



NUOVI ANTIVIRALI PER COMBATTERE CORONAVIRUS UMANI

La ricerca, che ha ottenuto il “Premio Divisione Chimica Farmaceutica 2024”, ha riguardato lo sviluppo di nuovi derivati eterociclici come agenti antivirali ad ampio spettro attivi su Coronavirus umani. Il lavoro di ricerca ha consentito di identificare inibitori di nsp13, proteina virale essenziale ed altamente conservata, confermandone il ruolo chiave per lo sviluppo di nuove efficaci strategie terapeutiche.

L'attività di ricerca per la quale ho ricevuto il “Premio Divisione Chimica Farmaceutica 2024” riguarda il lavoro svolto nel corso della mia carriera scientifica, incentrato principalmente sullo sviluppo di agenti antivirali. In particolare, sono state insignite come rilevanti nell'ambito della Chimica Farmaceutica le attività riguardanti la progettazione e la sintesi di nuovi eterocicli come potenziali agenti antivirali attivi nei confronti di virus respiratori emergenti, soprattutto Coronavirus umani (hCoV). Tali attività sono state svolte con il mio gruppo di ricerca, guidato dai Proff. Roberto Di Santo e Roberta Costi, presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco dell'Università “La Sapienza” di Roma.

Gli hCoV sono virus respiratori emergenti, tristemente noti per aver causato vari eventi epidemici (come quella da sindrome respiratoria acuta grave da Coronavirus (SARS-CoV) in Cina e da sindrome respiratoria acuta medio-orientale da Coronavirus (MERS-CoV) in Medio Oriente) o pandemici (come quella causata da SARS-CoV-2, diffusosi rapidamente a livello globale a partire dal 2019) [1]. Quest'ultima, in particolare, ha avuto conseguenze devastanti, evidenziando la necessità urgente di sviluppare terapie efficaci per contrastare sia questo virus che eventuali future varianti o nuovi hCoV emergenti o riemergenti [2].

Tuttavia, la progettazione di *small molecules* contro gli hCoV presenta sfide significative, tra cui l'elevata trasmissibilità, l'alta variabilità genetica dei

virus, nonché l'insorgenza di resistenze. Basti pensare, infatti, che ancora oggi non esiste una terapia farmacologica specifica efficace per il trattamento dell'infezione da SARS-CoV-2 (anche a causa dei vari limiti che caratterizzano i farmaci attualmente

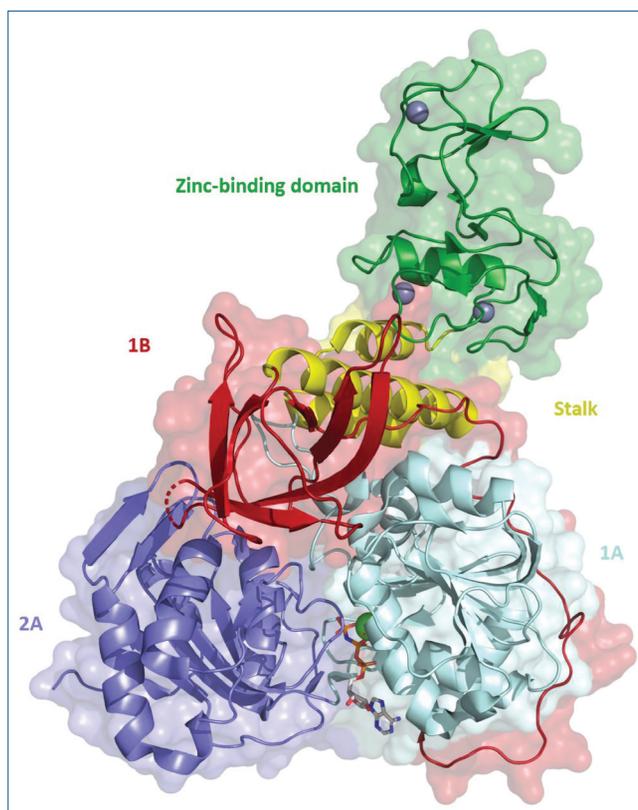


Fig. 1 - Struttura di nsp13 di SARS-CoV-2 (codice PDB: 7NN0)

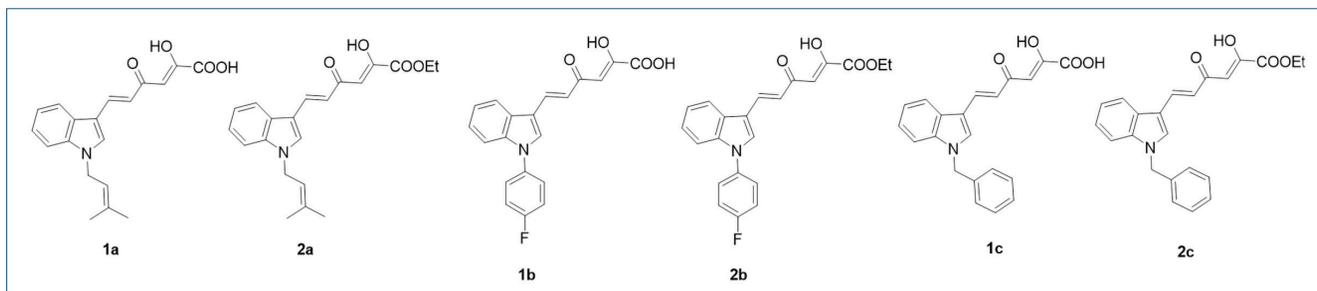


Fig. 2 - Strutture dei derivati indolil-DKA **1a-c** e **2a-c** identificati come inibitori di nsp13 di SARS-CoV-2

impiegati nella pratica clinica, riguardanti principalmente l'efficacia, gli effetti avversi e la via di somministrazione) [3]. Per questo motivo, è fondamentale sviluppare nuovi agenti antivirali efficaci. A tal fine è sicuramente utile esplorare nuove frontiere terapeutiche, concentrando la propria attenzione su target virali altamente conservati che consentano lo sviluppo di antivirali ad ampio spettro. Tra questi, un target molto promettente è la proteina non-strutturale 13 (nsp13) (Fig. 1).

Nsp13 svolge numerose funzioni: utilizzando l'energia ottenuta dall'idrolisi dell'ATP, catalizza lo svolgimento dell'acido nucleico in direzione 5'-3'; interagisce con la polimerasi virale (nsp12) formando il complesso di replicazione-trascrizione; infine, ha un'attività 5' trifosfatase necessaria per il processo di capping all'estremità 5' dell'RNA [4]. Nonostante il ruolo primario dell'enzima nsp13 nella replicazione e nel ciclo replicativo di SARS-CoV-2, esso attualmente non è bersaglio di nessun farmaco in commercio con questo utilizzo terapeutico. Esistono però, ad oggi, farmaci attualmente in fase di sperimentazione per il trattamento del virus dell'herpes simplex e del virus dell'epatite C [5].

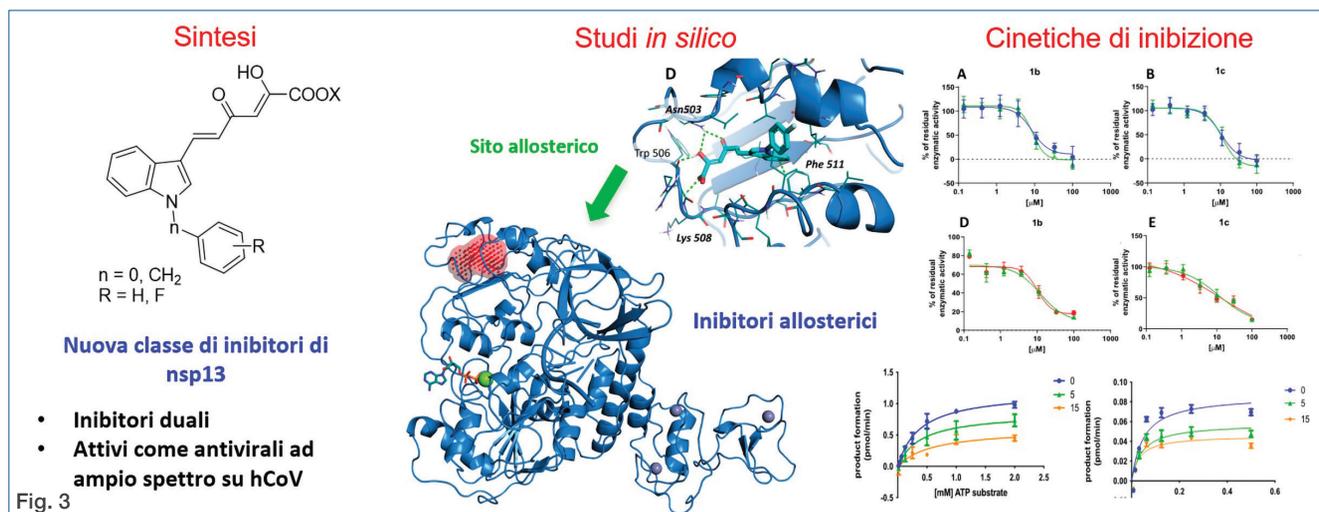
Inoltre, nsp13 costituisce la proteina non-strutturale più altamente conservata tra gli hCoV umani. Basti pensare, ad esempio, che dei 601 amminoacidi che compongono nsp13 di SARS-CoV e SARS-CoV-2, solo uno è diverso. È noto, infatti, che la sequenza amminoacidica primaria della proteina in SARS-CoV e SARS-CoV-2 condivide un'identità di sequenza del 99,8% e una similarità di sequenza del 100% [6]. Grazie a questa elevata somiglianza strutturale, inibitori in grado

di legarsi a motivi strutturali altamente conservati di nsp13 potrebbero avere un'interessante attività anche nei confronti di forme di hCoV emergenti. Pertanto, diverse molecole caratterizzate da attività inibitoria nei confronti di nsp13 di SARS-CoV sono state successivamente testate su nsp13 di SARS-CoV-2, ottenendo promettenti risultati. Tra questi, risultati incoraggianti sono stati osservati con una serie di derivati aril dichetoacidi (DKA), che hanno riportato attività inibitoria nei confronti dell'attività elicastica di nsp13 di SARS-CoV [7]. Alla luce delle somiglianze strutturali tra nsp13 di SARS-CoV e nsp13 di SARS-CoV-2, nonché grazie alla consolidata esperienza del nostro gruppo di ricerca nella progettazione e nella sintesi di derivati DKA dotati di attività antivirale, abbiamo deciso di esplorare nsp13 di SARS-CoV-2 come possibile target per la nostra libreria di molecole a struttura DKA. Abbiamo, quindi, sviluppato un piccolo set di derivati a struttura indolil-DKA (**1a-c** e **2a-c**) come inibitori di nsp13 (Fig. 2). Tali composti hanno riportato dati di inibizione molto incoraggianti, con attività nel basso micromolare sia nei confronti dell'attività elicastica (IC_{50} 4,7-12,69 μ M) che di quella ATPasica (IC_{50} 3,88-26,8 μ M), configurandosi pertanto come promettenti composti hit.

È importante sottolineare che nei saggi di inibizione enzimatica sono stati impiegati sia l'albumina sierica bovina (BSA) sia un agente riducente (la tris-(2-carbossietil)fosfina, TCEP) per ottimizzare

Composto	Elicasi BSA-TCEP IC_{50} (μ M)	ATPasi BSA-TCEP IC_{50} (μ M)	SARS-CoV-2 Vero E6 EC_{50} (μ M)	MERS-CoV Vero E6 EC_{50} (μ M)	Vero E6 CC_{50} (μ M)	HCoV-229E BEAS2B EC_{50} (μ M)	BEAS2B CC_{50} (μ M)
1b	4,7 \pm 1,1	8,2 \pm 1,8	1,70 \pm 0,45	0,76 \pm 0,15	>264	0,91 \pm 0,14	49,7 \pm 3,8
1c	12,69 \pm 4,9	12,8 \pm 1,3	1,03 \pm 0,24	6,32 \pm 1,35	>264	1,83 \pm 0,92	>100

Tab. 1 - Inibizione delle attività associate all'enzima nsp13 e della replicazione virale di SARS-CoV-2, MERS-CoV and HCoV229E da parte dei derivati più promettenti



le condizioni del saggio, riducendo l'effetto di potenziali composti interferenti e mimando meglio le condizioni fisiologiche.

L'incoraggiante attività enzimatica ci ha spinti a valutare l'azione sulla replicazione virale dei composti più promettenti, portando alla luce la loro potenzialità come agenti antivirali ad ampio spettro, essendo attivi nel range del basso micro/submicromolare nei confronti di due hCoV altamente patogeni (SARS-CoV-2 e MERS-CoV) e dell'hCoV causa del comune raffreddore, ovvero hCoV229E. I composti **1b** e **1c**, caratterizzati dal miglior profilo inibitorio (i cui dati di attività sono riportati in Tab. 1), sono stati selezionati per ulteriori approfondimenti circa il meccanismo d'azione.

In particolare, studi di cinetica enzimatica hanno mostrato un meccanismo di inibizione non competitiva di entrambe le attività enzimatiche nei confronti sia dell'ATP che del substrato RNA, suggerendo che tali molecole possano essere inibitori allosterici di nsp13. Studi di docking molecolare, inoltre, hanno consentito di ipotizzare una putativa posa di legame per tali inibitori (all'interno di una tasca allosterica), in accordo con i dati di cinetica (Fig. 3) [8].

Grazie a tali risultati particolarmente incoraggianti, abbiamo deciso di proseguire i nostri studi volti allo sviluppo di *small molecules* come agenti antivirali ad ampio spettro attivi nei confronti di hCoV. Pertanto, abbiamo progettato e sintetizzato un'ampia serie di nuovi indolil-DKA caratterizzati da modifiche a carico della catena DKA e/o del sostituente in posizione 1 dello scaffold indolico al fine di poter approfondire le relazioni struttura-attività. I dati di inibizione enzimatica e di blocco della replicazione virale hanno confermato il potenziale di questa nuova classe di inibitori di nsp13 come potenziali

agenti antivirali ad ampio spettro attivi nei confronti di hCoV emergenti e/o riemergenti.

Ringraziamenti

La mia attività si colloca nell'ambito delle tematiche promosse dalla Divisione di Chimica Farmaceutica che ringrazio sentitamente per il riconoscimento assegnatomi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] WHO, COVID-19 epidemiological update, <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update-edition-173>
- [2] C.C. Lai *et al.*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2020, **55**, 105924.
- [3] Y.-S. Chung *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, **25**, 8155.
- [4] J. Chen *et al.*, *Cell*, 2020, **182**, 1560.
- [5] G.R. Perez-Lemus *et al.*, *Sci. Adv.*, 2022, **8**, eabj4526.
- [6] M.A. White *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2020, **11**, 9144.
- [7] L. Chaewoon *et al.*, *BMC Lett.*, 2009, **19**, 1636.
- [8] A. Corona *et al.*, *Antiviral Research*, 2023, **217**, 105697.

New Antivirals to Fight Human Coronaviruses

The research activity, which has been awarded with the "Premio Divisione Chimica Farmaceutica 2024", is related to the development of new heterocyclic derivatives as broad-spectrum antiviral agents active against human Coronaviruses. Thanks to the results, new inhibitors of nsp13, an essential and highly conserved viral protein, were identified, confirming its key role in developing new effective therapeutic strategies.