindi in questo caso il metallo svolge un ruolo nell'attività del composto anche senza coordinarsi direttamente al recettore. A riprova della validità dell'ipotesi "ossidazione del ferrocene" sono stati preparati gli analoghi composti con il rutenocene al posto del ferrocene. Anch'essi possiedono un'elevata affinità per il recettore dell'estrogeno $ER\alpha$ ma, al contrario dei ferrocifen, sono risultati attivi soltanto verso le cellule di adenocarcinoma

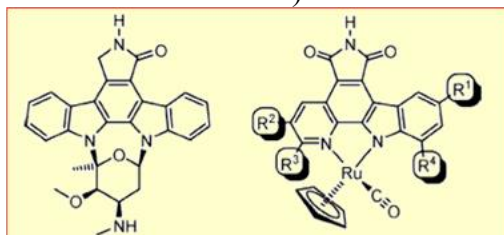
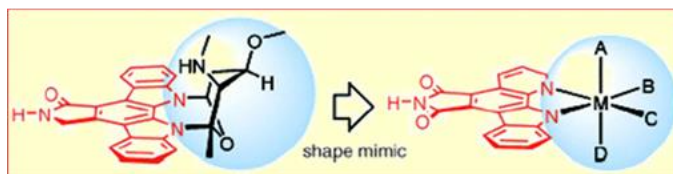
umano ormone-dipendente, cioè $ER\alpha+$, e non verso quelle $ER\alpha-$. Questa differenza è stata attribuita al fatto che i rutenoceni hanno un potenziale redox molto diverso dai ferroceni, e danno una ossidazione irreversibile da Ru(II) a Ru(III).

Inibitori di protein-chinasi

Le protein-chinasi sono degli enzimi che modificano altre proteine aggiungendo gruppi fosfato (fosforilazione) derivanti da ATP. La fosforilazione di solito induce delle variazioni funzionali nella proteina substrato (e.g. variazione di attività enzimatica, localizzazione cellulare, associazione con altre proteine...). Si valuta che fino al 30% delle proteine vengano modificate dalle protein-chinasi, cioè fungano da loro substrato. Quindi esse regolano molti aspetti della vita cellulare, soprattutto a livello di trasduzione dei segnali, e alterazioni nel loro funzionamento sono causa di numerose malattie. Quindi le protein-chinasi rappresentano un importante bersaglio terapeutico. Ci sono già una decina di inibitori di chinasi approvati per l'uso clinico e diverse altre decine sono in fasi più o meno avanzate di sviluppo, compresi numerosi studi clinici. Quella delle protein-chinasi è una delle famiglie di enzimi più vaste: il genoma umano codifica ben 538 protein-chinasi, il cosiddetto *human*

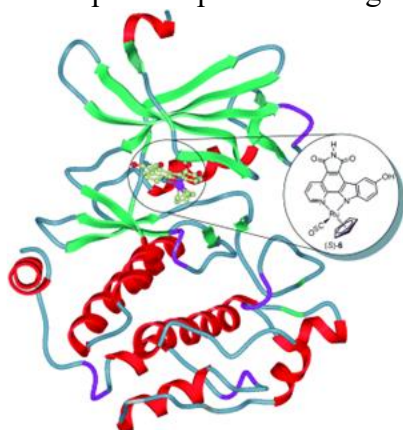
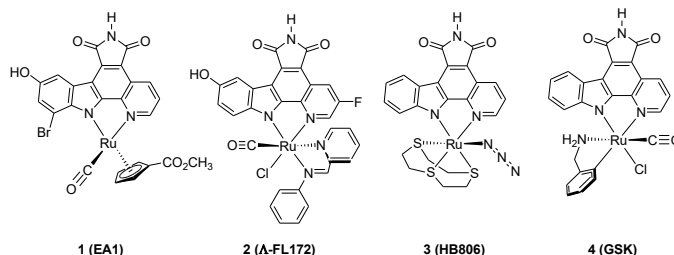
kinome (la sua codifica occupa circa il 2% dell'intero genoma umano), e tutte hanno un sito di *binding* dell'ATP molto ben conservato. La maggior parte degli inibitori si legano, tramite legami a idrogeno e interazioni idrofobiche, proprio nel sito di *binding* dell'ATP. Modulando tali interazioni si varia l'affinità dell'inibitore e la sua selettività. Infatti, la maggior difficoltà è proprio quella di sviluppare degli **inibitori selettivi** per un numero ristretto di chinasi.

La staurosporina è un inibitore naturale delle protein-chinasi con una struttura globulare: è formata da una parte aromatica (un indolocarbazolo), planare, che si "infiltra" nel sito di *binding* dell'enzima (al posto dell'adenina dell'ATP) formando due legami

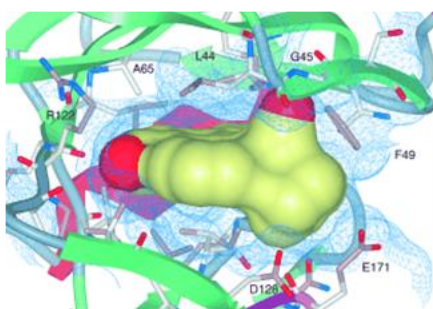


a idrogeno, e da una parte "tridimensionale", un carboidrato, che "mima" il ribosio dell'ATP ed è responsabile di interazioni secondarie, deboli ma fondamentali, nel sito. All'inizio degli anni 2000 è stato proposto un nuovo approccio allo sviluppo di inibitori selettivi, con l'idea di creare degli analoghi "inorganici" della staurosporina (figura): la parte aromatica,

opportunamente modificata ma sempre in grado di dare i necessari legami a idrogeno nel sito di *binding*, diventa il legante di un composto organometallico altamente stabile e inerte, che con gli altri leganti "mima" la parte tridimensionale della staurosporina (difficile da mimare tramite sintesi organica). Per la parte tridimensionale sono stati scelti dei leganti particolarmente forti e in grado di dare interazioni sostanzialmente idrofobiche, CO e ciclopentadienile. I vantaggi di questo approccio sono che i composti inorganici offrono una grande varietà strutturale, dando accesso a una stereochimica ben più ampia e variegata rispetto alle



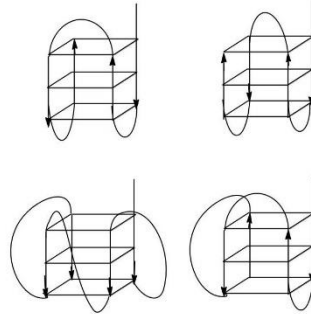
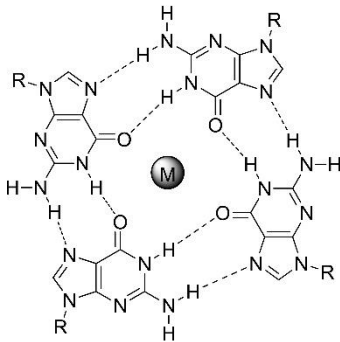
molecole organiche, le procedure sintetiche sono semplici e ben sviluppate e, scegliendo opportunamente i leganti, i composti sono stabili in condizioni fisiologiche, anche in presenza di concentrazioni millimolari di tioli e infine la loro tossicità è solitamente modesta. Variando i leganti è stato possibile modulare le interazioni col sito attivo e così sviluppare degli inibitori con affinità estremamente elevata (nano- e addirittura pico-molare) e con ottima selettività, tanto che alcuni



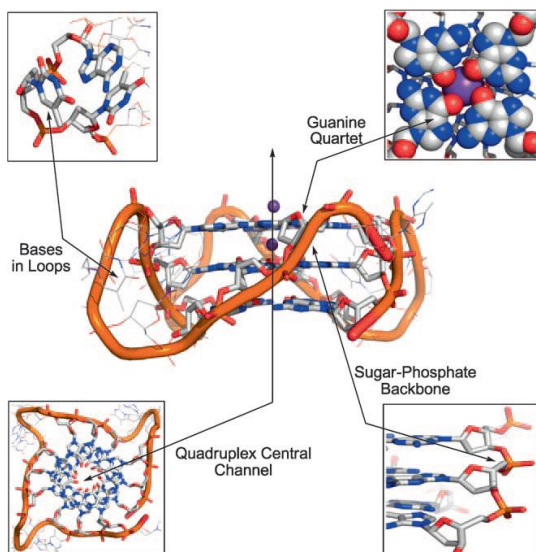
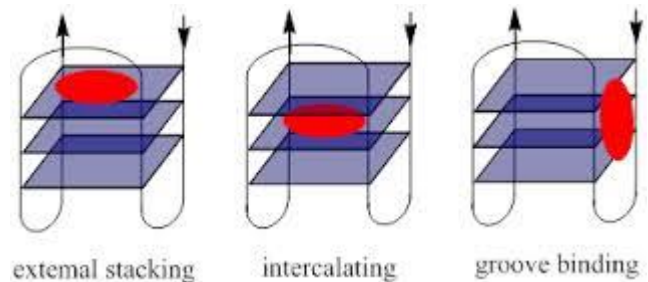
sono disponibili commercialmente per usi biochimici. Alcuni dei complessi, con l'indicazione della specifica protein-chinasi che inibiscono, sono riportati in figura. Le figure successive mostrano la struttura ai raggi X dell'addotto fra la protein-chinasi Pim-1 e un complesso di Ru(II); come si vede il composto rimane intatto, non viene rilasciato nessun legante (cioè conferma che il metallo ha soltanto un ruolo di "impalcatura" inerte per disporre spazialmente i leganti), ed è inserito nel sito di *binding* dell'ATP con il legante planare mentre la parte "organometallica", cioè il CO e il Cp danno al composto un ottimo **fit stereo-elettronico** con la tasca del sito. Oltre a composti di Ru(II), sono stati sviluppati anche composti di altri ioni metallici inerti, come Pt, Os, Rh e Ir.

In alcuni casi si è anche dimostrato, sia *in vitro* che in embrioni di pesce-zebra (*zebra-fish*), che l'inibizione di specifiche protein-chinasi con i complessi metallici porta a interessanti conseguenze fisiologiche (e.g. attività citotossica su cellule tumorali *in vitro*).

Inibitori della telomerasi



La telomerasi è una ribonucleoproteina, cioè un'associazione fra acido ribonucleico e una proteina, che ha attività di DNA-polimerasi e ha la funzione di aggiungere unità esameriche d(TTAGGG) alla parte 3'-terminale del telomero di DNA, mantenendone inalterata la lunghezza. Nelle cellule eucariote il telomero è una regione del DNA, formata da un singolo filamento composto da tali sequenze ripetitive (100 – 200 basi), situata alla fine dei cromosomi ed ha la funzione di proteggere la fine del cromosoma dal deterioramento o dalla fusione con cromosomi adiacenti. La telomerasi è una trascrittasi inversa che usa il proprio RNA per ibridizzarsi alla parte 3'-terminale del telomero di DNA e sintetizzare sequenze d(TTAGGG) aggiuntive. Queste sequenze di DNA del telomero (singolo filamento) ricche di guanine si auto-assemblano, con interazioni di legame a idrogeno $G \cdots G$ sia di tipo Watson-Crick che Hoogsteen, in una struttura intramolecolare non canonica (rispetto alla canonica doppia elica del b-DNA) chiamata **G-quadruplex** che contiene due o più tetradi di guanine (*G-quartets* o *G-tetrads*) sovrapposte, ognuna stabilizzata da un catione potassio o sodio posto al centro (figura). Sono possibili molti tipi di *stacking* di questi tetrameri (fra loro polimorfi, figura sopra), anche di tipo inter-molecolare, fra due o più filamenti singoli diversi. In generale, i *G-quadruplex* non sono esclusiva dei telomeri, ma vi sono molte sequenze ricche di guanine nel genoma che, in linea di principio, potrebbero dare origine a questo tipo di struttura (vedi anche dopo). La telomerasi è attiva nelle cellule staminali, ma è normalmente assente nella maggior parte delle cellule somatiche, cioè differenziate. I telomeri costituiscono una sorta di orologio biologico delle cellule: in assenza dell'azione della telomerasi, essi si accorciano progressivamente ad ogni divisione cellulare finché la parte terminale del cromosoma raggiunge il cosiddetto "limite di Hayflick" (cioè il numero



massimo di divisioni cellulari, circa 50, a cui possono andare incontro le cellule somatiche), dopo il quale la cellula diventa senescente o inizia il processo di apoptosi. Si è trovato che la telomerasi è un enzima cruciale per la **progressione tumorale**: si è visto che essa è sovra-espressa in almeno l'85% dei tumori e la sua azione rende le cellule tumorali essenzialmente immortali. Per questo motivo negli ultimi anni la ricerca ha puntato a sviluppare degli **inibitori selettivi della telomerasi**. Inoltre, come già accennato, i *G-quadruplex* non sono un'esclusiva dei telomeri, ma si trovano anche in altre regioni del genoma, in particolare nella regione cosiddetta *promoter* di numerosi oncogeni (e.g. *c-myc* e *c-kit*). Anche in questo caso, ovviamente, la loro inibizione selettiva sarebbe molto vantaggiosa in quanto permetterebbe di regolare la loro trascrizione.

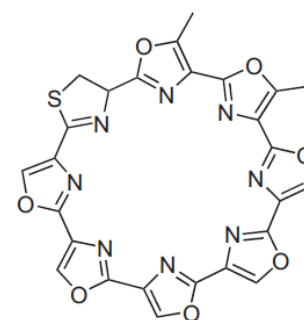
Nel 2024 è stato approvato dalla FDA un farmaco inibitore della telomerasi, **Imetelstat** (Rytelo™), per il trattamento di alcuni tumori del sangue. Imetelstat è un oligonucleotide che inibisce la telomerasi legandosi direttamente alla regione della proteina che si lega ai telomeri.

Un **modo indiretto** per inibire la telomerasi è quello di stabilizzare il suo substrato, cioè i *G-quadruplex*. Composti che abbiano una elevata affinità per i *G-quadruplex* e li stabilizzino tramite interazioni aggiuntive impediscono il legame della telomerasi al filamento singolo di DNA e quindi ne inibiscono l'azione e cioè l'aggiunta di ulteriori sequenze d(TTAGGG). In base a numerosi studi cristallografici e di spettroscopia NMR sono stati individuati almeno due principali tipi di *binding* per i leganti che stabilizzino i *G-quadruplex*. Il più comune è lo *stacking* terminale del legante sulla tetrate di guanine terminali o fra le ultime due. Altri siti di legame sono definiti dalle altre nucleobasi che definiscono i solchi (*grooves*) e i *loops* del filamento di DNA, dal *backbone* di fosfati o dal canale centrale. La figura (pagina prima) illustra le caratteristiche strutturali di un *G-quadruplex* che possono essere sfruttate per il *binding* di piccole molecole. Da notare che l'intercalazione è un tipo di *binding* non particolarmente favorevole, in quanto intrinsecamente poco selettivo poiché può avvenire anche con il DNA a doppia elica, mentre lo *stacking* terminale è tipico del *G-quadruplex*.

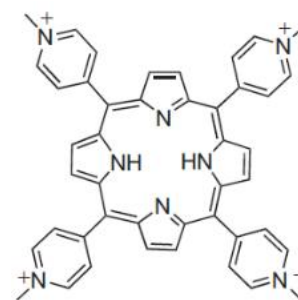
La **telomestatina**, un prodotto naturale isolato da uno streptomiceto, è uno degli inibitori della telomerasi più forti e più specifici finora riportati (IC₅₀ ca. 1 μM). La telomestatina ha dimensioni simili a quelle di una tetrate di guanine, si lega a svariati *G-quadruplex* con affinità buona anche se non elevatissima (costante di dissociazione K_d ca. 30 nM), e presenta una buona selettività per i *G-quadruplex* intramolecolari rispetto a quelli intermolecolari e ha un'affinità 70 volte inferiore per il DNA a doppia elica. Recentemente è stata descritta una procedura per la sintesi della telomestatina, ma si sa molto poco delle proprietà chimico-fisiche e strutturali rilevanti ai fini della sua interazione col DNA e della sua attività farmacologica. Probabilmente a causa delle difficoltà sintetiche per la preparazione di questo macrociclo altamente *constrained*, non sono noti derivati che possano consentire una correlazione struttura-attività.

Sono state progettate e sviluppate numerose piccole molecole in grado di legarsi selettivamente e con elevata affinità ai *G-quadruplex* del DNA telomerico e quindi stabilizzarli e inibire la telomerasi. Esse tipicamente possiedono delle caratteristiche comuni: *i*) una larga porzione aromatica, possibilmente **elettron-povera**, per massimizzare le interazioni di *stacking* π con la superficie del quartetto; *ii*) una carica positiva per interagire favorevolmente con la carica negativa dei gruppi fosfato del filamento di DNA; *iii*) diverse funzionalità nelle catene laterali per poter introdurre gruppi funzionali specifici, preferenzialmente con cariche positive, per aumentare le interazioni con la varie parti del *quadruplex* (singole basi, *groove*, *loops*). La maggior parte dei leganti "classici" sono dei composti etero-aromatici puramente organici. Sebbene poche di queste molecole siano state saggiate su linee cellulari (oltre che con il DNA *in vitro*) e ancora meno abbiano raggiunto la fase di investigazione clinica (almeno due composti sono arrivati in fase 2), si è verificato sperimentalmente che molecole in grado di stabilizzare i *G-quadruplex* effettivamente inibiscono l'attività della telomerasi e (in certi casi), quando applicati alle cellule, possono indurre apoptosi o senescenza replicativa.

Un tipico esempio di legante dei *G-quadruplex*, molto studiato, è la porfirina tetra-cationica TmPyP4, che inibisce la telomerasi a concentrazioni micromolari (IC₅₀ ~ 0.7-10 μM). Si hanno evidenze sperimentali che tanto lo *stacking* di questa molecola planare con il *G-quadruplex* che l'interazione coulombiana sono entrambi importanti. Tuttavia, questa porfirina è altamente tossica *in vivo* e inoltre si lega a varie altre forme di DNA con affinità simile e quindi non può essere considerata un legante selettivo per i *G-quadruplex*. Allungando le catene dei gruppi

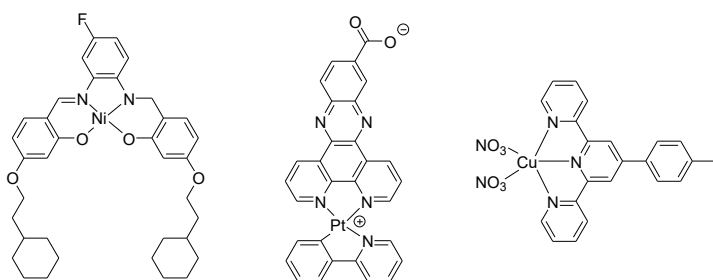


Telomestatin



TmPyP4

periferici positivi, permettendogli così di interagire con i gruppi fosfato del *backbone*, si è raggiunta una discriminazione fra *G-quadruplex* e DNA doppia elica fino a 4 ordini di grandezza.

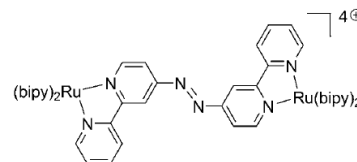


Sono stati sviluppati anche numerosi complessi di metalli di transizione (senza contare le metallo-porfirine o altri macrocicli), sia planari che non, sia mono- che poli-nucleari, tipicamente con chelanti polidentati aventi sistemi π estesi, come potenziali leganti per *G-quadruplex* e quindi inibitori della

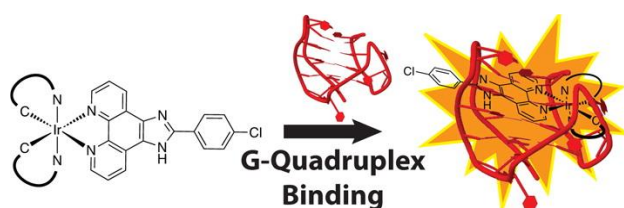
telomerasi. Alcuni esempi sono riportati in figura; in questo caso è spesso il metallo che impone la geometria planare al chelante polidentato, quindi ha un ruolo strutturale fondamentale. Fra i potenziali vantaggi dei composti di coordinazione: *i*) consentono di introdurre una geometria planare quadrata o comunque geometrie diverse da quelle delle molecole organiche; *ii*) consentono una **sintesi modulare**, relativamente semplice, dando facile accesso a piccole librerie di composti affini; *iii*) infine, il metallo può accrescere il carattere elettrone-accettore della molecola. Nella maggior parte dei casi questi complessi metallici si legano ai *G-quadruplex* tramite *stacking* terminale, come le porfirine, ma alcuni possono interagire anche con modalità alternative (o aggiuntive), ad esempio interagendo direttamente con le nucleobasi dei *G-quadruplex*. Per esempio, si è visto che il cisplatino causa l'*unfolding* dei *G-quadruplex*, presumibilmente perché riesce a platinare più facilmente le guanine dei quartetti, più esposte, rispetto a quelle della doppia elica. Anche se il cisplatino causa la destabilizzazione dei *G-quadruplex*, tuttavia inibisce la telomerasi perché essa non riesce a riconoscere il filamento platinato.

In generale, nonostante i vari esempi riportati, uno dei maggiori limiti per la validazione dei *G-quadruplex* come un nuovo *target* per farmaci antitumorali è la mancanza di piccole molecole che siano in grado di legarsi con affinità elevata ($K_d < 1$ nM) e con alta specificità (l'affinità per le altre forme di DNA dovrebbe essere almeno 10.000 volte inferiore). Anticorpi che riconoscono specificamente i *G-quadruplex* recentemente sviluppati *in vitro* potrebbero rivelarsi un utile strumento per la validazione di questo *target*. Infatti, non bisogna trascurare il fatto che molti dei leganti sviluppati per i *G-quadruplex* possono interagire anche con molte altre strutture del DNA, e quindi non si può escludere che vi siano meccanismi alternativi per spiegare gli effetti biologici osservati.

Infine, un'area di fortissimo interesse è quella del **sensing dei *G-quadruplex***, cioè l'individuazione di molecole che cambino specificamente le loro proprietà ottiche in seguito ad interazione con i *G-quadruplex*, e che quindi possano essere usate come probe luminescenti. Idealmente esse dovrebbero essere in grado non solo di individuare la presenza di *G-quadruplex*, ma anche di identificare il tipo di polimorfo. A questo scopo vengono studiati attivamente anche composti metallici. Ad esempio, il colore del complesso dinucleare di Ru(II) riportato in figura in presenza di *G-quadruplex* telomerico cambia immediatamente da viola a blu, probabilmente perché l'interazione col *G-quadruplex* induce una variazione dell'intorno dell'azo-gruppo. Un altro esempio è quello del complesso ciclo-metallato di Ir(III) riportato in figura,



che si lega ai *G-quadruplex* telomerici e di *c-myc* in stechiometria 1:1 con affinità micromolare e in seguito al legame presenta un aumento di luminescenza, con un comportamento che ricorda quello del *DNA light-switch* $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$.



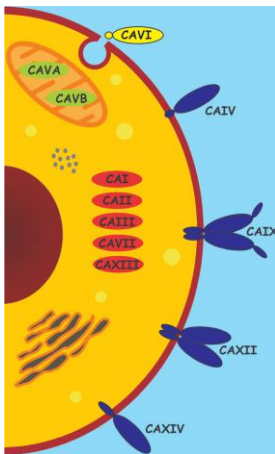
Inibizione di metallo-enzimi

La strategia in questo caso prevede il design di specifici leganti che abbiano dei gruppi funzionali periferici, cioè non impegnati per il legame col metallo, che possano legarsi specificamente allo ione

metallico del sito attivo, inibendo l'attività enzimatica. Il resto del complesso serve a modulare l'attività (e quindi l'affinità del complesso per il sito attivo) modulando il *fitting* stereo-elettronico con la *binding pocket* del sito attivo. Solitamente, ma non sempre, il metallo ha solo un ruolo strutturale e non interagisce direttamente con l'enzima bersaglio. Ovviamente è necessario conoscere la chimica del metallo nel sito enzimatico per poter sviluppare degli inibitori efficaci.

Inibitori della Anidraasi Carbonica

Le Anidraasi Carboniche (*Carbonic Anhydrases*, CAs) sono una famiglia di **zinco-enzimi** ubiquitari che catalizzano la rapida conversione di CO_2 a bicarbonato e protoni. Le anidraasi carboniche sono enzimi biologicamente molto importanti, che hanno un ruolo essenziale in processi come la fotosintesi (*uptake* efficiente di CO_2), la respirazione (rapida rimozione della CO_2) e nel controllo del pH (tamponi). Nei mammiferi si conoscono almeno 16 diverse isoforme di CA. Le forme cosiddette α - β - and δ -CAs contengono uno ione Zn(II) nel sito attivo. Tutte le anidraasi carboniche umane



appartengono alla classe α . Finora sono state identificate 12 isoforme cataliticamente attive che differiscono per attività catalitica, localizzazione a livello cellulare (e.g. citosol, mitocondri, trans-membrana) e per la distribuzione a livello di organi e tessuti. Nei globuli rossi umani, per esempio, una forma di anidraasi carbonica (CA II) è la proteina più abbondante dopo l'emoglobina. Inoltre, vi sono tre isoforme non catalitiche.

La figura mostra la localizzazione cellulare delle α -CA umane. Le CA sono coinvolte in una moltitudine di processi fisiologici e patologici cruciali. La loro inibizione è attualmente sfruttata, o si ritiene che potrebbe esserlo, per il trattamento di diverse patologie come glaucoma, epilessia e disordini neuromuscolari, obesità, osteoporosi, il morbo di Alzheimer, e numerosi tipi di tumori (e.g. hCA IX è sovra-espressa in numerosi tumori). Di conseguenza, lo sviluppo di specifici inibitori o attivatori per le varie isoforme di CA può

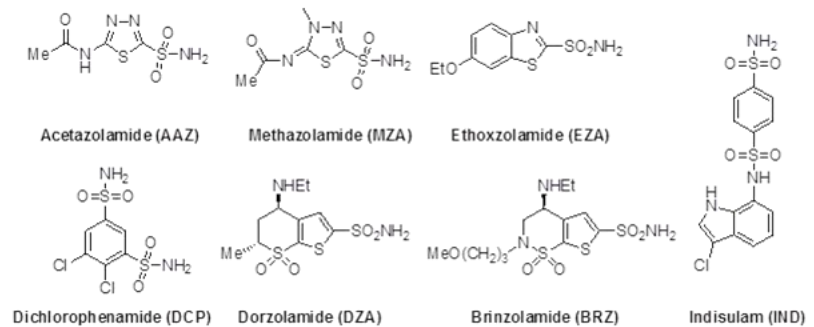
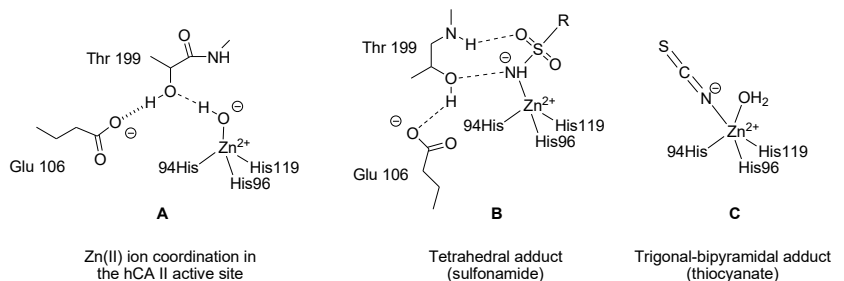
avere interessanti applicazioni biomediche. Per esempio, inibitori (organici) di CA sono già utilizzati

come diuretici, agenti anti-glaucoma e anti-epilettici. Come già detto, il sito attivo delle α CA è costituito da uno ione Zn(II) , posto al fondo di una cavità a forma di imbuto profonda 15 Å e con un'apertura alla superficie anche di 15 Å. Lo ione Zn(II) ha geometria tetraedrica: è coordinato a tre istidine della proteina, mentre il quarto legante, che occupa temporaneamente il sito di coordinazione del substrato (CO_2), può essere una molecola di acqua o un cloruro. Sono note due classi principali di inibitori delle CAs: anioni complessanti (e.g. azide, cianuro, tiocianato...) e sulfonamidi. Questi inibitori si legano allo Zn(II) nel sito attivo sostituendo il quarto legante generando un addotto tetra-coordinato stabile, oppure aggiungendosi alla sfera di coordinazione del metallo

generando una specie a geometria di bipiramide trigonale. La figura illustra il sito attivo dell'enzima e il sito con due diversi inibitori coordinati.

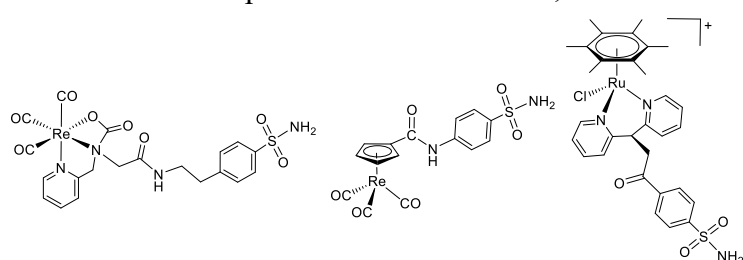
Sono stati sviluppati molti inibitori organici di CA, soprattutto sulfonamidi. Ad esempio, inibitori sulfonamidici come acetazolamide (AAZ), methazolamide (MZA), ethoxzolamide (EZA), dichlorophenamide (DCP) e Indusilam (IND)

(figura) sono usati per abbassare la pressione oculare nel trattamento del glaucoma, come diuretici o

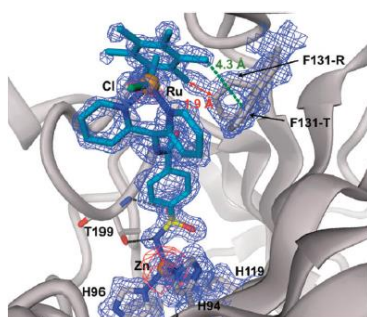


per altre patologie derivanti dal non corretto controllo dell'equilibrio acido/base. Dorzolamide (DZA) e brinzolamide (BRZ) sono più solubili in acqua (per via della protonazione del gruppo aminico secondario) e consentono un utilizzo topico.

Questi farmaci, pur essendo utilizzati da molti anni, presentano numerosi aspetti negativi, legati al fatto che non sono particolarmente selettivi, ma inibiscono CA anche in tessuti/organi diversi da quelli



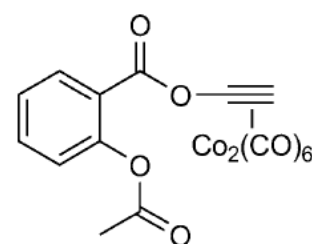
che sono il “bersaglio” del trattamento. L'approccio di tipo inorganico per cercare di **migliorare soprattutto la selettività** è simile a quello visto prima per le protein-kinasi, cioè si sono sviluppati dei complessi coordinativamente saturi e inerti che hanno una sulfonamide come legante



(naturalmente il gruppo sulfonamidico è rivolto verso l'esterno, deve legarsi allo zinco, non è utilizzato per la coordinazione al metallo) e gli altri leganti cercano di massimizzare le interazioni con la tasca del sito attivo, e di modulare altre proprietà (e.g. solubilità, capacità di penetrare le membrane,...) che possono consentire una migliore selettività. Alcuni esempi sono riportati nella figura. La figura successiva mostra la struttura ai raggi X di uno di questi inibitori, quello di Ru(II), legato al sito della hCA II: si vede che il complesso è intatto, che il legante sulfonamidico si lega allo Zn(II) e il legante aromatico forma un'interazione idrofobica con un amminoacido della tasca.

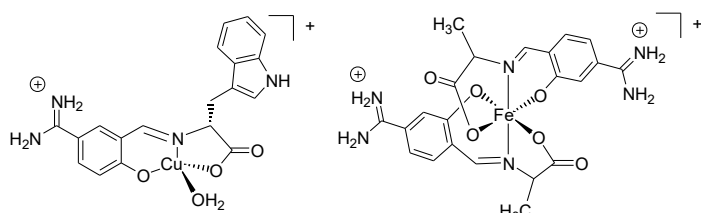
Inibitori delle ciclo-ossigenasi

Le ciclo-ossigenasi (Cyclooxygenases, COXs) sono degli enzimi che sovrintendono alla formazione di importanti mediatori biologici chiamati prostanoidi, che includono le prostaglandine, la prostaciclina e i trombociti. Due dei più noti farmaci sul mercato come anti-infiammatori e antidolorifici, cioè aspirina e ibuprofene, esercitano la loro attività tramite l'inibizione di ciclo-ossigenasi. Inoltre, entrambi appartengono alla classe dei farmaci anti-infiammatori non-steroidi, i cosiddetti NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*), che recentemente hanno dimostrato di possedere un effetto positivo per la prevenzione del cancro: in pratica i pazienti affetti da tumore che assumano per lungo tempo aspirina o altri NSAIDs hanno minore rischio di recidive. Di recente si è visto che il composto organometallico dicobalto-esacarbonile ($\text{Co}_2(\text{CO})_6$) coordinato tramite una funzione alchonica a un legante derivato dall'aspirina è – come i NSAIDs – un potente inibitore degli enzimi COX-1 e COX-2, ed ha anche proprietà antitumorali *in vitro*. A causa della sua elevata stabilità, si ritiene che la specie attiva sia effettivamente l'intero composto organometallico, cioè – anche in questo caso – si ritiene che il metallo non dia alcuna interazione diretta con l'enzima.



Inibitori di tripsina e tripsina

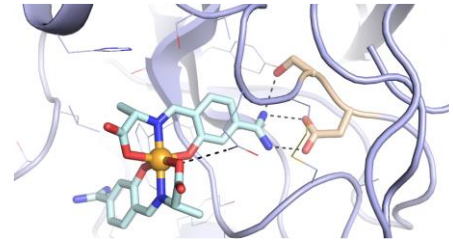
Tripsina e tripsina sono entrambe delle serin-proteasi (o **proteasi a serina**), cioè enzimi che



idrolizzano legami peptidici nelle proteine e hanno la serina come amminoacido essenziale nel loro sito attivo. La sintesi di inibitori specifici di questi due enzimi è molto rilevante, in particolare nel caso della tripsina essi sarebbero degli agenti

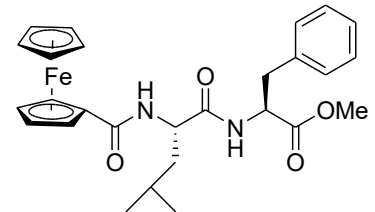
con azione anti-trombotica. È noto che derivati amidinici e guanidinici possono essere dei potenti inibitori di questo tipo di enzimi e studi di cristallografia ai raggi X hanno dimostrato che l'inibizione deriva dalla forte interazione tra il gruppo cationico amidinico o guanidinico dell'inibitore e il

carbossilato (anionico) di Asp189 nel sito specifico S1 della tripsina o di altri enzimi simili. In base a queste conoscenze, sono stati sviluppati – come potenziali inibitori della trombina – dei complessi di Cu(II) e Fe(III) (figura) che hanno come leganti delle basi di Schiff chelanti che recano in posizione periferica un gruppo guanidinio. Il complesso di rame inibisce la trombina a concentrazioni nanomolari, paragonabili a quelle del farmaco Argatroban usato in clinica. Dalle strutture ai raggi X della tripsina bovina cristallizzata con i complessi inibitori si vede che, mentre quello di ferro si comporta come atteso, cioè il metallo ha solo un ruolo strutturale e il gruppo cationico amidinico forma legami a idrogeno con il carbossilato di Asp189 nel sito S1 della tripsina (figura), quello di rame presenta ulteriori interazioni: il rame si coordina direttamente a un'istidina presente nel sito, cambiando geometria da tetraedrica a piramidale quadrata.

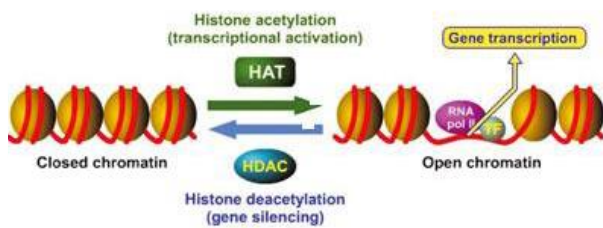


Inibitori di proteasi alla cisteina

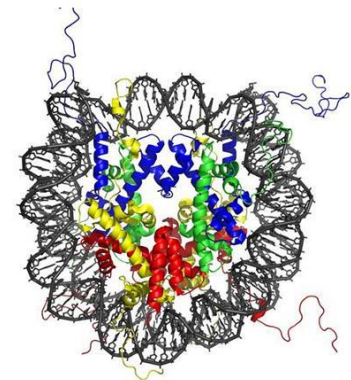
La papaina è una proteasi alla cisteina. Nei mammiferi le proteasi alla cisteina, quali catepsine, caspasi e calpaine, sono coinvolte in molti processi metabolici cellulari importanti. Come suggerisce il loro nome, e in contrasto alla famiglie delle proteasi a serina, esse hanno una cisteina nel sito attivo con un ruolo essenziale per la proteolisi catalitica del legame peptidico. Il loro malfunzionamento è stato collegato a numerose patologie, rendendole dei target interessanti per lo sviluppo di nuovi farmaci. Ad esempio, un campo molto attivo è quello dello sviluppo di inibitori selettivi per la catepsina-B, un'enzima implicato nella progressione dei tumori, nell'angiogenesi e nell'artrite. Fra i molti composti metallici che hanno attività inibitoria verso questi enzimi, ma per i quali il meccanismo è spesso oscuro, riportiamo un ulteriore esempio di sostituzione bioisosterica di anelli fenilici con ferrocene. L'esempio riguarda la **papaina**, una proteasi a cisteina di origine vegetale che presenta molte similitudini con le catepsine. La figura mostra un noto inibitore peptidico della papaina, derivatizzato con un gruppo ferrocene.



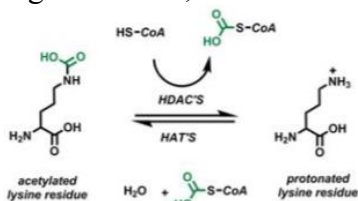
Inibitori di istone-deacetilasi



Gli **istoni** sono delle proteine che costituiscono il 90% della componente strutturale della **cromatina**, la

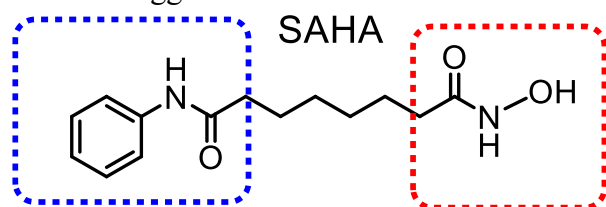


macromolecola responsabile del *package* del DNA nelle cellule. Essi contengono circa il 20% di aminoacidi con catena laterale basica, in particolare lisina e arginina, e sono quindi proteine basiche e cariche positivamente; per questo interagiscono con il DNA che è carico negativamente, formando delle strutture dette **nucleosomi** (figura).



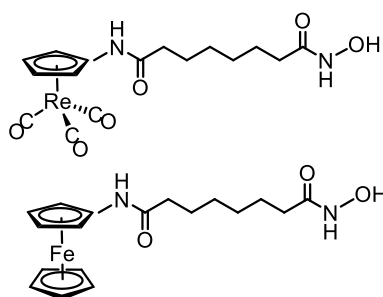
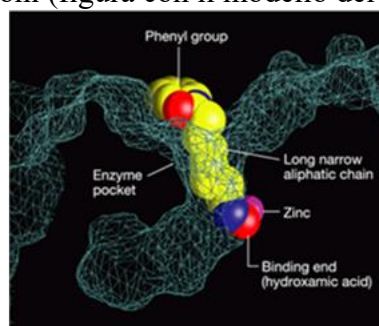
Negli eucarioti il DNA è avvolto sugli istoni formando i nucleosomi, il cui insieme è la **cromatina**. Ogni nucleosoma contiene quattro coppie di istoni e il DNA che li avvolge conta 145–147 coppie di basi. Gli enzimi istone-deacetilasi (*Histone Deacetylase*, HDAC) catalizzano la rimozione di gruppi acetile da residui di lisina: in pratica la deacetilazione fa aumentare la carica positiva degli istoni e induce la “chiusura” della cromatina, e quindi il silenziamento dei geni (figura). Il ruolo opposto, che porta alla trascrizione, è svolto dagli enzimi HAT, *Histone Acetylase* (figura). Gli HDAC hanno dunque un ruolo molto importante nella regolazione dell'espressione dei geni. È evidente che anche questi

enzimi HDAC e HAT sono dei potenziali target farmacologici, essendo direttamente collegabili all'*upregulation* o *downregulation* di geni e quindi di proteine. Ad esempio, gli HDAC regolano anche l'espressione e l'attività di molte proteine correlate allo sviluppo e alla progressione del cancro. In particolare, è stato dimostrato che HDAC7, localizzato nella membrana mitocondriale interna, svolge un ruolo importante nella proliferazione delle cellule tumorali e nel regolare l'apoptosi (morte cellulare). Di conseguenza, alcuni inibitori di HDAC (**HDACi**) costituiscono una classe di potenti agenti antitumorali. Gli HDACi possono riattivare l'espressione di geni e inibire la crescita e la sopravvivenza di cellule tumorali a concentrazioni non-tossiche. Sono stati condotti (o sono in corso) più di 350 studi clinici con inibitori di HDAC, e un acido idrossamico, il *suberoylanilide hydroxamic acid* (**SAHA**, figura), è stato approvato dall'FDA nel 2006 (USA *trade name* Zolinza®) per il trattamento di pazienti affetti da linfoma cutaneo (*cutaneous T-cell lymphoma*, CTCL). Si ritiene che in genere gli HDCA siano degli zinco-enzimi. HDAC8 è l'istone-deacetilasi meglio caratterizzata ed è generalmente classificata come uno zinco-enzima, anche se il suo sito di legame, formato da due aspartati e un'istidina è inusuale per lo zinco. SAHA è formato da una benzamidina, che costituisce la parte che riconosce la superficie della proteina, un *linker* alchilico flessibile C7 e da un acido idrossamico che va a legarsi allo zinco nel sito attivo. L'interazione è stata confermata da varie strutture ai raggi X di SAHA coordinato a diversi tipi di istoni (figura con il modello del docking).



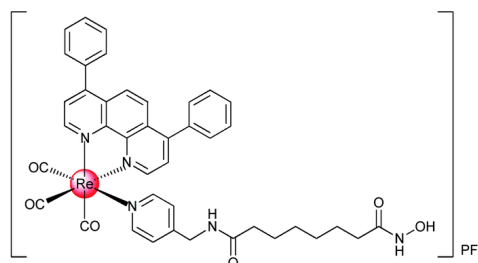
aromatic protein
recognition domain

hydroxamic acid
Zn²⁺ binding site

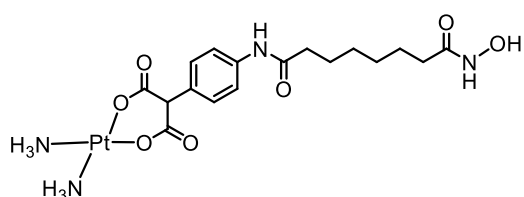


Dal punto di vista della chimica inorganica sono stati seguiti sostanzialmente due approcci per cercare di migliorare questi farmaci. Il primo approccio è simile a quello descritto in precedenza per gli inibitori della CA, cioè introdurre dei frammenti organometallici tipo ferrocene al posto della parte aromatica di SAHA o altri inibitori simili, per modulare il riconoscimento con l'enzima. Con questa logica sono stati introdotti il frammento CpRe(CO)₃ e il ferrocene, Cp₂Fe. Due esempi sono riportati in figura; entrambi i composti, similmente a

SAHA, inibiscono HDAC a concentrazioni nanomolari, sono citotossici verso numerose linee cellulari tumorali (anche se un po' meno del SAHA) e, secondo studi di *docking*, interagiscono con gli HDAC come atteso, con il gruppo metallorganico che si accomoda in una tasca dell'enzima vicina allo zinco che è piuttosto flessibile e si può adattare alle strutture di leganti diversi. In un altro esempio SAHA è stato "trasformato" in un legante, sostituendo il fenile terminale con un anello piridinico, e coordinato a un composto fosforescente di Re(I) (figura). Si è visto (tramite fluorescenza) che il composto, molto lipofilo, si localizza nei mitocondri dove inibisce



gli HDAC ivi presenti. Ancora un altro approccio è stato quello di coordinare SAHA, tramite un gruppo malonato, a un frammento tipo carboplatino (figura), con l'idea che i due frammenti, una volta dissociati (come nel carboplatino), possano svolgere nel nucleo un'azione combinata, uno sul DNA e l'altro sugli HDAC. In effetti



si è verificato che il composto si lega al DNA in maniera simile al carboplatino (quindi avviene l'idrolisi del malonato), tuttavia in un test *in vitro* (non nelle cellule) l'ibrido è risultato circa 100 volte meno attivo del SAHA. Inoltre, i test di citotossicità *in vitro* non hanno evidenziato alcun effetto sinergico o di aumentata attività. In un approccio simile, l'**acido valproico** (VA), un altro potente inibitore di HDAC appartenente alla classe di inibitori degli acidi grassi a catena corta, è stato usato come legante assiale di un complesso di Pt(IV): la riduzione a Pt(II) genererebbe il cisplatino e due equivalenti di VA, con un'ipotetica azione combinata.

Da sottolineare infine che la strategia qui illustrata, che cerca di influire sul comportamento degli istoni, rientra in quella che si chiama **modulazione epigenetica**, cioè interventi che variano l'espressione genica pur non interagendo direttamente col DNA (come per esempio il cisplatino), ossia interventi che influenzano il fenotipo senza alterare il genotipo.

