



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"LA SAPIENZA"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
XVIII CICLO**

**RICERCHE SU
ACIDI 6-ARIL-2,4-DIOXO-5-ESENOICI
ATTIVI NEI CONFRONTI DELL'INTEGRASI
DEL VIRUS HIV-1**

CANDIDATA

Dott.^{ssa} Alessandra Roux

RELATORE

Chiariss.^{mo} Prof.
Roberto Di Santo

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 5
L'AIDS NEL MONDO	pag. 7
TERAPIA ANTI-AIDS ATTUALMENTE IN USO	pag. 11
RESISTENZA AGLI ANTIRETROVIRALI.....	pag. 15
TOSSICITÀ DEI FARMACI ANTIRETROVIRALI.....	pag. 17
ORIGINI E CLASSIFICAZIONE DELL'HIV	pag. 18
MORFOLOGIA E STRUTTURA DELL'HIV	pag. 22
ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA	pag. 24
CICLO DI REPLICAZIONE.....	pag. 26
STRUTTURA DELL'INTEGRASI E DOMINI FUNZIONALI	pag. 30
MECCANISMO D'AZIONE DELL'INTEGRASI	pag. 40
INIBITORI DELL'INTEGRASI	pag. 43
Nucleotidi	pag. 44
Dinucleotidi	pag. 45
Quartetti di guanosina	pag. 47
Peptidi	pag. 48
Solfati e solfonati	pag. 49
Mercaptosalicilidrazidi	pag. 51
Dipirimidine	pag. 53
Composti ossidrilati.....	pag. 54
Caffeoil- e galloil-derivati	pag. 63
Arildichetoacidi	pag. 65
FINALITÀ DEL LAVORO	pag. 79
DESCRITTIVA CHIMICA	pag. 93
PARTE SPERIMENTALE	pag. 115
APPARECCHIATURE	pag. 117

PROCEDURE SINTETICHE	pag. 118
SAGGI MICROBIOLOGICI.....	pag. 181
Saggi di inibizione dell'integrasi.....	pag. 181
Esempio di un saggio biologico di screening per gli inibitori dell'integrasi.....	pag. 183
Attività antivirale nei confronti dell'HIV.....	pag. 186
Saggi di citossicità.....	pag. 187
MOLECULAR MODELING	pag. 188
Dinamica Molecolare	pag. 188
Docking	pag. 190
Ligand setup.....	pag. 191
Protein setup.....	pag. 192
RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 193
RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITÀ	pag. 195
MOLECULAR MODELING	pag. 219
CONCLUSIONI	pag. 227
BIBLIOGRAFIA	pag. 235
ELENCO PUBBLICAZIONI della Dott. ^{ssa} ALESSANDRA ROUX	pag. 245

INTRODUZIONE

L'AIDS NEL MONDO

L'epidemia mondiale dell'AIDS è uno dei più gravi problemi che la nostra generazione ha dovuto affrontare. L'AIDS è un'urgenza mondiale, una minaccia senza precedenti per lo sviluppo dell'umanità, che esige una azione ed un impegno sostenuti e a lungo termine: l'epidemia infatti non sembra voler allentare la presa sulla società umana.

La crisi dell'AIDS continua ad aggravarsi in Africa, nuove epidemie si sviluppano a ritmi allarmanti in Asia e in Europa Orientale. Nessuna regione del mondo sembra essere risparmiata.

L'AIDS è ormai presente sulla scena mondiale da più di venti anni, e continuerà ad esserlo ancora per altri decenni. La lezione più importante che abbiamo imparato finora, è che noi possiamo fare la differenza: possiamo prevenire le nuove infezioni e possiamo migliorare la qualità della vita e i trattamenti delle persone affette da HIV. In attesa di un rimedio definitivo la nostra sola arma resta la mobilitazione in massa di tutti i settori della nostra società.

Il numero di nuove persone infettate dal virus HIV nel 2003 è stato stimato intorno a 4,8 milioni, un numero molto più alto rispetto a quello degli anni precedenti. Attualmente ci sono circa 37,8 milioni di persone che convivono con l'HIV. Il virus ha già ucciso 2,9 milioni di esseri umani nel 2003 e più di 20 milioni di persone dalla scoperta dei primi casi di AIDS nel 1981.

L'epidemia resta estremamente dinamica, si accresce e si modifica ogni volta che il virus trova nuovi modi di propagarsi. Non c'è quindi alcun motivo di abbassare la guardia, perchè nessun paese al mondo è immune dall'infezione. A partire dal 2002 si è osservato un netto miglioramento nella risposta all'epidemia. I finanziamenti sono aumentati, il costo dei farmaci antiretrovirali è diminuito e ciò ha portato a sostanziali cambiamenti non solo nella

propagazione del virus, ma anche nella qualità della vita dei malati e delle loro famiglie.

Il numero di persone affette da HIV continua però a crescere, malgrado l'esistenza di strategie di prevenzione efficaci.

L'Africa subsahariana resta la più duramente colpita, con una prevalenza di HIV estremamente elevata soprattutto nelle donne incinte di età compresa tra i 15 e i 24 anni. In Asia l'epidemia di HIV resta concentrata tra i consumatori abituali di droghe iniettabili e gli omosessuali. In queste popolazioni il programma di prevenzione è completamente inadeguato. Anche in Europa Orientale il motore principale dello sviluppo dell'epidemia è il consumo delle droghe iniettabili: nel 2002 ha causato più del 10% di tutte le infezioni da HIV segnalate nell'Europa Occidentale ed è stato responsabile del 25% delle infezioni nell'America del Nord. In America Latina e nei Caraibi 11 paesi hanno una prevalenza nazionale dell'HIV stimata intorno all'1% (Figura 1).

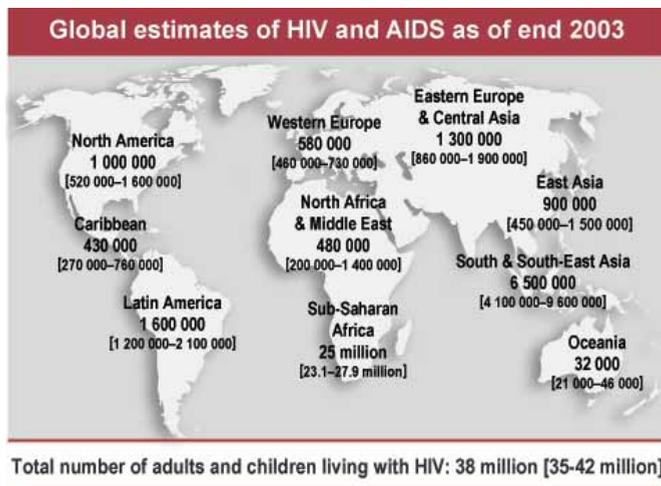


Figura 1. Diffusione dell'epidemia da HIV/AIDS nel mondo(UNAIDS/WHO, 2004).

La comunità internazionale si trova in un momento critico nel quale deve poter garantire l'accesso ai trattamenti per la cura dell'HIV. La situazione non è stata mai così buona: volontà politica senza precedenti nella maggior parte dei paesi, risorse finanziarie per l'acquisto dei trattamenti ed elevata accessibilità finanziaria dei medicinali e dei prodotti per la diagnosi della malattia. Nonostante queste condizioni favorevoli, l'accesso ai trattamenti antiretrovirali ed il sostegno economico per altre malattie legate all'HIV è scandalosamente limitato. Cinque o sei milioni di persone avrebbero un urgente bisogno di un trattamento antiretrovirale. Invece l'organizzazione mondiale per la sanità (OMS) ha stimato che solo 400 000 persone hanno beneficiato di tali trattamenti alla fine del 2003, e che nove persone su dieci non ne hanno avuto la possibilità (Figura 2).

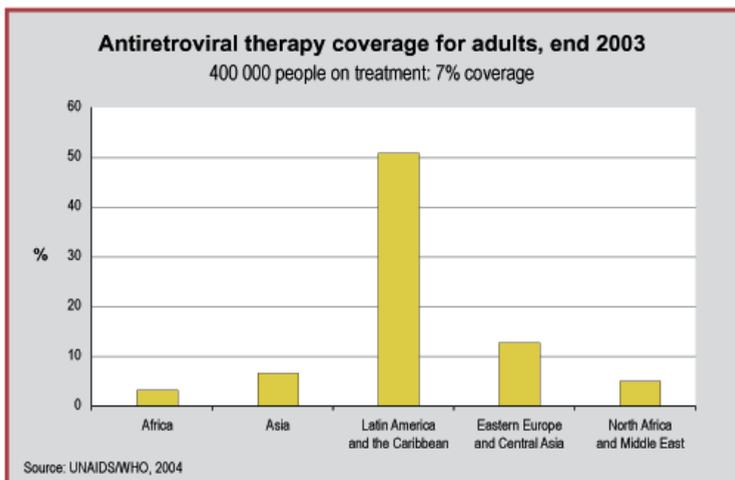


Figura 2. Copertura della terapia antiretrovirale per gli adulti, fine 2003 (UNAIDS/WHO, 2004).

L'effetto degli antiretrovirali sulla vita di un individuo è spesso quasi miracoloso. Non assicurano una guarigione permanente, ma, riducendo la carica virale, possono prolungare la vita delle

persone affette da HIV anche per anni, con la speranza che nel frattempo venga scoperto un rimedio contro l'AIDS. Ma la terapia deve far parte di un insieme integrato di attività di prevenzione e di sostegno che si completano e si rafforzano a vicenda.

Le persone curate con gli antiretrovirali devono infatti essere sottoposte spesso a trattamenti farmacologici contro le infezioni opportunistiche e contro il dolore, spesso causato dalla terapia antiretrovirale stessa. I malati tossicodipendenti inoltre hanno bisogno di una terapia di sostituzione e di disintossicazione, oltre che di un sostegno psicosociale per affrontare una malattia le cui conseguenze per il comportamento ed il modo di vivere sono gravi¹.

TERAPIA ANTI-AIDS ATTUALMENTE IN USO

L'impegno profuso dalla comunità scientifica al fine di definire meglio le caratteristiche epidemiologiche e biologiche della malattia è risultato proporzionale alla vastità del problema sollevato dall'epidemia da HIV. Da quando l'AIDS è stato identificato la prima volta dal punto di vista clinico, sono stati fatti notevoli progressi sia scientifici che terapeutici. In meno di 6 anni si è giunti infatti all'identificazione dell'agente eziologico della malattia, il virus HIV, e allo sviluppo di test che hanno consentito di evidenziare la presenza del virus nella popolazione già durante la fase di latenza della malattia. Grazie a queste innovazioni è stato possibile introdurre nella pratica clinica il primo farmaco progettato in modo razionale per la cura dell'AIDS, l'AZT. Nonostante ciò, l'AIDS resta fuori controllo,² specialmente nelle regioni più sviluppate, in cui fattori di tipo sociale sono il maggior ostacolo per la lotta nei confronti dell'epidemia.

La prognosi dei pazienti affetti da AIDS che hanno pieno accesso alle terapie correnti è completamente cambiata da quando sono stati riportati i primi casi di AIDS. Oggi la vita media di un soggetto sieropositivo che riceve un trattamento farmacologico adeguato è superiore a 8 anni. La sopravvivenza media dei pazienti sottoposti a terapie combinate non è stata ancora calcolata, poiché tali combinazioni sono state introdotte solo 8 anni fa. Le aspettative di vita per un paziente affetto da AIDS erano inferiori ad un anno fino a quando non è stato introdotto l'AZT nel 1987. Questo drastico cambiamento è dovuto allo sviluppo di terapie efficaci, alla diagnosi precoce degli individui sieropositivi e allo sforzo sostenuto per l'analisi e la comprensione dei meccanismi di resistenza virale, che possono essere superati attraverso la progettazione razionale di nuovi farmaci e l'uso di terapie combinate. La

storia dello sviluppo delle terapie anti-HIV è un ottimo esempio di progettazione di farmaci utili per trasformare una malattia terribile in un'infezione cronica. Ci sono ben sei fattori che hanno contribuito alla realizzazione di una terapia anti-HIV efficace:

- 1) presa di coscienza da parte della popolazione dei problemi causati dall' AIDS;
 - 2) finanziamenti adeguati da parte dei governi per lo sviluppo della ricerca;
 - 3) studio e comprensione della genetica e del ciclo replicativo dell'HIV;
 - 4) identificazione dei target virus-specifici e sviluppo di saggi di screening per la scoperta di nuovi farmaci;
 - 5) sviluppo di test clinici per misurare la carica virale e quindi valutare l'efficacia terapeutica;
 - 6) combinazione di farmaci per vincere la resistenza innata e acquisita risultante dal fenotipo altamente mutante dei retrovirus.
- Le terapie approvate dall'FDA colpiscono tre step del ciclo replicativo dell'HIV: trascrizione inversa, maturazione proteolitica e fusione. La tripla terapia, comunemente detta Highly Active Antiretroviral Therapy, (HAART), è ora la terapia standard. Essa consiste nella somministrazione di un inibitore della proteasi (PI) o di un inibitore non-nucleosidico della trascrittasi inversa (NNRT), in combinazione con due inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRT) (Tabella 1).³ L'HAART, purtroppo, è spesso non ben tollerato dai pazienti. È richiesta costanza, è costosa e porta resistenza.⁴ Sin dall'introduzione degli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRT), la terapia antiretrovirale è stata associata a frequenti reazioni avverse.

Tabella 1. Terapie anti-AIDS attualmente approvate della FDA

FDA approval	Brand name	Generic name	Manufacturer
Fusion inhibitors			
2003	Fuzeon	Enfuvirtide (T-20)	Roche Pharmaceuticals & Trimeris
Nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs)			
1987	Retrovir	Zidovudine (AZT)	GlaxoSmithKline
1991	Videx	Didanosine (ddI)	Bristol-Myers Squibb
1992	Hivid	Zalcitabine (ddC)	Roche Pharmaceuticals
1994	Zerit	Stavudine (d4T)	Bristol-Myers Squibb
1996	EpiVir	Lamivudine (3TC)	GlaxoSmithKline
1997	Combivir	Lamivudine+ Zidovudine	GlaxoSmithKline
1998	Ziagen	Abacavir	GlaxoSmithKline
2000	Trizvir	Abacavir + lamivudine + zidovudine	GlaxoSmithKline
2000	Videx EC	Didanosine (ddI)	Bristol-Myers Squibb
2001	Viread	Tenofovir disoproxil	Gilead Sciences
2003	Emtriva	Emtricitabine (FTC)	Gilead Sciences
2004	Epivorn	Abacavir+ Lamivudine	GlaxoSmithKline
2004	Truvada	Emtricitabine+ Tenofovir	Gilead Sciences
Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs)			
1996	Viramune	Nevirapine	Boehringer Ingelheim
1997	Rescriptor	Delavirdine (DLV)	Pfizer
1998	Sustiva	Efavirenz	Bristol-Myers Squibb
Protease inhibitors (PIs)			
1996	Invirase	Saquinavir	Roche Pharmaceuticals
1996	Norvir	Ritonavir	Abbott Laboratories
1996	Crixivan	Indinavir (IDV)	Merck
1997	Viracept	Nelfinavir	Pfizer
1997	Fortovase	Saquinavir Mesylate	Roche Pharmaceuticals
1999	Agenerase	Amprenavir	GlaxoSmithKline
2000	Kaletra	Lopinavir+ Ritonavir	Abbott Laboratories
2003	Preyataz	Atazanavir	Bristol-Myers Squibb
2003	Lexiva	Fosamprenavir	GlaxoSmithKline

Con la scoperta di altri farmaci anti-HIV (NNRT, PI), ma soprattutto con i trattamenti altamente attivi (HAART), dalla seconda metà degli anni '90 il problema della tossicità farmacologica è notevolmente aumentato. Gli indiscussi vantaggi che si sono ottenuti con l'introduzione dell'HAART, hanno fatto accettare livelli di tossicità che non sarebbero stati accettati per altre classi di farmaci. Due aspetti in particolare amplificano il problema delle reazioni avverse agli antiretrovirali: da una parte la somministrazione contemporanea di almeno tre farmaci può produrre effetti di moltiplicazione delle reazioni tossiche, oltre che dell'attività anti-virale; dall'altra, la prolungata sopravvivenza dovuta all'HAART, prospetta un

trattamento indefinito con l'emergenza di tossicità cronica, specie per interferenze metaboliche. Accanto agli effetti tossici, gli anti-retrovirali pongono inoltre importanti problemi di interazione, fra di loro e nei confronti degli altri farmaci assunti per le patologie concomitanti, preesistenti o opportunistiche, e per la profilassi.⁵

RESISTENZA AGLI ANTIRETROVIRALI

La terapia antiretrovirale ha cambiato la storia naturale della malattia da HIV, determinando uno straordinario aumento della sopravvivenza e della qualità di vita, accompagnati da una marcata riduzione degli eventi clinici (infezioni opportunistiche e tumori) che rappresentano la principale causa di morte dei pazienti. Tuttavia, le caratteristiche biologiche del virus fanno sì che l'approccio terapeutico finora utilizzato sia lungi dall'aver risolto definitivamente il problema dell'infezione da HIV.

Ciò è dovuto essenzialmente a due ordini di motivi. In primo luogo l'HIV, come tutti i retrovirus necessita di integrarsi nel genoma della cellula ospite per completare il proprio ciclo replicativo; una volta integrato, non esistono strumenti che permettano di eliminare selettivamente il genoma di HIV dalla cellula ospite, considerando che le cellule lungo-sopravviventi (linfociti CD4 memoria in fase latente, macrofagi tessutali, ecc.) possono portare il genoma virale per anni senza subire alcun effetto citopatico. In secondo luogo, anche quando la viremia è, grazie alla terapia antiretrovirale, al di sotto della soglia di riconoscimento dei sistemi diagnostici, il virus mantiene un certo grado di replicazione. L'infezione mantiene quindi caratteri di persistenza biologica anche in assenza di segni clinici, e in condizioni di successo terapeutico. L'HIV è un virus ad altissimo tasso di variabilità, grazie anche al suo sistema di duplicazione del genoma che non prevede, al contrario delle polimerasi cellulari, il controllo e la correzione del filamento del DNA neoformato. Per tali ragioni, si calcola che l'HIV cambi almeno una base del suo genoma (costituito da un totale di 9000 basi) nel corso di ogni ciclo replicativo. Ovviamente solo una piccola parte delle mutazioni si "fissa" nel genoma e rimane sotto forma di nuova progenie virale in grado di

replicare e di infettare. In queste condizioni, è chiaro che lo sviluppo di resistenza rappresenta un evento intrinsecamente legato alle caratteristiche replicative del virus.

La pressione farmacologica incongrua, come nel caso della terapia antivirale non sufficientemente potente, può favorire la selezione di ceppi resistenti. È il caso del trattamento con farmaci antivirali singoli o in doppia associazione, incapaci di limitare il numero di cicli replicativi oltre una certa soglia, permettendo al virus di sviluppare ceppi resistenti. La terapia tripla, invece, interferendo in modo più efficace sul ciclo replicativo del virus, grazie all'effetto sinergico dei farmaci utilizzati, riduce il numero di cicli replicativi e limita la selezione e la comparsa di ceppi resistenti. L'aderenza alla terapia è strettamente connessa al successo terapeutico.

Un ulteriore elemento deve essere considerato per spiegare il fenomeno della resistenza che è così comune nella pratica clinica. I farmaci antivirali attualmente disponibili appartengono a tre sole classi: gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRT), gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRT), e gli inibitori della proteasi (PI). I farmaci di ciascuna classe hanno meccanismi d'azione tra loro molto simili, agendo in modo specifico sui siti attivi degli enzimi virali.

È pertanto prevedibile che il virus, sfuggendo ad un farmaco attraverso mutazioni specifiche, divenga almeno parzialmente resistente anche ad altri farmaci della stessa classe. In altri casi la resistenza crociata è completa e comporta una ridotta efficacia degli schemi terapeutici.⁵

TOSSICITA' DEI FARMACI ANTIRETROVIRALI

Sin dall'introduzione degli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRT), la terapia antiretrovirale è stata associata a frequenti reazioni avverse. Con la scoperta di altri farmaci anti-HIV (NNRT, PI), ma soprattutto con i trattamenti altamente attivi (HAART) dalla seconda metà degli anni '90, il problema della tossicità farmacologica è notevolmente aumentato. Le principali reazioni avverse sono: disturbi gastrointestinali, reazioni di ipersensibilità, tossicità epatica e midollare, neuropatie e alterazioni del tessuto adiposo e del metabolismo lipidico e glucidico. Gli indiscussi vantaggi che si sono ottenuti con l'introduzione dell'HAART, hanno fatto accettare livelli di tossicità che non sarebbero stati accettati per altre classi di farmaci.

Due aspetti in particolare amplificano il problema delle reazioni avverse agli antiretrovirali: da una parte la somministrazione di almeno tre farmaci contemporaneamente può produrre effetti di moltiplicazione delle reazioni tossiche, oltre che dell'attività antivirale; dall'altra, la prolungata sopravvivenza dovuta all'HAART, prospetta un trattamento indefinito con l'emergenza di tossicità cronica, specie per interferenze metaboliche.

Accanto agli effetti tossici, gli antiretrovirali pongono inoltre importanti problemi di interazione, fra di loro e nei confronti degli altri farmaci assunti per le patologie concomitanti, preesistenti o opportunistiche, e per la profilassi.⁵

ORIGINI E CLASSIFICAZIONE DELL'HIV

Le caratteristiche epidemiologiche dell'AIDS fecero supporre, sin dalla sua iniziale identificazione, che l'eziologia fosse di natura infettiva ed in particolare virale. Nel 1983, alcuni ricercatori francesi, tra i quali L. Montaigner, pubblicarono un lavoro in cui veniva descritto l'isolamento di un virus, chiamato LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*), a cui era associata un'attività DNA-polimerasica RNA-dipendente, tipica dei retrovirus. Esso però, contrariamente agli altri retrovirus, si mostrò in grado di uccidere i linfociti T, cellule verso cui il virus mostrava uno spiccato tropismo. Nello stesso anno, negli Stati Uniti, venne descritto l'isolamento, da un paziente affetto da AIDS, di un virus, chiamato HTLV-III, per distinguerlo dall'HTLV-I e II, con cui condivideva le caratteristiche strutturali, biologiche e molecolari, ma non la capacità citocida. Subito dopo Levy et al. riuscirono ad isolare un virus simile da soggetti affetti da AIDS e da soggetti appartenenti a categorie a rischio: questo virus venne chiamato ARV (*AIDS-associated RetroVirus*).

Con non poche ripercussioni in campo scientifico, politico ed economico, si arrivò alla conclusione che in tutti e tre i casi si trattava del medesimo virus e che esso rappresentava l'agente eziologico dell'AIDS. A questo virus fu quindi assegnato il nome di HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) (Figura 3).

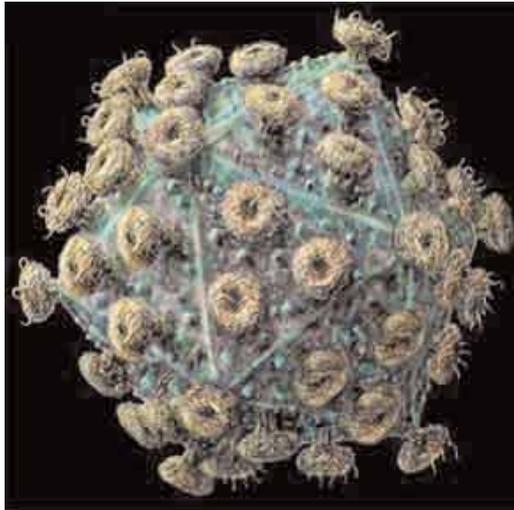


Figura 3. Virus dell'immunodeficienza umana, HIV.

Sin dalla sua iniziale caratterizzazione apparve subito chiaro che l'HIV aveva proprietà simili a quelle dei virus appartenenti alla famiglia *Retroviridae*. Infatti l'HIV, oltre a possedere un'attività DNA-polimerasica RNA-dipendente, caratteristica della suddetta famiglia, condivideva con i suoi membri altre caratteristiche morfologiche, quali le dimensioni e l'organizzazione strutturale. Il virus fu assegnato più specificamente al genere *Lentivirus* in funzione di alcune sue caratteristiche biologiche e patogenetiche, quali la tendenza a dare luogo a un'infezione progressiva di tipo cronico, l'esito invariabilmente fatale della malattia associata all'infezione, la scarsa efficienza della risposta immunitaria dell'ospite nei confronti del virus, la possibilità di una sua persistenza in cellule del sistema immunitario.

Dai pazienti affetti da AIDS sono state isolate due diverse forme di HIV, ma strettamente correlate, definite rispettivamente HIV-1 e HIV-2.

Come per altri virus a RNA, ad esempio il virus dell'epatite C, fu

quindi coniato il termine “quasispecie”, ad indicare la popolazione di varianti virali diverse, presenti simultaneamente anche nel singolo paziente. Sulla base delle sequenze di alcuni geni virali (geni *gag* e *pol*), è stato possibile eseguire analisi filogenetiche approfondite su ceppi isolati in varie parti del mondo. I risultati di tali studi permettono di affermare che l’HIV-1 è presente sotto forma di tre principali sottotipi genetici: M (*major* o *main*); O (*outlier*); N (Non-M e Non-O).

Il gruppo M dell’HIV-1, che comprende circa il 95% di tutti i virus isolati nel mondo, consiste di almeno nove sottotipi o *clades* (A, B, C, D, F, G, H, J, K); tale classificazione è comunque in continua evoluzione.

L’HIV-1, ritenuto tra i due il più diffuso e virulento (responsabile di oltre il 90% dei casi di AIDS segnalati nel mondo), costituisce il tipo più comunemente associato all’AIDS negli Stati Uniti, in Europa ed in Africa Centrale. L’HIV-2, endemico dell’Africa Occidentale, è caratterizzato da un più modesto potere patogeno. In termini di organizzazione genetica, i due tipi di HIV sono molto simili in quanto differiscono per un solo gene.

Un altro aspetto di più recente definizione riguarda la presenza in natura di ceppi ricombinanti di HIV-1 (CRF, *Circulating Recombinant Forms*), di ceppi cioè che sono il risultato sia di eventi di ricombinazione tra varianti virali appartenenti alla stessa *clade* o a *clade* diverse, sia, più facilmente, a fenomeni di migrazione del virus.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che questi fattori, più che le mutazioni a carico del genoma virale di per sé, sembrano essere responsabili della variazione globale dell’HIV e dell’insorgenza di ceppi varianti, che aiutano il virus a non essere riconosciuto, e quindi non adeguatamente combattuto dal sistema immunitario. Queste modificazioni sono inoltre responsabili di una evoluzione

accelerata e dell'insorgenza di resistenza ai farmaci in corso di terapia antivirale.

L'infezione da HIV viene tradizionalmente distinta in tre fasi: infezione primaria, fase di latenza clinica e sindrome di immunodeficienza.

L'infezione primaria ha caratteristiche assimilabili a quelle di altre infezioni virali, con un periodo di incubazione abbastanza lungo, una sintomatologia sostanzialmente indifferenziata, una spiccata replicazione virale, associata ad elevati livelli di viremia plasmatica, che declina rapidamente in coincidenza con lo sviluppo della risposta immunitaria specifica.

La fase di latenza clinica (infezione cronica), anche se contrassegnata dalla diminuzione della viremia e dalla riduzione dei sintomi, corrisponde ad una fase di replicazione virale attiva e progressivamente crescente negli organi linfoidi. E' in realtà un momento dinamico dell'infezione, in cui si bilanciano un'elevata produzione ed eliminazione di particelle virali e un rapido turnover di cellule infettate.

La fase di immunodeficienza, che si verifica quando il numero e la funzionalità dei linfociti T CD4+ scende al di sotto di un livello compatibile con il mantenimento di un efficace controllo da parte dell'immunità cellulo-mediata, è comprensibilmente contrassegnata dalla comparsa di infezioni opportunistiche e neoplasie, che rappresentano la principale causa di morte dei soggetti affetti da AIDS.⁵

MORFOLOGIA E STRUTTURA DELL'HIV

Il virus dell'HIV, analogamente a molti retrovirus, ha una struttura icosaedrica e un diametro compreso fra i 100 e 120 nm (Figura 4).

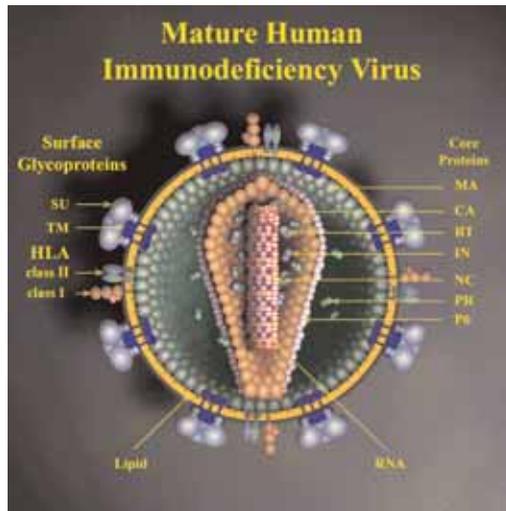


Figura 4. Struttura del virus HIV-1.

Si possono distinguere un pericapside esterno e un nucleocapside più interno chiamato anche *core*. Al microscopio elettronico, il virione risulta composto per il 60-70% di lipidi, per il 2% di carboidrati e per l'1% di RNA genomico; il nucleocapside troncocoonico è situato al centro della particella, che risulta di forma quasi sferica.

Il pericapside è costituito da un doppio strato fosfolipidico di origine cellulare, in cui sono ancorate le seguenti glicoproteine virali: la *gp120*, che sporge verso l'esterno e che possiede un'attività recettoriale; la *gp41*, che in gran parte si trova inserita nel doppio strato fosfolipidico e che possiede attività fusogena.

La superficie dell'involucro presenta numerose protuberanze, costituite da trimeri o tetrameri delle glicoproteine *gp120* e *gp41*.

Nel pericapside possono essere inserite quantità variabili di proteine cellulari (ad es. antigeni MHC), che vengono acquisite durante il processo di maturazione e liberazione. Le due glicoproteine virali sono estremamente importanti ai fini della trasmissione dell'infezione alle cellule bersaglio.

L'insieme dell'involucro fosfolipidico e delle glicoproteine di superficie viene anche indicato come *envelope* del virus. Associato alla faccia interna, si trova uno strato proteico cosiddetto di matrice, costituito dalla proteina *p17*, che determina un ispessimento del doppio strato fosfolipidico.

Al di sotto dello strato proteico suddetto troviamo il nucleocapside, che ha una forma grossolanamente troncoconica.

All'interno del nucleocapside troviamo il genoma, alcune molecole di tRNA e alcuni prodotti del gene *pol* (proteasi, trascrittasi inversa, integrasi). Strettamente associata al genoma c'è infine la proteina *p7*.⁵

ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA

Il genoma dell'HIV, come quello di tutti i retrovirus, è rappresentato da due filamenti identici di RNA a polarità positiva. Ogni filamento è costituito da circa 9.200 nucleotidi e possiede ad una estremità una struttura *cap* e all'altra una coda di *poli-A*, tipica degli RNA messaggeri della cellula eucariotica (Figura 5).

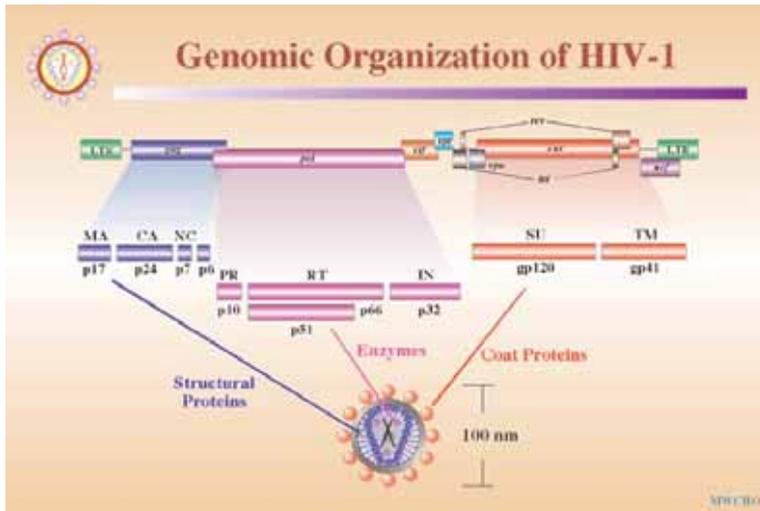


Figura 5. Organizzazione del genoma del virus HIV-1.

Il sequenziamento del genoma ha rivelato da subito che, contrariamente a quanto si osserva nella maggior parte dei membri della famiglia *Retroviridae*, il cui genoma è rappresentato sostanzialmente da 3 geni corrispondenti ai tre gruppi di proteine strutturali (*gag*, *pol*, *env*), l'HIV possiede diversi geni addizionali (Figura 5). Il gene *gag* codifica le proteine strutturali del *core*; il gene *pol* codifica gli enzimi virali necessari per la replicazione: trascrittasi inversa, integrasi e proteasi; il gene *env* codifica le glicoproteine dell'*envelope*, responsabili dell'infettività delle particelle virali

mediante l'attacco a recettori cellulari specifici.

Oltre a questi, sono presenti geni regolatori (*tat*, *rev*) che intervengono in fasi diverse dell'espressione genica, quali la trascrizione e la regolazione post-trascrizionale e geni accessori (*nef*, *vpu*, *vif* e *vpx* nell'HIV-2), così denominati in quanto non essenziali per la replicazione virale *in vitro*, ma indispensabili per il ciclo vitale del virus nell'ospite e per l'induzione della malattia.

Questi fattori aumentano la complessità dell'organizzazione e dell'espressione dell'HIV.

All'estremità del genoma, sono presenti sequenze regolatrici chiamate LTR (Long Terminal Repeat) che si formano soltanto dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite, durante la trascrizione primaria dell'RNA in DNA. Esse originano dalle TR (Terminal Repeat), presenti già nell'RNA genomico, e sono costituite in sostanza da sequenze identiche (U3, R, U5) non codificanti ed estremamente conservate. Nelle LTR sono presenti sequenze di fondamentale importanza per la replicazione dell'HIV, come per l'integrazione, per la trascrizione controllata e regolata, per l'amplificazione della trascrizione.⁵

CICLO DI REPLICAZIONE

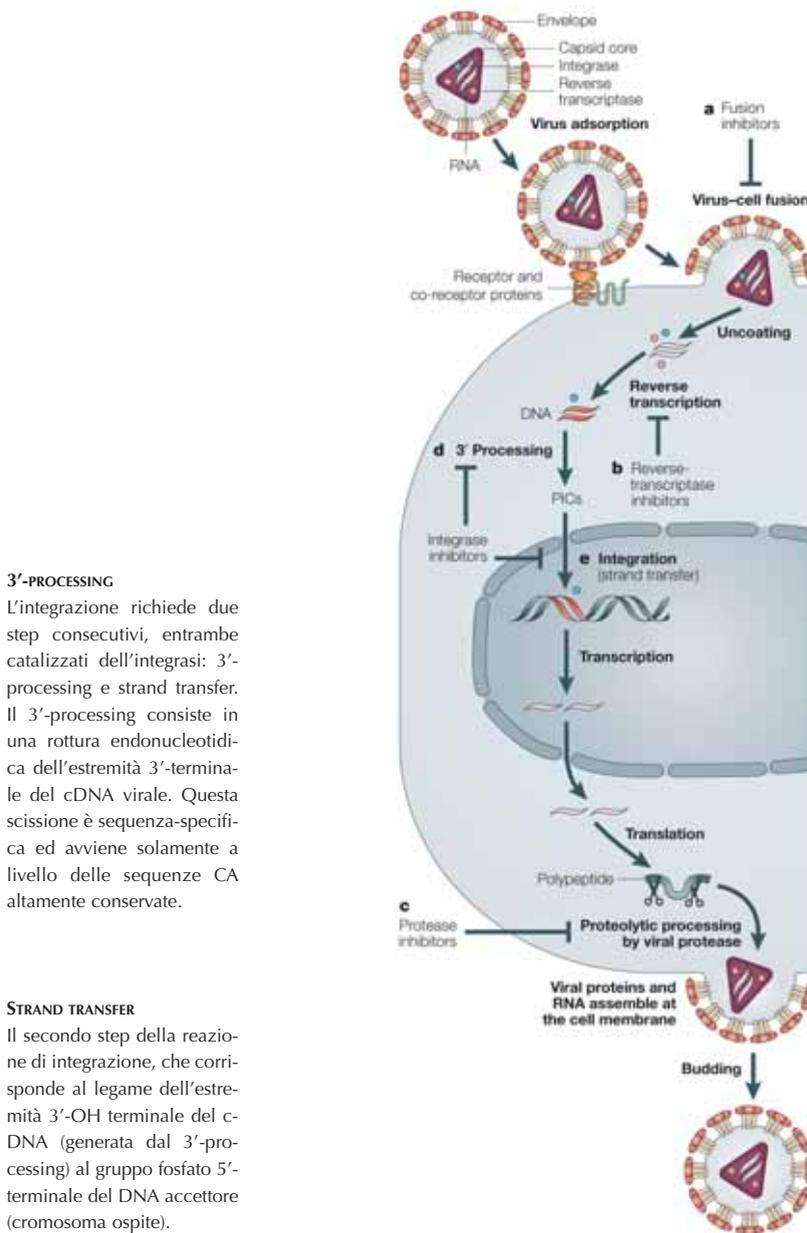
Il ciclo di replicazione dell'HIV viene solitamente suddiviso in diverse fasi.

Il contatto tra il virione e la cellula bersaglio è il primo evento necessario all'infezione della cellula. Il recettore principale ad alta affinità dell'HIV è rappresentato dalla molecola CD4: questo spiega il tropismo selettivo del virus per i linfociti T CD4+ e per le cellule umane che esprimono sulla loro superficie la molecola CD4, in particolare monociti/macrofagi.

Nel riconoscimento della cellula bersaglio risultano coinvolte alcune regioni conservate della glicoproteina di superficie *gp120*. Il legame della *gp120* con il recettore CD4 comporta una modificazione conformazionale della glicoproteina. Questo evento causa a sua volta l'esposizione e l'attivazione della proteina transmembrana *gp41*, che, una volta esposta, interagisce con la membrana cellulare inducendo la fusione dell'involucro virale con il doppio strato fosfolipidico della membrana citoplasmatica.

Il legame dell'HIV al CD4 non è tuttavia sufficiente per l'entrata del virus nella cellula ospite: al fenomeno partecipano anche proteine di membrana (CXCR4 e CCR5) che fungono da corecettori. I ligandi naturali di questi corecettori sono rappresentati principalmente dalle chemochine.

Dopo la penetrazione, l'HIV viene denudato in un processo detto *uncoating*, a cui fa seguito la replicazione del materiale genetico. La fase di retrotrascrizione, che avviene ad opera dell'enzima trascrittasi inversa, consiste nella sintesi di una prima catena di DNA complementare ad una delle due catene di RNA virale.



3'-PROCESSING

L'integrazione richiede due step consecutivi, entrambe catalizzati dall'integrasi: 3'-processing e strand transfer. Il 3'-processing consiste in una rottura endonucleotidica dell'estremità 3'-terminale del cDNA virale. Questa scissione è sequenza-specifica ed avviene solamente a livello delle sequenze CA altamente conservate.

STRAND TRANSFER

Il secondo step della reazione di integrazione, che corrisponde al legame dell'estremità 3'-OH terminale del c-DNA (generata dal 3'-processing) al gruppo fosfato 5'-terminale del DNA accettore (cromosoma ospite).

Figura 6. Ciclo di replicazione dell'HIV-1 e bersagli farmacologici

La seconda elica di DNA viene trascritta sullo stampo di DNA neoprodotto, soltanto dopo l'azione di un altro enzima virale, la RNasiH, che scinde parzialmente lo stampo originale di RNA.

Al termine della retrotrascrizione, il genoma virale è costituito da una duplice catena di DNA lineare, replica dell'originale genoma a RNA, associata probabilmente alla proteina di matrice, alla proteina *Vpr* e all'integrasi: questo complesso ribonucleoproteico prende il nome di complesso di preintegrazione (PIC).

La fase successiva della replicazione prevede la migrazione del complesso dal citoplasma al nucleo, dove il DNA virale viene integrato nel genoma della cellula ospite ad opera dell'enzima integrasi. In seguito il provirus può rimanere confinato per un periodo molto lungo (mesi o anni), con scarsa o nulla produzione di proteine virali o virioni, e di conseguenza l'infezione si mantiene latente. Non si sa esattamente quali siano i fattori che determinano l'attivazione o la latenza del virus, ma è certo che un ruolo importante è giocato dallo stato di attivazione immunitaria della cellula ospite. L'attivazione da parte di antigeni, mitogeni, citochine o geni virali, promuove la proliferazione, attraverso la liberazione di fattori di trascrizione genetica della cellula immunitaria. Il DNA virale integrato, una volta attivato, utilizza le strutture ed i sistemi enzimatici di derivazione cellulare per la trascrizione dell'RNA messaggero e la produzione di proteine strutturali e nuove catene di RNA, che andranno a costituire il genoma delle nuove particelle virali. I componenti virali neosintetizzati vengono trasportati verso la superficie della cellula ospite, dove vengono assemblati.

Lo stadio finale della maturazione, comporta il rilascio delle particelle virali che si rivestono ("*coating*") della membrana cellulare. Le particelle costituenti la progenie virale possono essere rilasciate attraverso una lenta gemmazione che non comporta il danneg-

giamento immediato della cellula ospite. La gemmazione può però coinvolgere anche tutta la membrana cellulare, causando così il danneggiamento irreversibile e la morte (lisi) della cellula ospite.⁵

Le terapie attualmente in uso colpiscono l'attacco/fusione dell'HIV alla membrana della cellula ospite (Figura 6a), e gli enzimi virale trascrittasi inversa (Figura 6b) e proteasi (Figura 6c). Problemi di tossicità legati all'HAART e sviluppo di farmacoresistenza, rendono urgente lo sviluppo di nuovi farmaci anti-HIV.

Uno dei più recenti approcci è quello di colpire il terzo enzima virale, l'integrasi: studi condotti dal gruppo Merck hanno infatti dimostrato un'elevata flessibilità ed efficacia degli inibitori dell'integrasi in modelli animali.

STRUTTURA DELL'INTEGRASI E DOMINI FUNZIONALI

I retrovirus codificano i loro tre enzimi (proteasi, trascrittasi inversa ed integrasi) all'interno del gene POL, che è traslato come poliproteina Pol. La proteina è codificata all'estremità 5' e l'integrasi all'estremità 3' del gene *POL* (Figura 7).

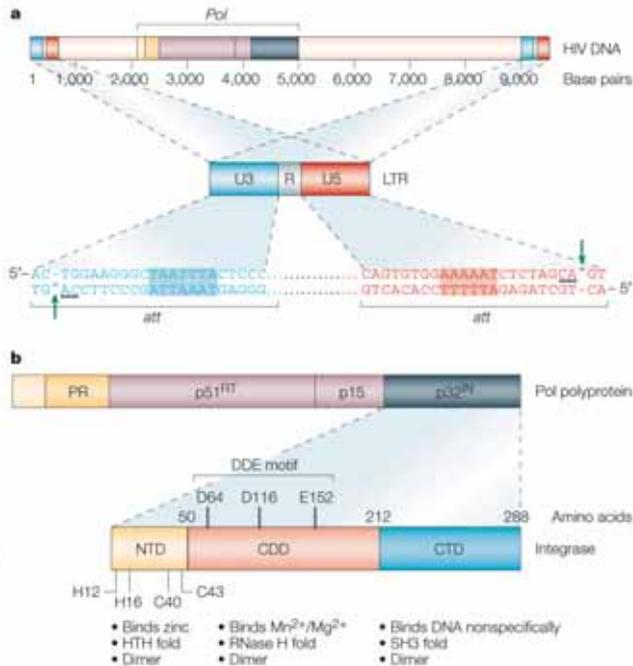


Figura 7. Struttura genetica del provirus dell'HIV e domini dell'integrasi.

L'integrasi è generata durante la maturazione del virus dalla scissione della poliproteina Pol ad opera dell'HIV proteasi. L'integrasi dell'HIV è una proteina del peso di 32 kDa e comprende tre domini strutturali: il dominio ammino terminale (NTD), il core catalitico (CCD) ed il dominio carbossi terminale (CTD) (Figura 7b). La struttura atomica di questi tre domini è stata determinata attraverso la diffrazione a raggi X o la risonanza magnetica nucleare (NMR).⁶ La Figura 8 mostra le strutture del CCD in associazione

con il CTD,⁷ e del NTD con il CCD.⁸

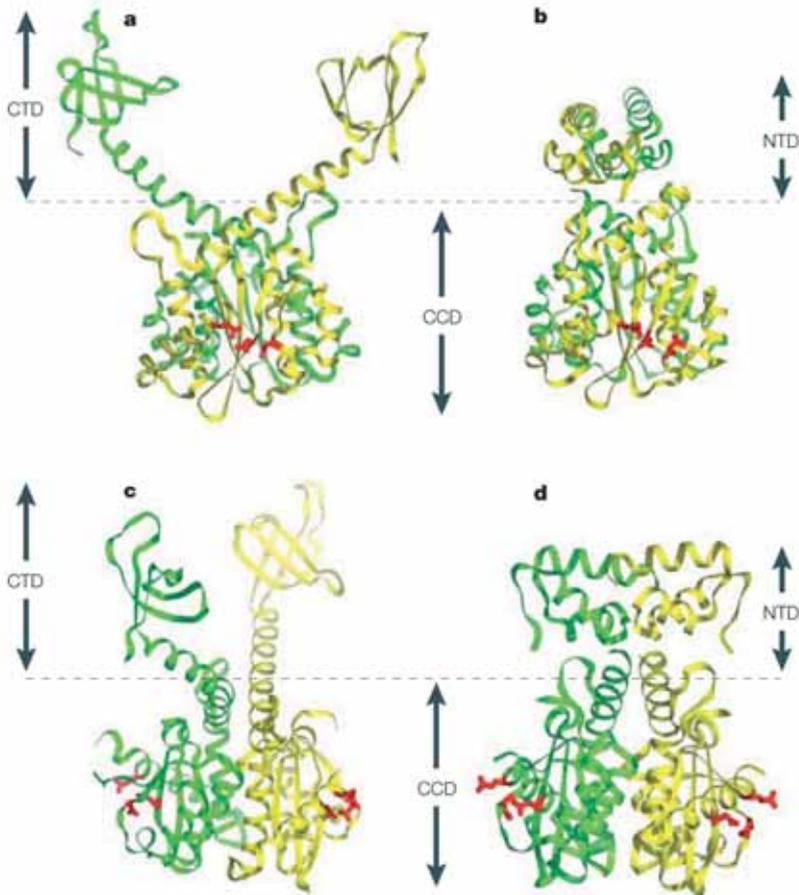


Figura 8. Struttura cristallina del dimero dell'integrasi del virus HIV-1. **a** e **b**: la triade catalitica (motivoDDE) è mostrata in rosso. Le due subunità del dimero sono mostrate in giallo e in verde. **c** e **d**: vista frontale delle stesse strutture (dopo rotazione di 90° in senso antiorario della precedenti strutture).

Il CCD, che comprende i residui 50-212, forma un dimero in tutte le strutture esaminate. È strutturalmente simile a quello delle altre integrasi retrovirali (Murine Leukemia Virus (MLV) a Avian Sarcoma Virus (ASV)).⁹

Questa famiglia di enzimi che processano il DNA (polinucleotidil

transferasi) contiene una tripletta di amminoacidi caratteristica (motivo DDE), formata nell'integrasi dell'HIV dalla triade catalitica D64 (aspartato 64), D116, (aspartato 116) e E152 (glutammato 152) (Figura 7 e 8). Questi residui sono altamente conservati in tutte le integrasi e le retrotrasposasi (motivo DD[35]E). La mutazione anche di uno di questi tre amminoacidi annulla l'attività enzimatica e la replicazione virale. I due residui D64 e D116 formano un complesso di coordinazione (con legami covalenti) con uno ione bivalente (Mn^{2+} o Mg^{2+}). Poichè nella struttura cristallina dell'integrasi di ASV è stato osservato un altro metallo bivalente,¹⁰ e poichè nella struttura delle altre polinucleotidil transferasi sono presenti due cationi^{11,12} è stato proposto che possa essere coordinato un secondo metallo (Mn^{2+} o Mg^{2+}) a livello dei residui D116 e E152, quando l'integrasi lega il suo DNA substrato^{13,14}. È quindi probabile che i metalli coordinino sia l'integrasi che lo scheletro fosfodiesterico del DNA substrato durante il 3'-processing e lo strand transfer. In più strutture, il CCD contiene un piccolo loop disordinato (residui 141-150), la cui struttura potrebbe essere stabilizzata dal DNA. Sebbene il CCD contenga il sito catalitico, in assenza dei domini NTD e CTD, esso riesce a catalizzare *in vitro* esclusivamente la reazione di disintegrazione, cioè l'inverso della reazione di strand transfer^{15,16}. Comunque non è ancora nota l'importanza fisiologica di tale reazione. La disintegrazione resta la sola reazione catalizzata dal CCD isolato: per catalizzare il 3'-processing e lo strand transfer infatti esso ha bisogno sia del dominio NTD che di quello CTD uniti a formare un complesso dimerico.¹⁷

Il dominio NTD comprende i residui 1-50 e contiene il motivo HHCC (Figura 7b), comune a tutte le integrasi retrovirali. Il legame di un atomo di Zn^{2+} sembra indispensabile alla stabilizzazione della struttura del dominio NTD ed è necessario all'attività inte-

grasica. Singole mutazioni a carico di questi tre amminoacidi riducono l'attività enzimatica dell'integrasi.¹⁸

L'interfaccia del dimero del NTD è diversa nella struttura cristallina (Figura 8) rispetto alla struttura determinata con l'NMR in soluzione: ciò indica un arrangiamento variabile dei multimeri dell'integrasi.⁶

Il dominio CTD, che comprende i residui 212-288 (Figura 7b), lega il DNA in modo non specifico, ma indispensabile per le attività di 3'-processing e strand transfer. La Figura 8 mostra le strutture dei domini NTD e CTD. Queste strutture indicano la possibilità che il dominio NTD sia posizionato tra il CCD e il CTD, vicino all' α -elica che lega il CCD al CTD, L'analisi della struttura dell'interfaccia tra i due domini all'NMR, che è differente da quella osservata all'analisi cristallografica (Figura 8), potrebbe far supporre che l'integrasi si organizzi in complessi multimolecolari (tetrameri e/o ottameri), come sembra accadere per l'enzima nella sua forma attiva.

Sebbene, dunque, la struttura di ciascun dominio sia stata determinata, la struttura tridimensionale dell'integrasi "full-length" non è tuttora disponibile. Il relativo arrangiamento spaziale dei domini strutturali dell'integrasi e le loro interazioni con il DNA substrato sono rimaste quasi completamente sconosciute: lo studio diretto viene infatti impedito dalla tendenza a formare grandi aggregati molecolari nelle condizioni di reazione.

Sono state quindi determinate le strutture cristalline, che comprendono due domini alla volta: il dominio N-terminale e il dominio catalitico (IN¹⁻²¹²); il dominio catalitico e il dominio C-terminale (IN⁵²⁻²⁸⁸).

Queste strutture sperimentali, coerenti con le strutture di ciascun dominio determinate tramite cristallografia a raggi X, forniscono maggiori informazioni sulla disposizione spaziale nel contesto di

una struttura statica e completa dell'integrasi di HIV-1 in assenza del DNA substrato.

Questi studi dimostrano che un oligomero, probabilmente un tetramero dell'integrasi, è indispensabile per una completa reazione di integrazione. Due dei quattro siti attivi sono coinvolti nella reazione di integrazione, mentre gli altri due siti attivi fungono da supporto strutturale per il tetramero.

In particolare la struttura del *core* catalitico e del dominio N-terminale (IN¹⁻²¹²) formano un dimero di dimeri, che rappresenta un modello dell'arrangiamento tetramerico dell'integrasi (Figura 9).

In questa disposizione tetrameric, i due siti attivi adiacenti, uno per ciascun dimero, tendono ad avvicinarsi attraverso modificazioni conformazionali all'interno di ciascuna unità dimerica, allo scopo di facilitare le reazioni di integrazione.

Mentre le informazioni statiche strutturali sono difficilmente valutabili, è stato invece osservato, attraverso simulazioni molecolari dinamiche, che la flessibilità di questo "loop" catalitico ha una notevole incidenza sulla funzione e sull'attività catalitica dell'HIV-1 integrasi.^{8,19}

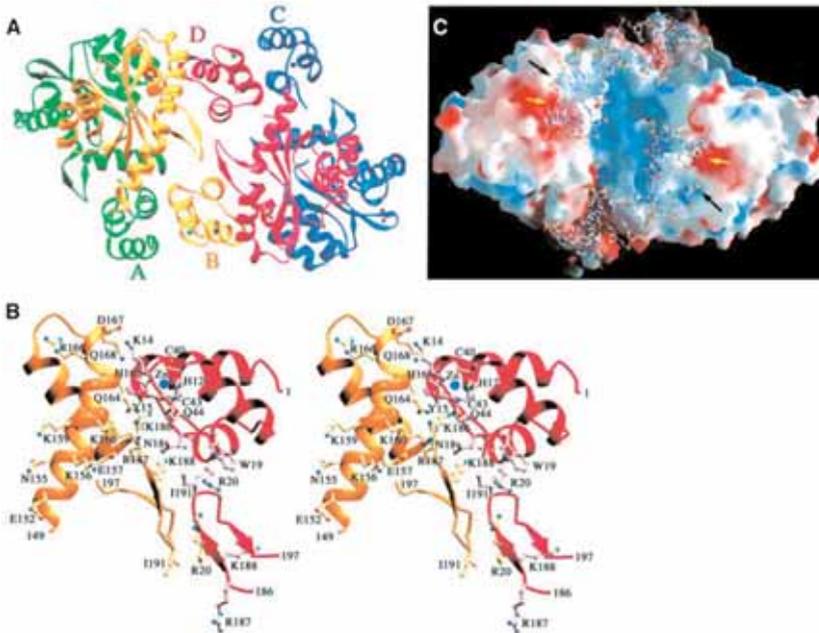
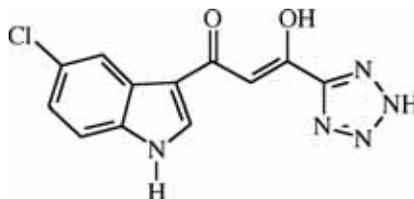


Figura 9. Arrangiamento tetrameric dell'IN.

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi per determinare la struttura tridimensionale del sito catalitico dell'integrasi, al fine di sviluppare un modello per la progettazione di nuovi inibitori. In uno di questi studi il dominio catalitico dell'integrasi è stato cocristallizzato con l'inibitore 5-CITEP (1-(5-cloroindol-3-il)-3-idrossi-3-(2*H*-tetrazol-5-il)-propenone).



1 5-CITEP

L'inibitore si lega nella parte centrale del sito attivo dell'enzima, tra i tre residui acidi Asp-64, Asp-116 e Glu-152, fondamentali ai fini dell'attività catalitica. Inoltre la Gln-148 forma un legame idrogeno con l'azoto dell'anello indolico; il Glu-152 è alla distanza adatta per formare un legame idrogeno con l'ossidrile enolico; tutti e quattro gli atomi d'azoto del tetrazolo si legano attraverso un legame idrogeno con Asn-155, Thr-66, Lys-159 e Lys-156.

Non si osservano cambiamenti conformazionali nel complesso, eccetto che nella catena laterale del glutammato 152, molto flessibile. La presenza dell'inibitore, inoltre, non influenza il legame del magnesio ai due residui di aspartato.

Studi di mutagenesi sito-specifica hanno permesso di identificare numerosi residui in prossimità del sito attivo, importanti per il legame al DNA virale, come Lys-156, Lys-159, Gln-148 e Tyr-143. Alcuni di questi residui (Lys-156, Lys-159 e Gln-148) sono coinvolti anche nel legame con l'inibitore. Si può quindi affermare che il legame dell'inibitore mima effettivamente l'interazione integrasi-DNA virale. Questa osservazione è confermata dal fatto che la distanza tra l'indolo e il tetrazolo nell'inibitore può essere approssimata a quella esistente tra due nucleotidi.

Il 5-CITEP può essere in effetti considerato un nucleotide, in cui il tetrazolo rimpiazza il fosfato, la porzione chetoenolica mima lo zucchero, e il cloro-indolo sostituisce la base purinica.²⁰

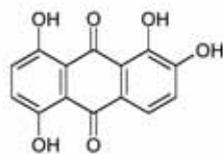
Recentemente sono stati condotti degli studi di dinamica molecolare sul complesso 5-CITEP-integrasi, che hanno permesso di risalire alle esatte interazioni tra l'integrasi e il ligando. Durante la simulazione dinamica, il 5-CITEP ha mostrato una considerevole mobilità all'interno del sito attivo, spostandosi dalla posizione iniziale assunta nella struttura cristallizzata. Inoltre, è stata rilevata la presenza di una molecola di acqua nel sito catalitico, che sembra favorire il legame tra inibitore e integrasi: essa forma, infatti, un

legame idrogeno tra il 5-CITEP e l'integrasi, agendo da ponte di connessione.²¹

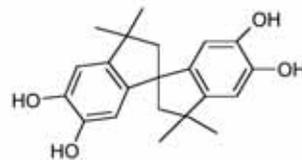
Sulla base della struttura cristallina del complesso tra il 5-CITEP ed il sito attivo dell'integrasi, sono stati realizzati modelli strutturali, per l'interazione di vari inibitori, attraverso il "computational docking".

Gli inibitori analizzati sono: 1,2,5,8-tetraidrossiantrachinone (QLZ), 3,3,3',3'-tetrametil-1,1'-spirobis(indan)-5,5',6,6'-tetrololo (TMS), acido L-cicorico (LCH), acido 4-acetilamino-5-idrossinaftalen-2,7-disolfonico (Y-3).

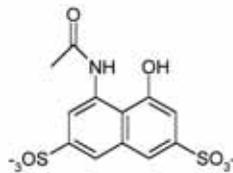
La struttura dei ligandi è riportata di seguito.



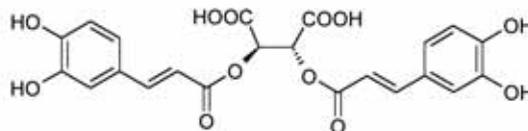
2 QLZ



3 TMS



4 Y-3



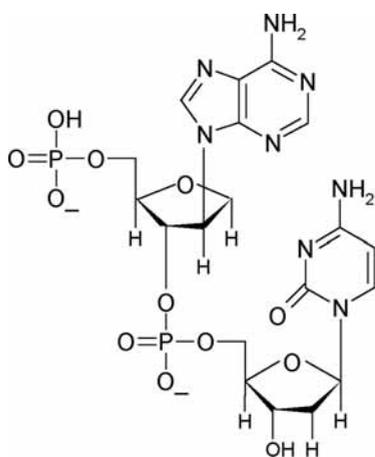
5 LCH

Attraverso la sovrapposizione dei risultati del docking, si osserva che i ligandi presentano caratteristiche comuni e mostrano interazioni con la proteina paragonabili: il sito di legame dell'inibitore risulta costituito da Asp-64, Lys-65, Thr-66, His-67, Glu-92, Asn-155, Lys-156 e Lys-159, in cui predominano i residui polari. Tra questi, un sito di primaria importanza per l'ancoraggio dei ligandi è quello tra i due residui di lisina.

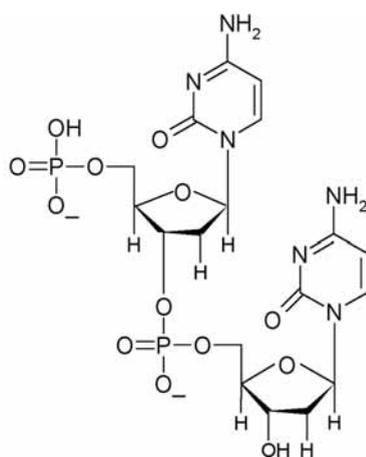
Attualmente non si hanno a disposizione strutture cocristallizzate del complesso DNA-integrasi, che sarebbero di notevole importanza per la progettazione di nuovi inibitori selettivi.²²

In assenza di queste informazioni, sono stati utilizzati mononucleotidi e dinucleotidi come sistemi modello per l'analisi delle interazioni DNA-proteine.

In uno di questi studi, due dinucleotidi modificati (**6** e **7**) sono stati inseriti nel sito attivo dell'integrasi, utilizzando il programma "Autodock".



6 pisoApdC



7 pdCpisodU

Questi dinucleotidi, in contrasto con la loro conformazione ammassata, assumono invece una conformazione distesa all'interno del sito catalitico. Ciò è dovuto alle estese interazioni favorevoli che si instaurano con i residui amminoacidici del sito attivo, che facilitano la formazione di un legame stabile tra i dinucleotidi e l'integrasi.

Sono stati, inoltre, identificati i siti di interazione con il DNA virale e il DNA cellulare: alcuni di questi siti sovrapponibili con il dominio catalitico dell'integrasi, interagiscono con il DNA virale, mentre un altro gruppo di siti, lontani dai primi, vanno ad interagire con il DNA cellulare.

L'interazione con il DNA virale risulta quindi sequenza-dipendente, mentre non lo è quella con il DNA cellulare.

Naturalmente è necessario lavorare ancora molto per migliorare le conoscenze sulle interazioni DNA-integrasi, indispensabili per lo sviluppo di nuovi inibitori selettivi.^{19,21}

MECCANISMO D'AZIONE DELL'INTEGRASI

Il processo di integrazione dell'HIV-1 comprende una serie di eventi molecolari che seguono il completamento della trascrizione inversa nel citoplasma della cellula infettata e che terminano con l'inizio della trascrizione del DNA provirale integrato.

Il prodotto della trascrizione inversa è rappresentato da una doppia elica lineare di DNA con specifiche sequenze LTR (Long Terminal Repeat) alle estremità terminali. Quest'ultime costituiscono il substrato per l'integrasi dell'HIV-1, l'enzima responsabile dell'inserimento del DNA virale nel cromosoma della cellula ospite ed essenziale per la replicazione del genoma virale. A questo scopo, l'integrasi catalizza una serie di reazioni consecutive (Figura 10).

Nel primo step del processo di integrazione, chiamato "3'-processing", l'enzima scinde due nucleotidi (GT) dall'estremità 3'-terminale del DNA virale, all'interno della sequenza LTR, che contiene il motivo CA altamente conservato.

Questa reazione avviene nel citoplasma, dove l'integrasi rimane associata al DNA virale, formando il complesso di preintegrazione (PIC), una grande struttura molecolare contenente proteine strutturali, proteine virali accessorie e nucleocapside. Il complesso viene poi traslocato attraverso la membrana nucleare per accedere al DNA della cellula ospite mediante un meccanismo ATP-dipendente, che consiste in un trasporto attivo attraverso i pori nucleari.

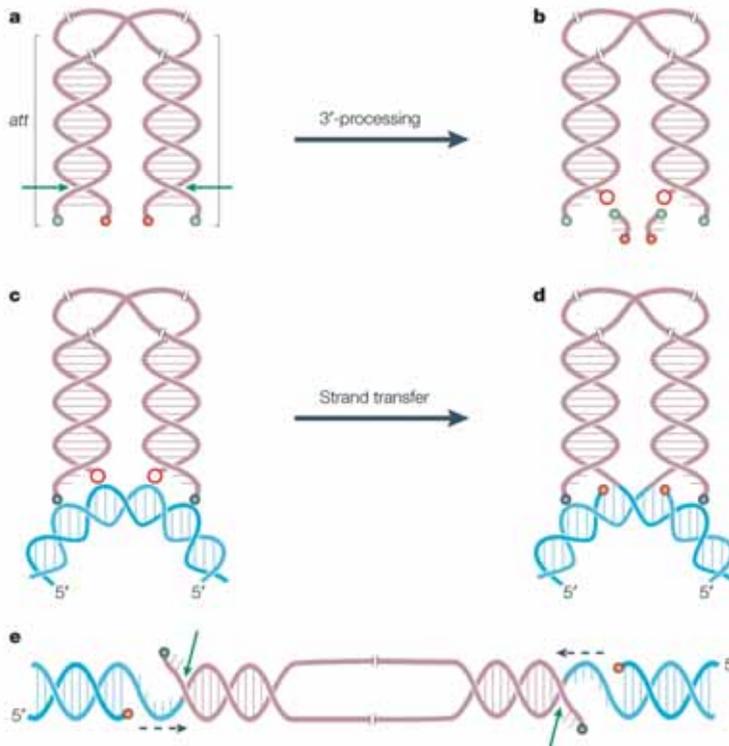


Figura 10. Reazioni catalizzate dall'integrasi: 3'-processing e strand transfer.

Nel nucleo ha inizio quindi il secondo step, chiamato "strand transfer", in cui l'integrasi catalizza l'associazione tra DNA virale e DNA della cellula ospite. Dal punto di vista chimico avviene un attacco nucleofilo del gruppo 3'-OH terminale, formatosi nel 3'-processing, con concomitante transesterificazione del gruppo 5'-fosfato del DNA cellulare.

Infine il processo di integrazione è completato dalla rimozione di un dinucleotide all'estremità 5'-terminale del DNA virale e il legame all'estremità 3' del DNA cellulare: questo step è chiamato "gap-filling" o anche "5'-processing".

Sia il legame dell'integrasi al DNA cellulare che il 3'-processing e lo strand-transfer, possono essere valutati con saggi *in vitro*, usando integrasi ricombinante purificato (espresso in *E. Coli*) ed oligonucleotidi sintetici, in presenza di cationi bivalenti (Mg^{2+} e Mn^{2+}). Sequenze oligonucleotidiche specifiche rappresentano l'estremità U3 o U5 delle regioni LTR del DNA virale (substrato bersaglio). Questi studi dimostrano che le sequenze specifiche U3 e U5 del DNA virale sono indispensabili per la formazione di un complesso stabile enzimaticamente attivo; inoltre l'integrasi, per esplicare la propria attività catalitica, richiede la presenza dei metalli bivalenti Mn^{2+} e Mg^{2+} , tra cui il primo risulta più attivo *in vitro*. *In vitro*, l'integrasi catalizza anche la reazione di disintegrazione: in questo processo, considerato come l'inverso dell'integrazione, l'integrasi scinde la porzione terminale del DNA virale e lega una porzione oligonucleotidica alle sequenze bersaglio vicine. Il significato biochimico di questa reazione durante il ciclo vitale del virus (*in vivo*) non è conosciuto, anche se è stato proposto un suo possibile ruolo nel 5'-processing.³⁻⁵

INIBITORI DELL'INTEGRASI

Il razionale terapeutico per lo sviluppo degli inibitori dell'integrasi è stato chiaro per molti anni, anche prima della recente convalida farmacologica dell'integrasi.⁴⁰ Effettivamente, l'integrasi è essenziale per la replicazione virale e l'assenza di una controparte nella cellula ospite implica che gli inibitori dell'integrasi non interferiscano con i processi cellulari normali e quindi abbiano un alto indice terapeutico. Nuovi farmaci da studiare e nuovi target da esplorare inoltre sono necessari, perchè è noto che le terapie anti-HIV combinate sono molto più efficaci delle monoterapie: questo è il motivo per cui i regimi HAART si sono trasformati nello standard di cura per i pazienti di AIDS. La terapia di combinazione inoltre riduce la comparsa di virus farmaco-resistenti e di mutazioni multiple che sono necessarie al virus per instaurare la farmaco-resistenza. Probabilmente, gli inibitori dell'integrasi si trasformeranno in un potenziale aggiuntivo all'HAART o in una terapia di salvataggio per i pazienti resistenti ai farmaci anti-HIV attualmente disponibili.

Nucleotidi

I nucleotidi agiscono molto probabilmente come inibitori competitivi dell'enzima nei confronti del DNA substrato.

Il primo di questa serie di inibitori è l'AZT (3'-azido-3'-deossitimidina) che presenta valori di IC_{50} superiori a 400 μM . I suoi derivati, l'AZT mono-, di-, e trifosfato, mostrano invece un IC_{50} per lo strand transfer nel range di 100-150 μM .

Il gruppo fosfato sembra quindi fondamentale per l'attività inibitoria, interagendo con una carica positiva presente nel sito attivo.

Dall'analisi di altri analoghi nucleotidici, si nota che la struttura e la conformazione della porzione ribosidica, molto più che la base o il gruppo fosfato, sono importanti ai fini dell'attività: questo conferma l'esistenza di un sito di legame specifico per i nucleotidi sull'integrasi.^{41,42}

Dinucleotidi

I dinucleotidi mostrano maggiore attività rispetto ai mononucleotidi; al contrario di questi, però, la presenza del gruppo 5'-fosfato non è indispensabile ai fini della loro attività. Dallo studio delle numerose possibili combinazioni dei dinucleotidi, è emerso che esiste una certa selettività per l'inibizione dell'integrasi.

Ad esempio, i dinucleotidi 5'-pCT, 5'-pAC e 5'-pAT, con valori di IC_{50} intorno a 10 μM per il 3'-processing e lo strand transfer, risultano gli inibitori più potenti.

Inoltre anche i dinucleotidi 5'-pAA, 5'-pGA e 5'-pGC mostrano una buona attività, con valori di IC_{50} pari a 100 μM .

Il dinucleotide 5'-CA, che corrisponde alla sequenza conservata LTR richiesta per l'attività dell'integrasi, è risultato più selettivo nei confronti delle strand transfer ($IC_{50} = 60 \mu M$) rispetto al 3'-processing ($IC_{50} > 132 \mu M$).

Fino ad oggi, nessuno dei dinucleotidi naturali testati ha mostrato un'attività antivirale: un grave inconveniente di questa classe di inibitori consiste nella loro rapida degradazione *in vivo*. Sono stati quindi sintetizzati dinucleotidi modificati per incrementare la loro stabilità. Un esempio di questi dinucleotidi non-naturali sono il piosApdC (6) e il pdCpisodU (7), che inibiscono le attività di 3'-processing e strand transfer con valori di IC_{50} di 30 μM e 25 μM (6), e 7.5 μM e 5.9 μM (7), rispettivamente.

È interessante notare che il pdCisodU (7) ha mostrato una inusuale resistenza nei confronti della 3' e 5'-esonucleasi, a differenza dei dinucleotidi naturali, che vengono invece prontamente degradati.

Per le loro caratteristiche, sono stati inoltre utilizzati negli studi di cocristallizzazione con l'integrasi, per la determinazione della

struttura e dei siti di legame degli inibitori.^{21,41,42}

Quartetti di guanosina

I quartetti di guanosina (G4) sono oligonucleotidi formati esclusivamente da deossiguanosina e timidina, i loro valori di IC_{50} sono due-quattro ordini di grandezza più bassi rispetto ai mononucleotidi.

Questi oligonucleotidi sono più attivi quando l'integrasi, su cui si effettua il saggio, contiene il dominio terminale che lega lo Zn^{2+} : ciò sembra dovuto alla possibilità da parte dei quartetti di guanosina di legare sia il sito attivo sia il dominio N-terminale dell'integrasi dell'HIV-1.^{41,42}

Peptidi

Tra gli inibitori di natura proteica ricordiamo un peptide costituito da 30 amminoacidi, con una sequenza analoga alla porzione 147-175 dell'integrasi: esso riduce la capacità di integrazione probabilmente formando un legame con la sequenza omologa. Anche le proteine vegetali GAP31 e MAP30 mostrano attività anti-integrasica e, poiché non riescono a penetrare nelle cellule, risultano non tossiche.

Altri inibitori dell'integrasi, di origine naturale, sono le complestatine e le integramidi, isolate da estratti microbici.

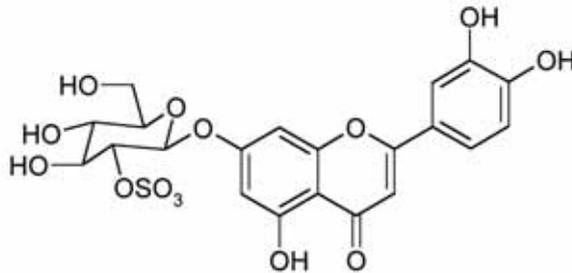
L'isocomplestatina, isomero della complestatina, mostra un IC_{50} pari a 0.2 μM per il 3'-processing e 4.0 μM per lo strand transfer. La cloropeptina I, un esapeptide biciclico, è invece meno attiva, con valori di IC_{50} pari a 0.4 μM (3'P) e 5.0 μM (ST). Dall'idrolisi selettiva della cloropeptina I sono stati ottenuti due composti, risultati anch'essi attivi nell'inibire il 3'-processing e lo strand transfer.

Infine, altri due peptidi che hanno mostrato attività inibitoria anti-integrasi sono le Integramidi A e B, peptidi lineari ricchi in α -metil-amminoacidi. Risultano in complesso meno attivi dei composti naturali sopra menzionati: inibiscono infatti il 3'-processing con valori di IC_{50} pari a 17 μM e 10 μM rispettivamente, e lo strand transfer con un IC_{50} pari a 60 μM . Sono purtroppo inattivi nell'inibire la replicazione virale in colture cellulari a causa della loro citotossicità.²¹

Solfati e Solfonati

Di questa classe fa parte il composto Y3 (**4**), che inibisce l'integrasi dell'HIV-1 e dell'ASV, e mostra attività anti-virale nei confronti di cellule infettate da HIV-1.

Di origine naturale sono invece le talassioline, glicosidi solfato-flavoni, estratte dalla pianta marina *Thalassia testudinum*: tra queste, la talassiolina A (**8**) inibisce sia il 3'-processing che lo strand transfer con valori di IC_{50} pari a $2.1 \mu\text{M}$ e $0.4 \mu\text{M}$, rispettivamente.



8 Talassiolina A

Il gruppo β -D-glucopiranosil-2''-solfato, che differenzia le talassioline dai flavoni, sembra essere responsabile dell'incremento di attività nei confronti dell'integrasi.

La talassiolina A inibisce inoltre la replicazione virale in colture cellulari con una EC_{50} pari a $30 \mu\text{M}$.

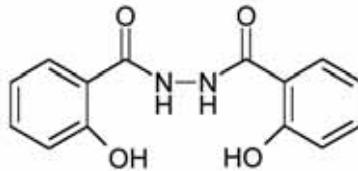
Altri derivati appartenenti a questa classe, gli steroli solfato, isolati da alcune spugne delle Filippine (*Xestospongia sp.*), inibiscono l'integrasi con valori di IC_{50} compresi tra 0.53 e $3.1 \mu\text{M}$.

In generale si può affermare che i polisolfati e i solfonati, come composti carichi negativamente, sono molecole con alta attività

inibitoria nei confronti di vari enzimi, tra i quali l'integrasi del virus HIV-1.²¹

Mercaptosalicilidrazidi

Le mercaptosalicilidrazidi sono composti che hanno un'attività inibitoria legata alla loro capacità di legare i metalli bivalenti. Derivano dalla salicilidrazide (**9**), rispetto alla quale risultano meno tossici, e mostrano attività inibitoria selettiva nei confronti dell'integrasi.



Salicilidrazide

$IC_{50} = 2.0 \mu\text{M}$ (3'P)

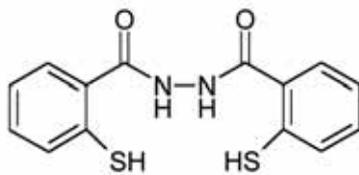
$IC_{50} = 0.7 \mu\text{M}$ (ST)

La salicilidrazide inibisce sia il 3'-processing che lo strand transfer, con una IC_{50} pari a $2.0 \mu\text{M}$ e $0.7 \mu\text{M}$ rispettivamente, in presenza del Mn^{2+} , mentre risulta totalmente inattiva in presenza del Mg^{2+} .

Le mercaptosalicilidrazidi derivate (**10** e **11**), invece, inibiscono l'integrasi in presenza sia dell'uno che dell'altro metallo. La loro attività inibitoria consiste nel bloccare il legame dell'integrasi al DNA substrato, inibendo quindi la formazione del complesso IN-DNA.

Le mercaptosalicilidrazidi possiedono infatti uno o due mercapto-gruppi liberi che legano la Cys-65 nel sito attivo dell'integrasi e

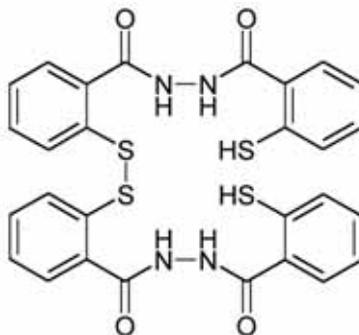
chelano il metallo bivalente con la funzione dichetonica.^{21,43}



9

IC₅₀ = 5.1 μM (3'P)

IC₅₀ = 5.0 μM (ST)



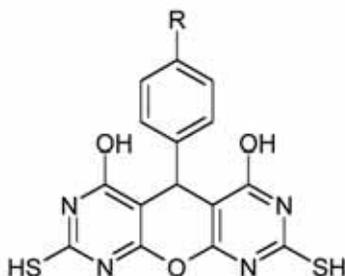
10

IC₅₀ = 3.2 μM (3'P)

IC₅₀ = 3.7 μM (ST)

Dipirimidine

Questa classe di inibitori dell'integrasi comprende una serie di derivati del 5-fenil-5*H*-pirano[2,3-d:-6,5-d']dipirimidina, variamente sostituite nella posizione 5 del pirano, (PDPs): tra questi, solo i composti **12** e **13**, che possiedono una funzione sulfidrilica inibiscono l'integrasi e mostrano attività antivirale in colture cellulari; i congeneri con un gruppo ossidrilico al posto del mercapto-gruppo, sono risultati invece inattivi.



12 R = Cl

IC₅₀ = 0.9 μM (3'P)

IC₅₀ = 1.0 μM (ST)

13 R = NO₂

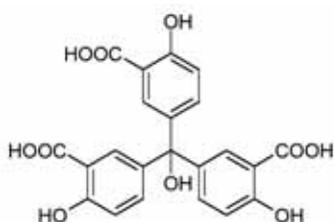
IC₅₀ = 0.9 μM (3'P)

IC₅₀ = 0.3 μM (ST)

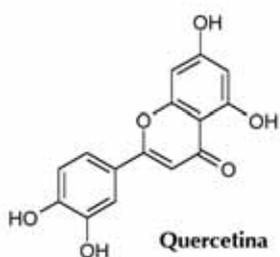
Il composto **12** inibisce le reazioni di 3'-processing e strand transfer con valori di IC₅₀ pari a 0.9 μM e 1.0 μM; il composto **13**, il più attivo di questa serie, presenta una IC₅₀ per il 3'-processing e lo strand transfer pari a 0.9 μM e 0.3 μM rispettivamente, ed un valore di EC₅₀ (nei confronti di cellule HIV-1 III_B) pari a 8.9 μM. In aggiunta, il composto **13** ha mostrato attività antivirale nei confronti di ceppi di HIV resistenti agli inibitori della trascrittasi inversa.^{21,44}

Composti ossidrilati

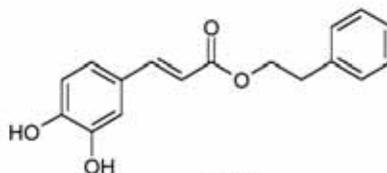
Tra i composti ossidrilati, uno dei primi a mostrare attività anti-integrasi è stato l'acido aurintricarbossilico. Dopo di questo, altre molecole polioidrossilate, sia naturali che sintetiche, si sono rivelate inibitori dell'integrasi: la quercetina, l'estere fenilico dell'acido caffeico (CAPE) e le ammidi ad esso correlate, bis-catecoli come la curcumina, la tirfostina, l'acido L-cicorico (L-CCA) e l'acido 3,5-dicaffeoilchinico (3,5-DCQA).



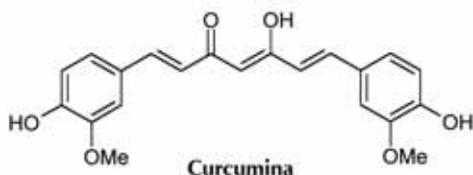
Acido Aurintricarbossilico



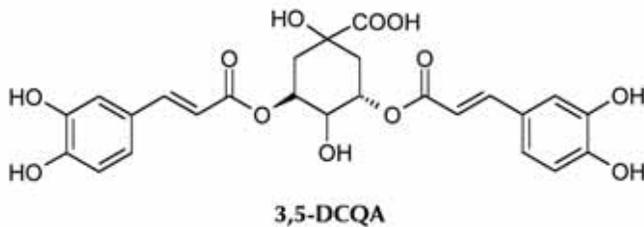
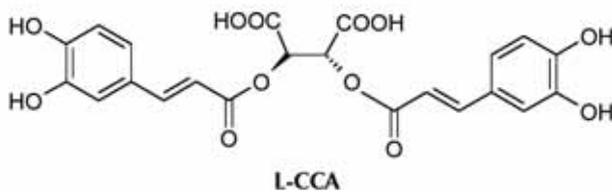
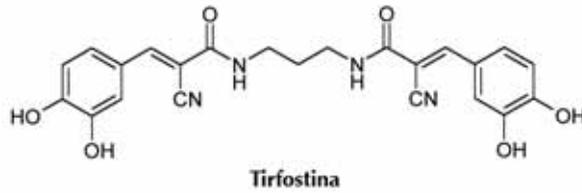
Quercetina



CAPE



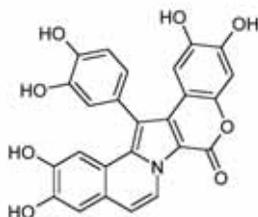
Curcumina



Sfortunatamente, solo pochi di essi hanno mostrato attività nei saggi cellulari. Le uniche eccezioni sono l'acido L-cicorico ed alcuni acidi dicaffeoilchinici che, oltre ad essere inibitori potenti e specifici dell'integrasi, inibiscono la replicazione del virus HIV-1 nelle cellule infettate a concentrazioni non citotossiche. Moderatamente attivo nei saggi cellulari si è mostrato anche un altro inibitore poliossidrilato, la curcumina, estratta dai rizomi della *Curcuma longa*, che presenta anche attività antinfiammatoria e antitumorale. La modesta attività presentata dalla curcumina

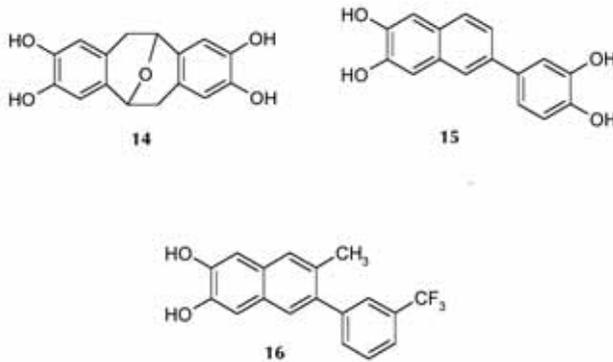
è probabilmente dovuta alla sostituzione del gruppo catecolico con il sistema *o*-metossiidrossi: sembra, infatti, che il catecolo sia indispensabile per l'inibizione dell'attività enzimatica.^{41,42}

Tra i composti ossidrilati di origine naturale che contengono il sistema catecolico, vanno ricordati gli analoghi delle lamellarine, un gruppo di alcaloidi esaciclici, isolate da molluschi appartenenti al genere *Lamellaria*. Il composto più attivo di questa serie di derivati è la lamellarina H, che presenta una IC₅₀ per lo strand transfer pari a 1.3 μM.



Lamellarina H

Sebbene questo composto inibisca l'integrasi a basse concentrazioni micromolari, è risultato un inibitore non-selettivo e mostra una elevata citotossicità (CC₅₀ = 5.7 μM).²¹ Sulla base di tali risultati sono stati quindi sintetizzati diversi derivati di origine catecolica ed è stata valutata la loro attività inibitoria. Quelli che hanno mostrato una maggiore attività anti-integrasica sono i seguenti:



Essi inibiscono il 3'-processing con una IC₅₀ pari a 1.3 μ M (**14**), 2.1 μ M (**15**), 13 μ M (**16**) e mostrano una certa attività antivirale con una EC₅₀ pari a 98 μ M (**14**), 9.9 μ M (**15**) e 5.7 μ M (**16**).

Non è stato ancora chiarito completamente il meccanismo molecolare di interazione tra l'enzima e questi composti, che potrebbe consistere nella coordinazione del gruppo catecolico con i cationi bivalenti (Mn²⁺ e Mg²⁺), necessari per la catalisi enzimatica, oppure nella formazione di legami idrogeno, in cui gli ossidrili si comportano da donatori, con siti specifici del dominio catalitico dell'enzima.²¹

Bisogna comunque considerare che il gruppo catecolico può subire, *in vivo*, un processo di ossidazione che porta alla formazione di chinoni, specie molto reattive e facilmente attaccate da nucleofili endogeni (Figura 11).

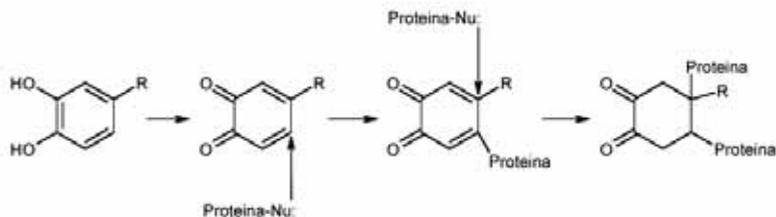
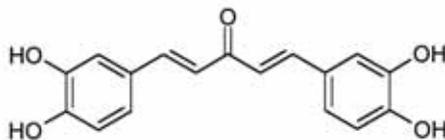


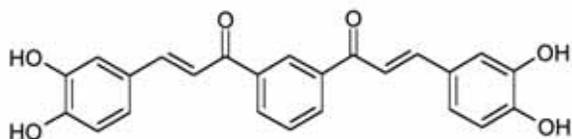
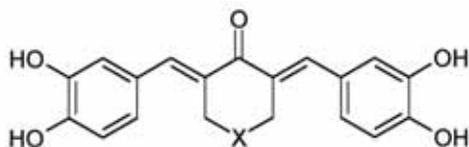
Figura 11. Ossidazione del gruppo catecolico e attacco nucleofilo da parte delle proteine endogene.

Queste reazioni sono alla base della tossicità dei derivati catecolici, giustificando la loro scarsa attività nei saggi cellulari a concentrazioni subcitotossiche.

Nel tentativo di migliorare l'attività dei derivati catecolici, sono stati sintetizzati diversi composti (**17-19**), caratterizzati da una struttura cinnamoilica e da una disposizione *syn* dei doppi legami C=C e C=O. Questa costrizione geometrica o conformazionale, osservata nella curcumina (composto poliossidrilato naturale attivo come inibitore dell'integrasi), causa infatti un aumento di attività sulle cellule infettate. Sebbene questi composti mostrino la caratteristica citotossicità del sistema catecolico, alcuni derivati sono risultati potenti inibitori dell'integrasi nei saggi enzimatici.⁴⁵



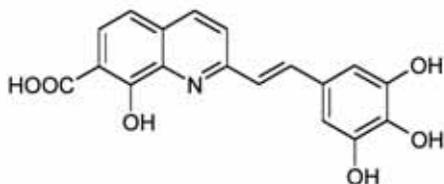
17 $IC_{50} = 0.6 \mu M$ (3'P)

**18**IC₅₀ = 0.6 μM (3'P)**19**X = O, S, NH, NR, CH₂

I più attivi di questo gruppo di inibitori sono risultati i derivati del cicloesanoone (**19**), con valori di IC₅₀ tra 0.2 e 0.9 μM.

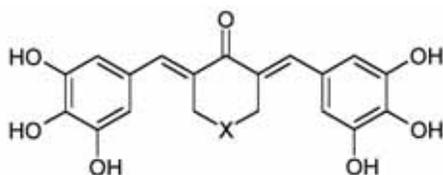
Inoltre, analisi 3D QSAR CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) e CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) e simulazioni di docking, condotti su questi composti, hanno documentato l'importanza del legame idrogeno di questi inibitori nell'interazione con il sito attivo dell'enzima.⁴⁶

L'attività mostrata in particolare da alcune stililcholine sostituite, tra cui il composto **20**, capaci di inibire l'integrasi e bloccare la replicazione dell'HIV-1 in colture cellulari, ha evidenziato la possibilità di sostituire il gruppo 3,4-diidrossicinnamoile con il gruppo 3,4,5-triidrossicinnamoile.



20

Questi composti conservano infatti la capacità di chelare i cationi bivalenti e formare legami idrogeno e, allo stesso tempo, mostrano una minore citotossicità, peculiare del sistema catecolico. Sono stati perciò progettati e sintetizzati nuovi inibitori a struttura triidrossicinnamoilica, analoghi dei derivati catecolici precedentemente descritti (Figura 12).



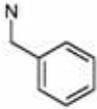
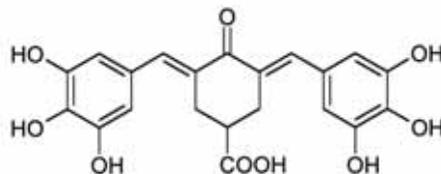
X	IC ₅₀ (3P)	IC ₅₀ (ST)	EC ₅₀	CC ₅₀
S	0.7 μM	0.5 μM	20 μM	100 μM
O	6.0 μM	9.0 μM	34 μM	115 μM
	0.7 μM	1.1 μM	30 μM	117 μM

Figura 12. Attività dei triidrossicinnamoilderivati.

Rispetto ai diidrossiderivati, presentano una più potente attività inibitoria nei confronti dell'integrasi, sono meno tossici ed, inoltre, sono attivi anche nei saggi cellulari, rivelandosi in grado di inibire la moltiplicazione virale a concentrazioni inferiori a quelle citotossiche. Tutto ciò sembra dovuto all'introduzione del terzo ossidrilico, che riduce il processo di alchilazione delle proteine cellulari ed è posizionato in una porzione della molecola pienamente coinvolta nella formazione del legame idrogeno con il bersaglio biologico.⁴⁶

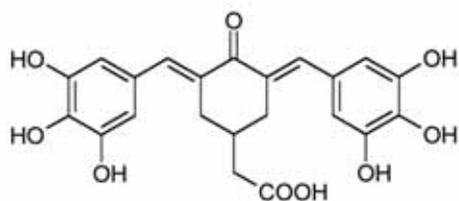
Inoltre, la correlazione tra la presenza di gruppi carbossilici e l'attività nei confronti dell'integrasi e sulla moltiplicazione dell'HIV-1 nelle cellule infettate, osservata nell'acido L-cicorico e nelle stirilchinoline, ha giustificato l'introduzione della funzione carbossilica nei triidrossicinnamoilderivati (**21-23**). Grazie a questo, è stata aumentata di molto la potenza degli inibitori, probabilmente per le interazioni addizionali del gruppo carbossilico con la Lys-156 e la Lys-159, presenti nel sito catalitico dell'HIV-1 integrasi.^{45,46}

**21**

$IC_{50} = 0.2 \mu M$ (3'P)

$IC_{50} = 0.3 \mu M$ (ST)

$EC_{50} = 4 \mu M$

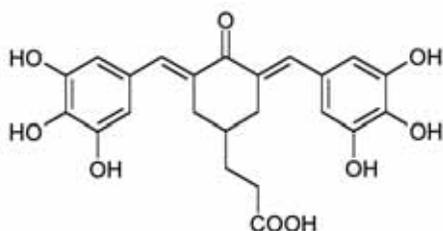


22

IC₅₀ = 0.2 μM (3'P)

IC₅₀ = 0.2 μM (ST)

EC₅₀ = 2 μM

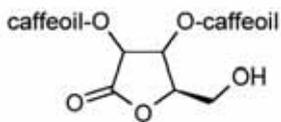
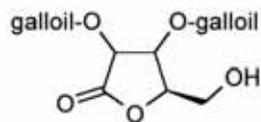


23

La ricerca di nuovi composti poliossidrilati come inibitori dell'integrasi è stata abbandonata in seguito alla scoperta che l'attività dell'acido L-cicorico e dei suoi analoghi nei confronti dell'HIV *in vivo* non è legata all'inibizione dell'integrasi, ma al blocco della "viral entry". Tali derivati agiscono quindi principalmente sul legame della cellula alla proteina virale *gp120*.

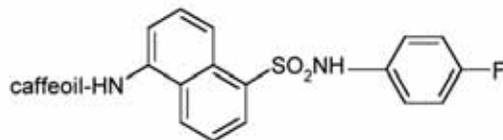
Caffeoil- e Galloil-derivati

Negli ultimi anni sono stati sintetizzati una serie di inibitori, analoghi dell'acido L-cicorico(L-CCA) e dell'acido 3,5-dicaffeoilchinico (3,5-DCQA), che hanno come caratteristica strutturale comune quella di essere esteri dell'acido caffeico separati da un anello a cinque termini come linker (idrofurano) (**24**).

**24**IC₅₀ = 22.4 μM**25**IC₅₀ = 4.7 μM

Sostituendo il gruppo caffeoile con il gruppo galloile, si ha un netto aumento dell'attività inibitoria. I derivati digalloilici (**25**) risultano due-cinque volte più potenti dell'acido L-cicorico contro l'integrasi; non sono comunque attivi nei saggi cellulari, perché risultano citotossici.⁴⁷

Tra gli inibitori che presentano il gruppo caffeoile, sono stati introdotti i derivati della caffeoil-naftalen-solfonammide (**26**), che mostrano un'attività anti-integrasi paragonabile o maggiore a quella dell'acido L-cicorico.

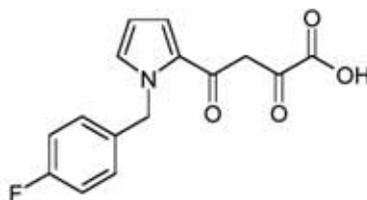
**26**IC₅₀ = 7.9 μM

La struttura di questi composti mostra due anelli aromatici condensati, uno dei quali lega il gruppo caffeoile mentre l'altro lega il gruppo solfonammidico. Quest'ultimo generalmente si trova legato ad un anello aromatico sostituito con gruppi elettron-attrattori, che potenziano l'attività inibitoria. Ciò potrebbe essere dovuto alle interazioni di tipo idrofobico e ai legami di van der Waals che si instaurano tra le catene laterali degli inibitori e l'integrasi.

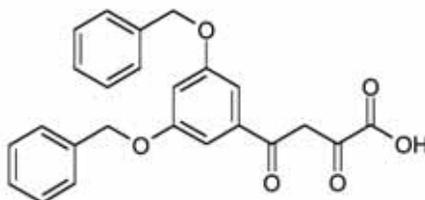
Purtroppo nessuna di queste caffeoil-solfonammidi mostra attività inibitoria nei confronti della replicazione dell'HIV in saggi cellulari a concentrazioni non-tossiche. Questo potrebbe essere dovuto alla mancanza della funzione carbossilica presente invece nell'acido L-cicorico, che risulta attivo nei confronti delle cellule infettate da HIV.⁴⁸

Arildichetoacidi

Gli arildichetoacidi costituiscono una classe di composti in grado di inibire in modo specifico l'integrasi del virus HIV-1. I lead-compounds per questa classe di inibitori sono i dichetoacidi L-731,988 (**27**) e L-708,906 (**28**).



27 L-731,988
 $IC_{50} = 0.17 \mu\text{M}$ (3'P)
 $IC_{50} = 6 \mu\text{M}$ (ST)



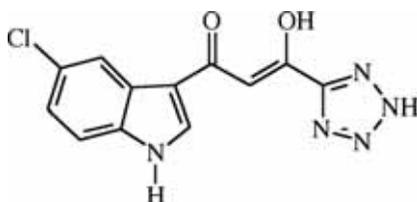
28 L-708,906
 $IC_{50} = > 1000 \mu\text{M}$ (3'P)
 $IC_{50} = 0.48 \mu\text{M}$ (ST)

I dichetoacidi possono essere considerati degli inibitori selettivi dello strand transfer in quanto impediscono la replicazione dell'HIV-1, bloccando tale step dell'integrazione, a concentrazioni significativamente più basse delle concentrazioni richieste per inibire il 3'-processing. Sebbene siano richiesti gli stessi residui all'interno del sito attivo sia per il 3'-processing che per lo strand transfer, i dichetoacidi sembrano in grado di discriminare tra le

due funzioni catalitiche.

L'associazione dell'integrasi con le sequenze LTR, sembra portare alla formazione di un complesso attivo e stabile. È stato dimostrato che il composto L-731,988 riconosce l'integrasi esclusivamente nel contesto di una proteina cataliticamente attiva, associata all'estremità del DNA virale. Esso si lega al sito attivo dell'integrasi ed inibisce lo strand transfer competendo con il DNA substrato.⁴⁹

Un analogo strutturale dei dichetoacidi è il 5-CITEP (**1**), in cui la porzione dichetonica connette un tetrazolo (isostero del residuo acido) ad un anello idrofobico.



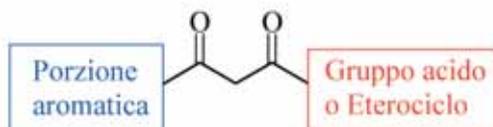
1 5-CITEP

Il 5-CITEP lega l'integrasi anche in assenza del DNA substrato, senza provocare sostanziali modificazioni conformazionali nella proteina.⁵⁰

Gli studi condotti sui composti **27** e **28** hanno dimostrato che essi, oltre ad essere molto attivi nei saggi enzimatici, sono anche dei potenti inibitori del complesso di preintegrazione. Nei saggi cellulari, inibiscono la replicazione dell'HIV-1 con una EC₅₀ rispettivamente di 1 e 2 μM. Sono inoltre attivi contro ceppi mutanti di HIV-1, resistenti agli inibitori della proteasi e della trascrittasi inversa.⁴⁹ Recentemente sono stati sintetizzati una serie di derivati analoghi a quelli descritti in precedenza, basandosi sulla struttura del 5-CITEP e dell'L-708,906, e ne è stata valutata la loro attività anti-

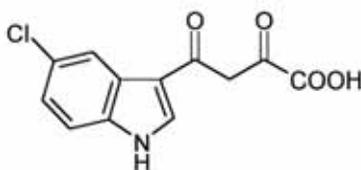
rile e anti-integrasi.

Queste molecole presentano come motivo comune un linker β -dichetopropanico, ma differiscono sostanzialmente nella porzione aromatica e nel gruppo acido.



Per osservare l'influenza della funzione acida sull'inibizione dell'HIV-1, è stato testato un analogo del 5-CITEP, nel quale il tetrazolo è stato sostituito con un gruppo carbossilico (**29**).

Questo composto mostra un'attività inibitoria dell'integrasi paragonabile a quella del 5-CITEP, confermando che il tetrazolo ed il gruppo carbossilico sono bioisosteri.



29

$IC_{50} = 65 \mu M$ (3'P)

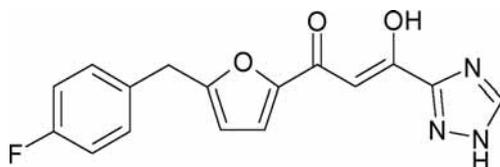
$IC_{50} = 0.52 \mu M$ (ST)

Dal momento che il composto **29** e L-708,906 (**28**), differiscono unicamente nella porzione aromatica, questa parte della molecola è ritenuta responsabile della differenza osservata nell'inibizione del 3'-processing e della selettività dei dichetoacidi per lo strand

transfer.^{51,52}

Inoltre è stato osservato che per il legame del dichetoacido con l'integrasi sono necessari gli ioni bivalenti e che i derivati isosterici dei dichetoacidi possono esibire metallo-specificità. Infatti i composti che presentano la funzione carbossilica legano sia il Mn^{2+} che il Mg^{2+} , mentre quelli che presentano anelli eterociclici contenenti atomi di azoto hanno alta affinità per il Mn^{2+} .²¹

A questa classe di inibitori appartiene anche il composto S-1360 (**30**), sintetizzato dalla Shionogi-GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, attualmente sottoposto a studi clinici di fase II.



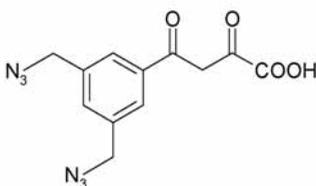
30 S-1360

L'S-1360 è un potente inibitore dell'integrasi di HIV-1 *in vitro*, con valori di IC_{50} pari a 20 nM, e mostra una notevole attività antivirale (EC_{50} pari a 140 nM), con effetto citotossico solo ad elevata concentrazione ($CC_{50} = 110 \mu M$). Il composto è attivo contro ceppi di HIV-1 con tropismo verso cellule T e macrofagi ed inibisce la replicazione di virus HIV-1 resistenti agli inibitori della trascrittasi inversa e della proteasi. L'S-1360 ha dimostrato un'attività sinergica *in vitro* se usato in combinazione con vari inibitori nucleosidici e non-nucleosidici della trascrittasi inversa e in combinazione con inibitori della proteasi, come azidotimidina (AZT), lamivudina, nevirapina e nelfinavir.⁵³

Nello studio di nuovi inibitori dell'integrasi, sono stati recentemente introdotti gli azido-aril- β -dichetoacidi, in cui il gruppo N_3

rimpiazza un arile degli inibitori tradizionali.

Il composto **31** mostra un'attività inibitoria nei confronti dell'integrasi, paragonabile a quella dell'L-708,906 di cui è strutturalmente analogo, ed un'attività antivirale in colture cellulari, ma soprattutto mostra una bassa citotossicità ($CC_{50} > 50 \mu\text{M}$).



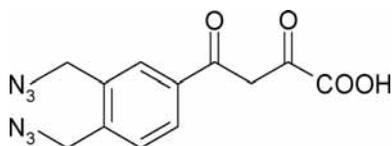
31

$IC_{50} = >100 \mu\text{M}$ (3'P)

$IC_{50} = 2.0 \mu\text{M}$ (ST)

$EC_{50} = 5 \mu\text{M}$

L'inaspettata capacità del gruppo azido di sostituire la funzione arilica, ha indotto ad esaminare questa classe di composti ed alla sintesi di numerosi derivati, tra cui il più attivo è il seguente:



32

$IC_{50} >100 \mu\text{M}$ (3'P)

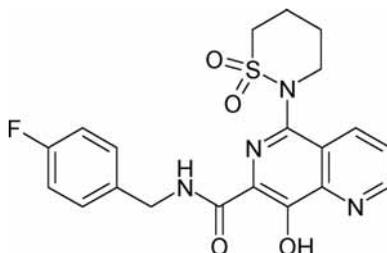
$IC_{50} = 0.26 \mu\text{M}$ (ST)

$EC_{50} = 14.3 \mu\text{M}$

L'analogo 3,4-disostituito **32** risulta approssimativamente dieci volte più attivo del composto **31** 3,5-disostituito. Questo aumento di attività può essere potenzialmente attribuito all'orientamento preferenziale del gruppo azido, indotta dalla *orto*-disostituzione. Inoltre dall'analisi di mono-azido derivati, risulta che entrambi i gruppi sono importanti ai fini dell'attività inibitoria.

Di notevole importanza sono anche le proprietà steriche ed elettroniche: infatti le azidi sono stericamente caratterizzate da una geometria lineare e presentano una regione terminale, con un potenziale elettrostatico negativo, che interagisce con gli ioni metallici bivalenti all'interno del sito attivo dell'enzima.⁵⁴

La Merck Research Laboratories ha recentemente proposto una nuova classe di inibitori dell'integrasi, le naftiridin-carbossamidi, derivati strutturalmente dai dichetoacidi. Il composto L-870,810 (**33**) è attualmente sottoposto a studi clinici di fase I.



33 L-870,810

IC₅₀ = 0.01 μM

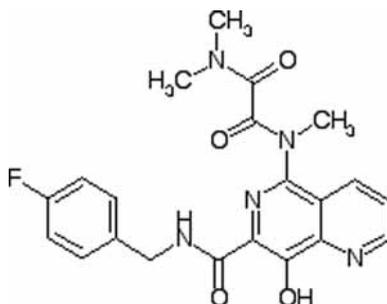
EC₅₀ = 0.004 μM

CC₅₀ = > 5 μM

Il composto L-870,810 è un inibitore potente e selettivo dello strand transfer, e mostra un buon profilo farmacocinetico e una maggiore biodisponibilità nei confronti dei dichetoacidi precedentemente riportati.

L-870,810 inibisce l'attività integrasica ST *in vitro* con valori di IC₅₀ pari a 0.01 μM e presenta attività antivirale con valori di EC₉₅ pari a 0.019 μM nei saggi cellulari.

Ulteriori sforzi di sintesi e di ottimizzazione condotti dal gruppo Merck hanno recentemente condotto al derivato L-870,812 (**34**).



34 L-870,812

Esso è un promettente lead per lo sviluppo terapeutico grazie alla sua selettività anti-integrasi, della sua potenza anti-virale e del suo profilo farmacocinetico favorevole (biodisponibilità orale > 60% ed emivita di circa 5 ore nei macachi rhesus). L'attività antivirale di L-870,812 è stata recentemente dimostrata: il composto è infatti in grado di abbattere la carica virale così come le infezioni croniche nei macachi rhesus infettati con il Simian Immunodeficiency Virus.⁴⁰

Il successo clinico dei composti S-1360 e L-870,810 potrebbe rappresentare una scoperta importante nello sviluppo dei dichetoacidi e dei loro analoghi come inibitori dell'integrasi.⁵⁵

L'inibizione selettiva dello strand transfer a concentrazioni nanomolari è una caratteristica degli arildichetoacidi (DKAs), anche se il CAPE è stato il primo inibitore dello strand transfer ad essere riportato in letteratura. Tuttavia i benefici di tale inibizione selettiva

va nel trattamento dell'infezione da HIV-1 sono emersi soltanto con la descrizione dei DKAs più potenti. Di conseguenza, gli aril-dichetoacidi sono i primi inibitori dell'integrasi a fornire la prova del concetto che l'inibizione selettiva dello strand transfer può far effettivamente diminuire l'infezione da HIV.

Un metallo bivalente è richiesto come cofattore per il legame del DKA all'integrasi e l'inibizione dell'integrasi può essere dipendente da un catione divalente. Per esempio, la IC_{50} di L-708,906 per il 3'-processing è 2.5 μM in Mg^{2+} e 22 μM in Mn^{2+} , mentre la relativa IC_{50} per lo strand transfer è paragonabile con entrambe i metalli (selettività = 0.06). La selettività per lo strand transfer può anche metallo-bivalente dipendente. Sia il L-708,906 che il 5CITEP hanno inibizione approssimativamente dieci volte più alta in presenza di Mn^{2+} rispetto al Mg^{2+} . Inoltre, il 5CITEP è un inibitore molto migliore in Mn^{2+} che in Mg^{2+} (uno-due ordini di grandezza più potente). Nonostante la loro selettività per lo strand transfer, i DKAs possono anche inibire il 3'-processing, anche se a volte sono necessarie concentrazioni 30-70 volte maggiori. Gli studi SAR hanno rivelato il contributo dato all'inibizione dell'integrasi dalle parti acide ed aromatiche dei dichetoacidi. L'attività relativamente scarsa del 5CITEP in Mg^{2+} è dovuta alla funzione tetrazolica; ciò è dimostrato dal fatto che rimpiazzando il tetrazolo con un carbossilato marcato aumenta l'attività inibitoria del composto ibrido in Mg^{2+} . Il carbossilato, quindi, potrebbe essere importante per la chelazione del metallo. La porzione carbossilica, tuttavia, non è indispensabile per il legame al complesso dell'integrasi. Gli studi SAR rivelano che la parte aromatica è cruciale per la potenza e per la selettività nei confronti dello strand transfer. La parte aromatica può ospitare una vasta gamma di sostituenti, compreso l'azido-gruppo. La porzione azidica dei dichetoacidi contribuisce a ridurre la citotossicità e potrebbe avere un

ruolo diretto nella chelazione del metallo. Il dichetogruppo o il gruppo funzionale β -idrossichetonico sono noti per la loro capacità di chelare i metalli e l'inibizione metallo-dipendente dei DKAs è stata interpretata come l'indicazione di un'interazione diretta di questi farmaci con il metallo bivalente nel sito catalitico dell'enzima. La coordinazione del metallo è stata inoltre importante per predire un modello della tasca catalitica dell'integrasi e del sito legante i DKAs.

Il legame molecolare dei DKAs ai complessi di integrazione è stato al centro di un'accesa ricerca a causa dell'importanza dei DKAs e dei farmaci DKA-simili come lead compound antivirali e per il loro particolare meccanismo d'azione. L'alta selettività dei DKAs per lo strand transfer porta ad un modello in cui i due siti catalitici sono organizzati intorno ai tre residui del motivo DDE ed al metallo bivalente all'interno dei complessi integrasi-DNA (Figura 13).

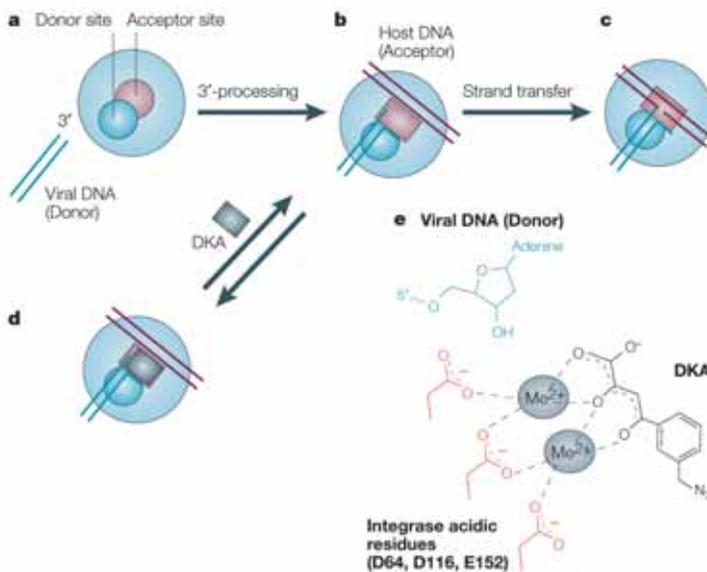


Figura 13. Meccanismo d'azione dei DKAs.

In questo modello, il sito del DNA donatore (donor site, Figura 13) lega l'estremità del DNA donatore (virale) e catalizza il 3'-processing. Di conseguenza, l'integrasi subisce un mutamento strutturale che permette il legame del DNA (cromosomico) dell'accettore nel sito dell'accettore (acceptor site, Figura 13) per lo strand transfer. I DKAs si legherebbero selettivamente ad una unica conformazione del sito accettore dopo il legame del DNA virale ed il 3'-processing. Solo allora si avrebbe un cambiamento conformazionale del sito accettore per i DKA-ligandi. Secondo questo schema, la coordinazione bivalente del metallo sarebbe cruciale per il legame del DKA al sito accettore (Figura 13e).

Questo modello è sostenuto dalle analisi di scintillazione con composti marcati, che ha dimostrato il legame dei DKAs ad un intermedio del PIC in presenza di Mg^{2+} o di Mn^{2+} . Il legame dei DKAs richiede un'integrasi funzionale, poichè i mutanti e gli enzimi cataliticamente inattivi non sono riusciti a legare i DKAs. I farmaci legati richiedono invece le estremità virali del DNA, poichè un DNA non specifico non riesce ad essere legato. Per concludere, i DKAs non riescono a legarsi efficacemente al DNA-target nella reazione di strand transfer.

Le caratteristiche strutturali del sito legante i DKAs possono anche essere dedotte dalle mappe dei residui amminoacidici connessi con la DKA-resistenza nella struttura cristallina dell'integrasi (Figura 14). I mutanti dell'integrasi sono stati selezionati da DKA con mutazioni nel CCD (ed una nel CTD). I residui dell'amminoacido all'interno del CCD che conferiscono resistenza sono raggruppati intorno al sito catalitico definito dai residui del DDE (Figura 14a,c).

Questa serie di overlap coincide con la serie di overlap dei residui interessati al legame del DNA (Figura 14b,d). Un residuo (Q148) è comune ad entrambe le serie di overlap e sembra partecipare al

corretto posizionamento del DNA virale sul DNA accettore prima dello strand transfer. Il gruppo di residui coinvolti sia nella resistenza del farmaco (e quindi probabilmente nel legame dei DKAs) che nel contatto del DNA con la triade catalitica che coordina il metallo, aumenta la probabilità che i DKAs si leghino all'interfaccia del complesso ternario DNA virale (donatore)-integrasi-metallo.

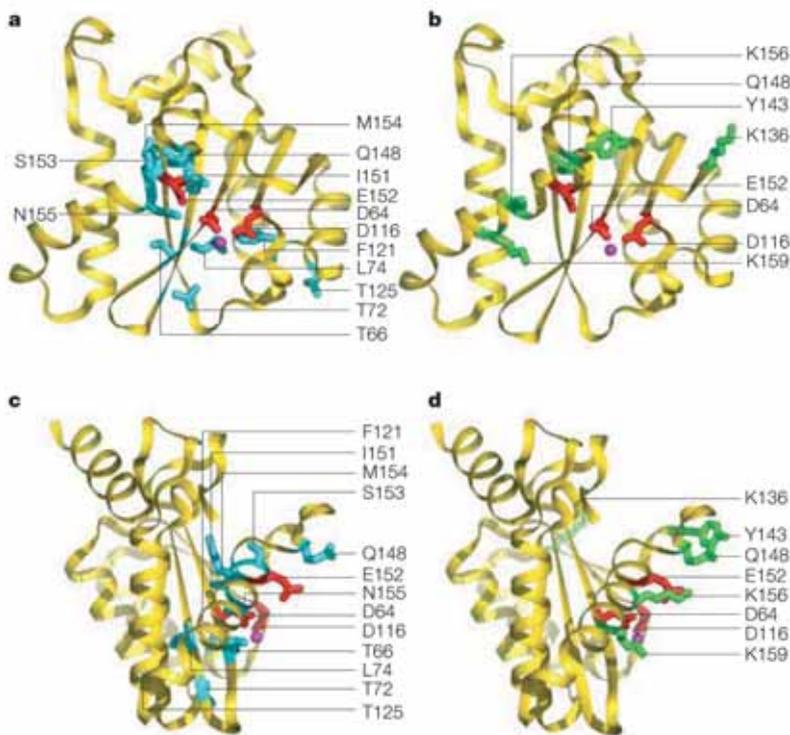


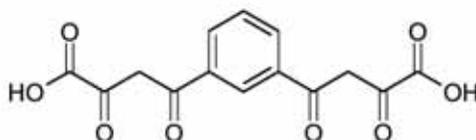
Figura 14. Mutazioni dell'integrasi che portano alla resistenza dei DKAs.

Il legame dei DKAs avverrebbe specificamente nello step del ciclo catalitico che precede lo switching del complesso dal 3'-processing allo strand transfer (cioè quando è assemblato il PIC) (Figura 13b-e). Tale legame stabilizzerebbe l'intermedio derivante dal 3'-

processing, ed impedirebbe lo strand transfer. Recentemente è stato proposto che questo meccanismo di inibizione fosse un meccanismo comune anche per i composti naturali che interferiscono con i complessi macromolecolari proteina-DNA (quali il complesso camptotecina-topoisomerasi I, il dexrazoxano e le antracicline per il complesso topoisomerasi II-DNA o i complessi antibiotico-ribosoma) o con i complessi proteina-proteina (come il complesso tra la brefeldina A e l'Arf-GEP o il complesso colchicina- α,β -tubulina). Si può quindi proporre che DKAs vengano classificati come "inibitori interfacciali" dei complessi macromolecolari.³⁹

Un ulteriore approfondimento riguardo il meccanismo d'azione dei DKAs deriva dall'osservazione che si ha un marcato aumento di attività inibitoria del 3'-processing ed una riduzione di selettività 3'P/ST nel caso dei dichetoacidi bifunzionali (BDKAs).

Il composto **35**, analogo dell' L-708,906, in cui la porzione aromatica è stata modificata attraverso l'introduzione di una seconda catena dichetoacida, conserva l'attività sullo strand transfer, ma inibisce il 3'-processing con valori di IC_{50} inferiori a 10 μM , perdendo la selettività nei confronti dello strand transfer.

**35** $IC_{50} = 7.8 \mu M$ (3'P) $IC_{50} = 1.83 \mu M$ (ST)

La differente selettività di questi composti indica probabilmente un distinto meccanismo d'azione e una diversa interazione con

l'enzima.^{51,52}

E' stato infatti ipotizzato che i dichetoacidi monofunzionali, come l'L-708,906, si legano al sito, detto accettore, dove l'enzima catalizza l'attacco nucleofilo dell'estremità 3'-OH terminale del DNA virale (donatore), formando un legame fosfodiesterico con il DNA cellulare (accettore). Quindi essi non inibiscono il 3'-processing e non competono per il legame con il DNA virale. Al contrario, i dichetoacidi bifunzionali potrebbero legare l'enzima sia nel sito di catalisi del 3'-processing (sito donatore) che in quello dello strand transfer (Figura 15).⁵¹

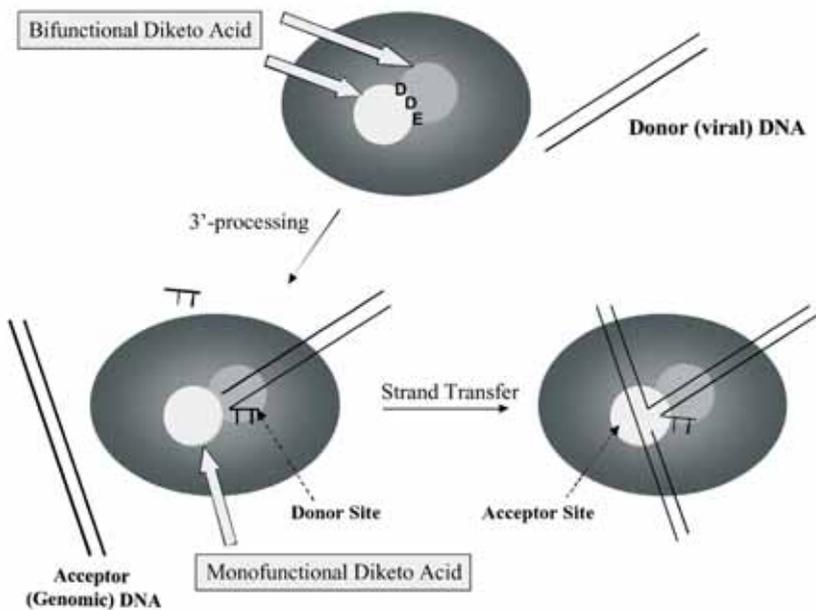


Figura 15. Modello schematico del meccanismo di legame dei dichetoacidi mono- e bifunzionali con l'integrasi dell'HIV-1.

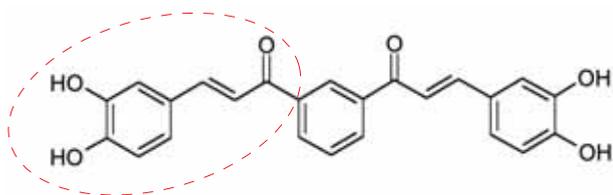
FINALITÀ DEL LAVORO

Gli agenti antivirali attualmente disponibili per il trattamento dell'infezione da HIV appartengono unicamente a tre classi di farmaci: gli inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRT), gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRT), e gli inibitori della proteasi (PI). Sebbene il regime di trattamento che prevede la combinazione di queste classi di farmaci (HAART) abbia notevolmente ridotto la mortalità e l'incidenza di patologie AIDS-correlate, l'emergere di ceppi di HIV-1 farmaco-resistenti e i problemi di tossicità legati alla terapia combinata, mettono in luce la necessità di sviluppare nuovi farmaci con un distinto meccanismo d'azione.

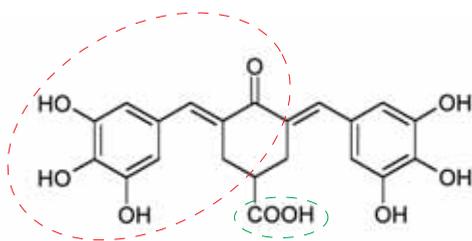
L'integrasi del virus HIV-1, è necessaria per una stabile infezione, non presenta un equivalente cellulare e rappresenta il target ideale. Il blocco di tale enzima potrebbe quindi rivelarsi fondamentale per il successo di una terapia combinata, che colpisca contemporaneamente le diverse fasi del processo di replicazione del virus.

Negli ultimi tempi l'attività di ricerca dei nostri laboratori è stata indirizzata verso la scoperta di nuovi inibitori dell'integrasi, potenzialmente attivi su cellule infettate da HIV-1.

A questo scopo negli anni passati sono stati sintetizzati una serie di composti poliossidrilati, analoghi della curcumina, risultati molto attivi sia nei saggi enzimatici che cellulari. In particolare i risultati migliori sono stati ottenuti con i composti 3,4-diidrossicinnamoilici (**18**) e 3,4,5-triidrossicinnamoilici (**21** e **22**).



18 $IC_{50} = 0.6 \mu M$ (3'P)

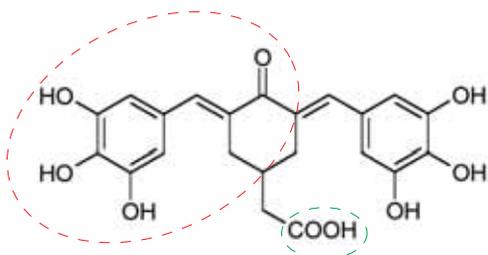


21

$IC_{50} = 0.2 \mu M$ (3'P)

$IC_{50} = 0.3 \mu M$ (ST)

$EC_{50} = 4 \mu M$



22

$IC_{50} = 0.2 \mu M$ (3'P)

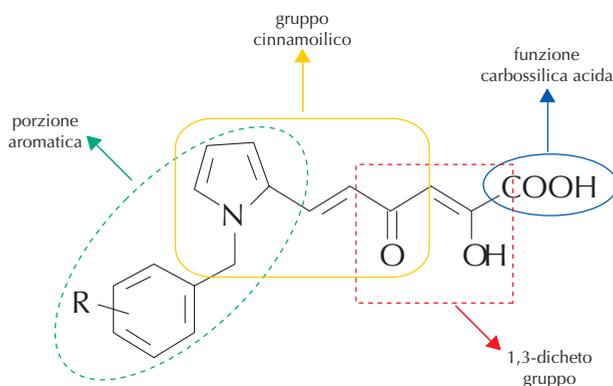
$IC_{50} = 0.2 \mu M$ (ST)

$EC_{50} = 2 \mu M$

Questi derivati, pur essendo dotati di buoni valori di attività enzimatica e cellulare, si sono rivelati però piuttosto citotossici.

Come ulteriore sviluppo di questo lavoro, sono stati quindi progettati e sintetizzati una serie di composti correlati ai derivati cinnamoilici citati precedentemente, allo scopo di ottenere nuovi inibitori dell'integrasi, che mostrassero una maggiore attività inibitoria nei confronti della replicazione dell'HIV-1 e che fossero dotati allo stesso tempo di minore citotossicità.

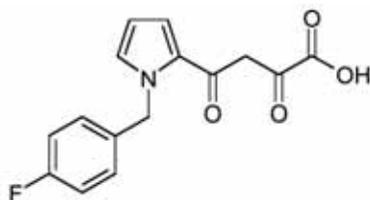
Si è arrivati così alla sintesi degli acidi 6-(1-arylmetil-1*H*-pirrol-2-il)-2,4-dioxo-5-esenoici (**36**):



36

R = H , Cl , F, CH₃, OCH₃, NO₂

Questi composti presentano una funzione ψ -cinnamoilica in cui l'anello benzenico è sostituito con una diversa porzione aromatica, in particolare con un fenilmetil pirrolo, presente anche nel derivato Merck L-731,988 (**27**).



27 L-731,988

Inoltre conservano l'1,3-dicheto gruppo e la funzione carbossilica acida, fondamentali per ottenere composti ad elevata attività anti-HIV. L'inserimento di un gruppo etilenico tra il fenilmetil pirrolo e la porzione 2,4-dioxobutanoica, rende questi composti viniloghi del derivato Merck L-731,988.

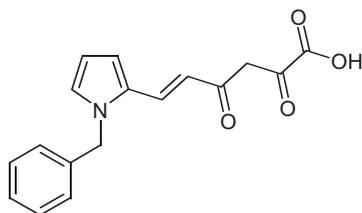
Gli acidi arildioxoesenoici **36**, derivati dalla parziale sovrapposizione della porzione cinnamoilica e dioxobutanoica, possono quindi essere considerati ibridi di queste due diverse classi di inibitori dell'integrasi, i cinnamoil derivati e i dichetoacidi.

Dall'analisi strutturale dei composti poliossidrilati e degli acidi arildichetoeseoici, si può notare che questi inibitori dell'integrasi presentano delle caratteristiche comuni, necessarie ai fini dell'attività inibitoria:

- 1) il gruppo cinnamoilico, presente sia nei prodotti naturali che in quelli sintetici;
- 2) 1,3-dicheto gruppo, presente nella serie degli arildichetoacidi;
- 3) la funzione carbossilica, riscontrata nei prodotti naturali (acido L-cicorico), nei dichetoacidi (L-731,988) e nei derivati a struttura cinnamoilica (**21**, **22**);
- 4) la porzione aromatica.

Gli acidi arildichetoeseoici **36** presentano tutte queste caratteristiche strutturali, e si sono rivelati dei potenti agenti anti-HIV.⁵⁶ Inizialmente è stato sintetizzato il composto non sostituito sull'anello benzenico (**36a**) e ne è stata determinata l'attività enzimati-

ca e cellulare.



36a

36a ha mostrato un'ottima azione inibente nei confronti dell'integrasi, sia sul 3'-processing, con una IC_{50} di $7.9 \mu\text{M}$, che sullo strand transfer con una IC_{50} pari a $7 \mu\text{M}$ ed una attività antivirale, con una EC_{50} di $1.5 \mu\text{M}$ paragonabile a quella del composto Merck L-731,988, che presenta una EC_{50} di $1 \mu\text{M}$.

Dato l'ottimo risultato ottenuto con questo composto, per studiare le relazioni struttura ed attività, è stata sintetizzata una serie di derivati che hanno diversi sostituenti in posizione 4 dell'anello benzenico. E' stata scelta proprio la posizione 4 dell'anello benzenico per analogia al derivato Merck L-731,988.

L'introduzione di gruppi lipofili come il metile, e il cloro o di gruppi a diverso effetto elettronico come il nitro o il metossile hanno portato al completo annullamento dell'attività, sia in saggi enzimatici che cellulari. L'unico che ha mantenuto una discreta attività su cellule infettate è risultato il derivato 4-F sostituito ($EC_{50} = 11 \mu\text{M}$).

Ciò rende evidente che fattori come la lipofilia, il rilascio e l'attrazione elettronica dei vari gruppi non sono determinanti per l'attività biologica. Si potrebbe quindi ipotizzare che un ruolo fondamentale per l'attività biologica sia giocato dall'ingombro sterico. Infatti i migliori risultati sono stati ottenuti attraverso la sostituzione dell'idrogeno in 4 con un fluoro, il più piccolo fra tutti i sosti-

tuenti scelti.⁵⁶

Per approfondire gli studi in questo interessante campo di indagine, è stato realizzato un approccio preliminare di molecular modeling, studiando l'interazione dei nuovi derivati con il sito attivo dell'integrasi dell'HIV-1, scegliendo il derivato non sostituito sull'anello benzenico (**36a**) come composto rappresentativo della serie degli acidi aril-dioxoeseenoici.

Il composto Merck L-731,988 (giallo) e l'acido arildioxoeseenoico di riferimento **36a** (viola) sono stati allineati sovrapponendo atomo per atomo le loro porzioni dichetoacide con quella del 5-CITEP (arancio). Si può notare che fra i composti così sovrapposti si verifica un buon grado di allineamento.

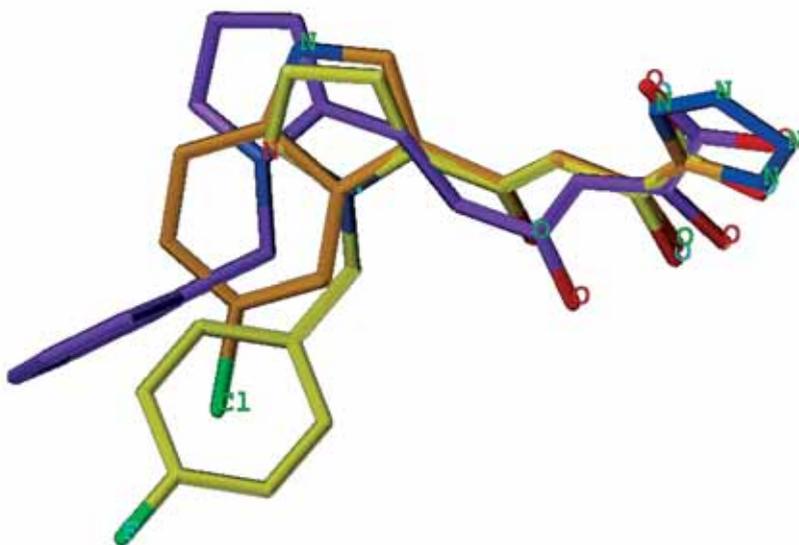


Figura 16. Sovrapposizione di L-731,988 (GIALLO), acido arildioxoeseenoico **36a** (VIOLA) e 5-CITEP (ARANCIO).

Inserendo il derivato Merck e l'acido arildioxoeseenoico nel sito

attivo dell'integrasi, nel quale è cocristallizzato il 5-CITEP si nota che la parte farmacofora di questi inibitori ha una interazione ligando-recettore comune, caratteristica di tutti e tre i composti.

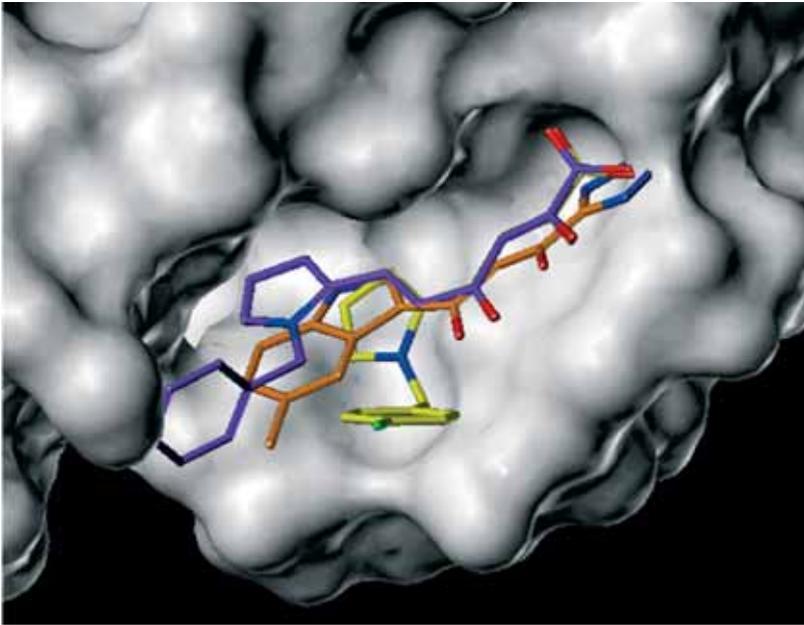


Figura 17. Sovrapposizione di L-731,988 (GIALLO), acido arildioxoesenoico **36a** (VIOLA) e 5-CITEP (ARANCIO) nel sito catalitico dell'integrasi.

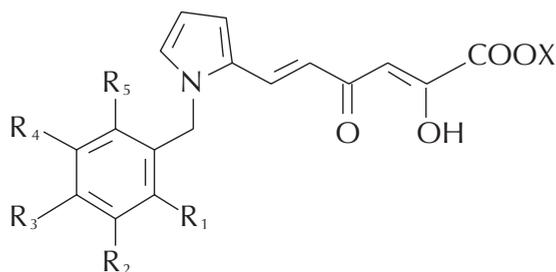
Un aspetto di notevole interesse è la differente disposizione della catena laterale 4-fluorobenzilica di L-731,988 e della porzione 5-cloroindolica del 5-CITEP rivolte verso l'esterno della cavità recettoriale, rispetto al gruppo benzilico dell'acido arildioxoesenoico, che invece rimane intrappolato nella tasca dell'integrasi.

Dall'immagine rappresentata in Figura 17, si può razionalizzare la scarsa attività dei composti 4-sostituiti. Si può inoltre ipotizzare che l'introduzione di un sostituito in posizione 3 o in posizione 2 dell'anello benzenico, possa favorire l'interazione con la tasca del sito attivo dell'integrasi, aumentando l'attività inibitoria nei

confronti dell'enzima stesso.

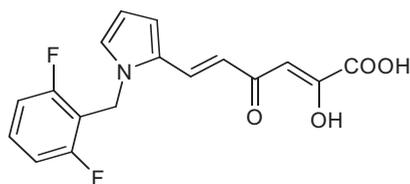
Inoltre è importante indagare gli effetti sull'attività biologica di una doppia sostituzione, in posizione 3,5 o ancora in posizione 2,6, che genera degli analoghi conformazionalmente bloccati.

Si è pertanto giunti alla progettazione di acidi arildiooesenoici (**36a-m**) al fine di valutare a fondo l'influenza di queste sostituzioni sull'attività biologica di tali derivati.



36a-m

Nell'ambito di questa serie di composti i risultati migliori sono stati ottenuti con il derivato 2,6-difluoro sostituito **36k**, che presenta una EC_{50} pari a $0.35 \mu\text{M}$, una CC_{50} pari a $37 \mu\text{M}$, ed un indice di selettività S.I.= 106, dimostrandosi tre volte più attivo del derivato Merck **27** preso come riferimento.



36k

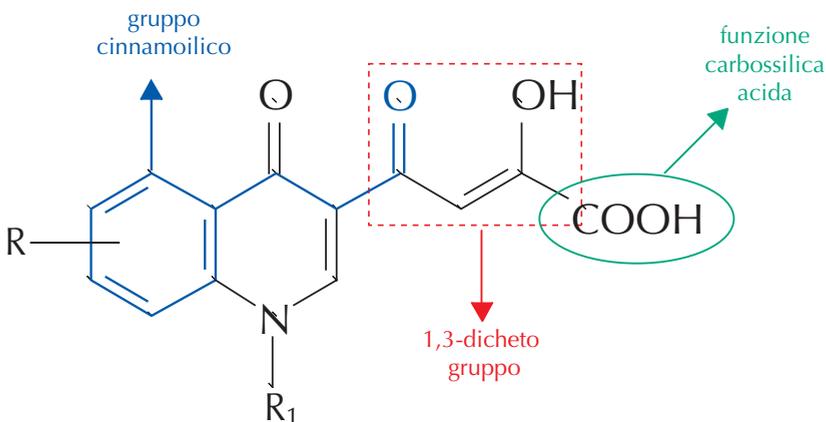
L'elevato valore di attività riscontrato per il derivato **36k** potrebbe essere dovuto al fatto che la doppia sostituzione in posizione 2,6

sull'anello benzilico genera un composto conformazionalmente bloccato, che probabilmente si lega più efficacemente al sito attivo enzimatico e ne potenzia l'attività.

Sulla base di questa ipotesi strutturale, il nostro gruppo di ricerca si è rivolto alla progettazione di nuovi potenziali inibitori dell'integrasi dell'HIV-1.

Abbiamo deciso di conservare inalterate le caratteristiche strutturali necessarie all'attività inibitoria, e cioè la funzione cinnamoilica, l'1,3-dichetogruppo e la funzione carbossilica acida. Inoltre si è pensato di incorporare la porzione cinnamoilica in un sistema rigido, ed in particolare in un anello oxochinolinico, in modo da generare analoghi conformazionalmente bloccati degli acidi aril-diooesenoici **36**, per migliorare l'interazione con il sito catalitico enzimatico e l'attività biologica.

La scelta dell'anello oxochinolinico è stata indotta dall'osservazione che numerosi farmaci di uso clinico sono derivati della chinolina, in particolare i chinoloni antibatterici.

**37a-y**

Siamo giunti così alla progettazione degli acidi chinolinildioxobutanoici **37a-y** variamente sostituiti sull'atomo di azoto e sulle posizioni 6 e 7 dell'anello oxochinolinico.

I composti così progettati, pur conservando inalterata la porzione farmacoforica dichetoacida, ci hanno permesso, allo stesso tempo, di incorporare la funzione cinnamoilica in un sistema rigido, conformazionalmente bloccato, quale la struttura oxochinolinica, in modo da favorire l'interazione selettiva con il sito attivo enzimatico.

I buoni risultati ottenuti con i derivati **36** e **37**, ci hanno condotto ad ulteriori indagini sugli arildichetoacidi come inibitori dell'integrasi. In particolare, dato che i ricercatori della Merck hanno messo in evidenza che l'orientamento ottimale tra la catena dichetoacida ed il gruppo benzilico dei dichetoacidi è di circa 120°, è stato progettato il derivato 4-[4-fenil-1-(4-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-3-il]-2,4-dioxobutanoico (**38**). In effetti questo composto mostra le seguenti caratteristiche chimiche:

- 1) un fenile in posizione 4 del pirrolo;
- 2) un gruppo benzilico in posizione 1 dell'anello pirrolico;
- 3) una catena dichetoacida disposta in posizione 1,3 rispetto alla porzione benzilica.

Successivamente sul derivato **38** sono state progettate le seguenti modifiche:

- 1) allungamento della catena dioxobutanoica, che porta all'acido 4-[4-fenil-1-(4-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-3-il]-2,4-dioxo-5-ese-noico (**39**);
- 2) sostituzione della catena dioxobutanoica con un gruppo chetoimminico (acido 2-ammino-4-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1*H*-pirrol-3-il]-4-oxo-2-butenico, **40**);
- 3) introduzione di un pirazolo allo scopo di mascherare il dicheto gruppo (acido 5-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1*H*-pirrol-3-il]-

1H-pirazol-3-carbossilico, **41**).

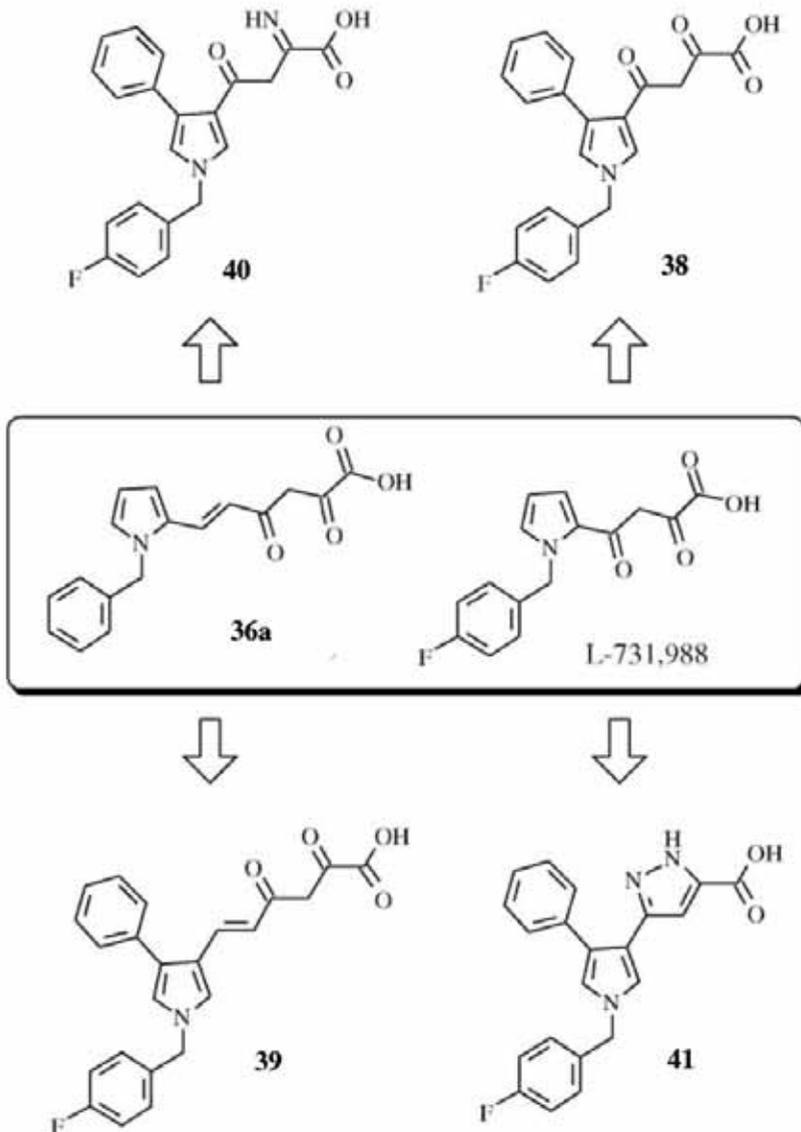
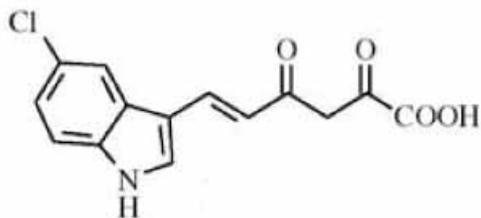


Figura 18. Acidi pirrolidioxoesenoici e derivati progettati.

Come ulteriore sviluppo della ricerca da acidi eteroaril dicheto-
senoici come agenti anti-integrasi, abbiamo inoltre pianificato la
sintesi dell'acido 6-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2,4-dioxo-5-esenoico
42. Questo composto è stato progettato come risultato della fusio-
ne della porzione 5-cloroindolica del 5-CITEP con la catena
dichetoesenica degli acidi arildichetoesenici.



42

DESCRITTIVA CHIMICA

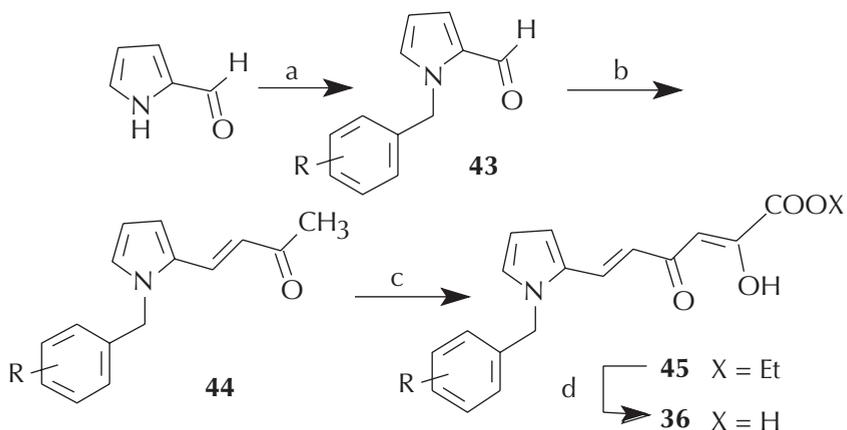
Lo Schema 1 mostra il percorso sintetico seguito per ottenere gli acidi pirrolidichetoeseoici **36a-m**.

La 1*H*-pirrolo-2 carbossaldeide è trattata con un alogenuro benzi-lico opportunamente sostituito, in presenza di K₂CO₃ anidro a 90°C, ottenendo le 1-arilmetil-1*H*-pirrolo-2-carbossaldeidi corri-spondenti (**43**).

Gli intermedi **43** sono trattati con acetone, in presenza di NaOH 5N, per ottenere i 4-(1-arilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-3-buten-2-oni (**44**). Successivamente i composti **44** sono condensati con ossalato die-tilico in presenza di etossido di sodio, secondo la condensazione di Claisen, in atmosfera inerte, portando alla formazione degli esteri etilici degli acidi 6-(1-arilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-2,4-dioxo-5-eseoici (**45**).

L'idrolisi dei derivati **45** in ambiente basico per NaOH 1N consen-te di ottenere i corrispondenti acidi carbossilici **36**.

Schema 1. Percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei derivati **36a-m** e **45a-m**.



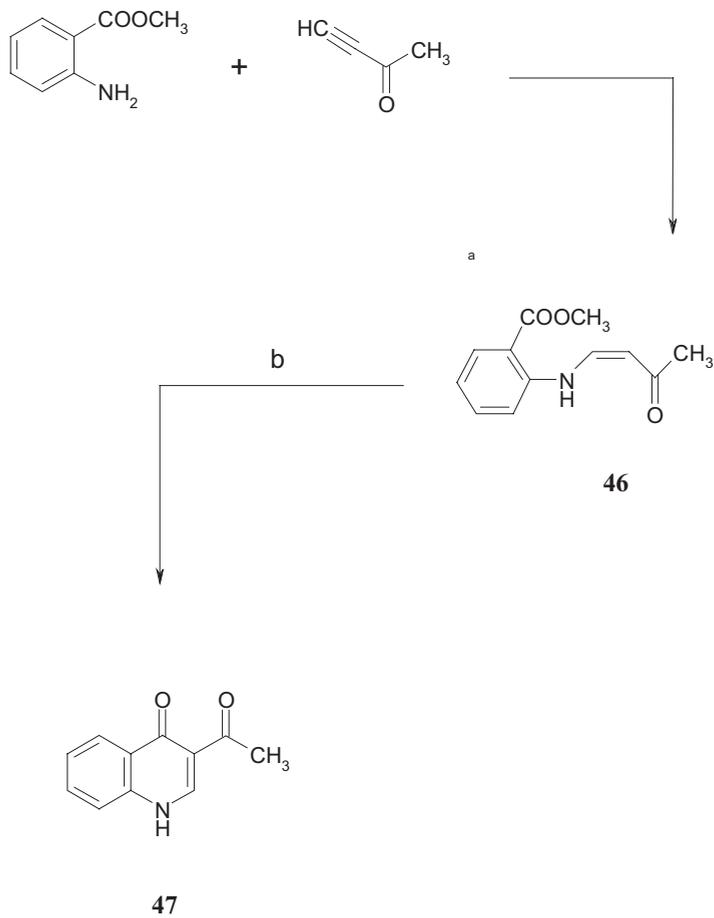
Reagenti e condizioni. a) Benzil alogenuro, K₂CO₃, DMF, 20h, 90°C; b) acetone, NaOH 5N, 20 h, 25°C; c) ossalato dietilico, NaOEt, THF, 2h, 25°C; d) NaOH 1N, THF/MeOH, 3h, 25°C.

Lo Schema 2 mostra il percorso sintetico seguito per ottenere il 3-acetil-4(1*H*)-chinolone(**47**), usato come prodotto di partenza per l'ottenimento degli acidi chinolinil-2,4-dioxobutanoici (**37a-o**).

Il metil antranilato, sciolto in metanolo, viene trattato con il 3-butin-2-one. Per addizione nucleofila al legame acetilenico, si ottiene il 4-[(2-carbometossifenil)amino]-3-buten-2-one (**46**).

La successiva ciclizzazione dell'intermedio **46** per trattamento con una soluzione metanolica di metossido di sodio, a riflusso, porta al 3-acetil-4(1*H*)-chinolone (**47**).

Schema 2. Percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei derivati dell'intermedio **48**.



Reagenti e condizioni. a) MeOH, < 20°C; b) MeONa, MeOH, riflusso.

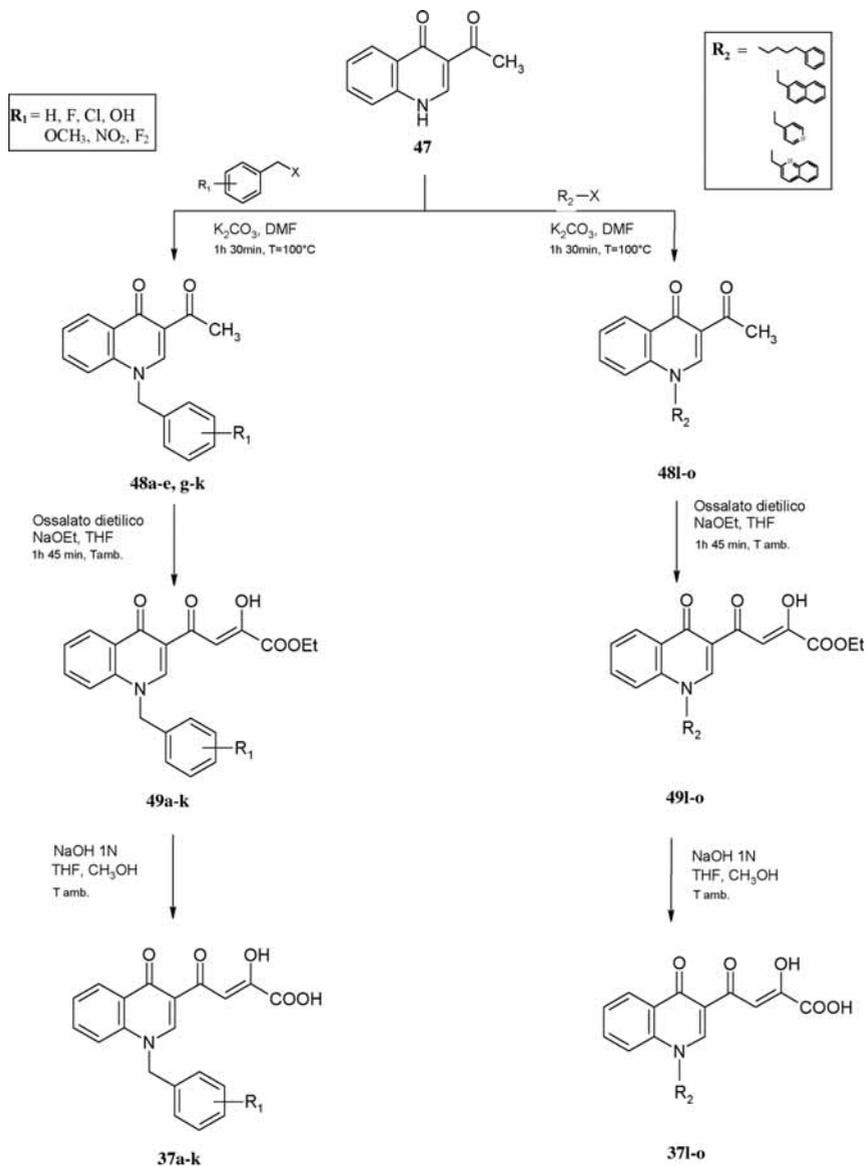
Lo Schema 3 mostra il percorso sintetico seguito per ottenere gli acidi chinolinil dioxobutanoici **37a-o**.

Il chinolone di partenza (**47**) viene alchilato sull'azoto oxochinolinico, per trattamento con l'opportuno agente alchilante, in presenza di K_2CO_3 anidro a $100^\circ C$, ottenendo i 3-acetil-1-arilmetil-4(1*H*)-chinoloni corrispondenti (**48a-o**).

Successivamente i derivati **48** sono condensati con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio (condensazione di Claisen), in atmosfera inerte, portando alla formazione degli esteri etilici **49a-o**.

L'idrolisi dei derivati **49a-o** in ambiente basico per NaOH 1N consente di ottenere i corrispondenti acidi carbossilici **37a-o**.

Schema 3. Percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei derivati **37a-o** e **49a-o**.



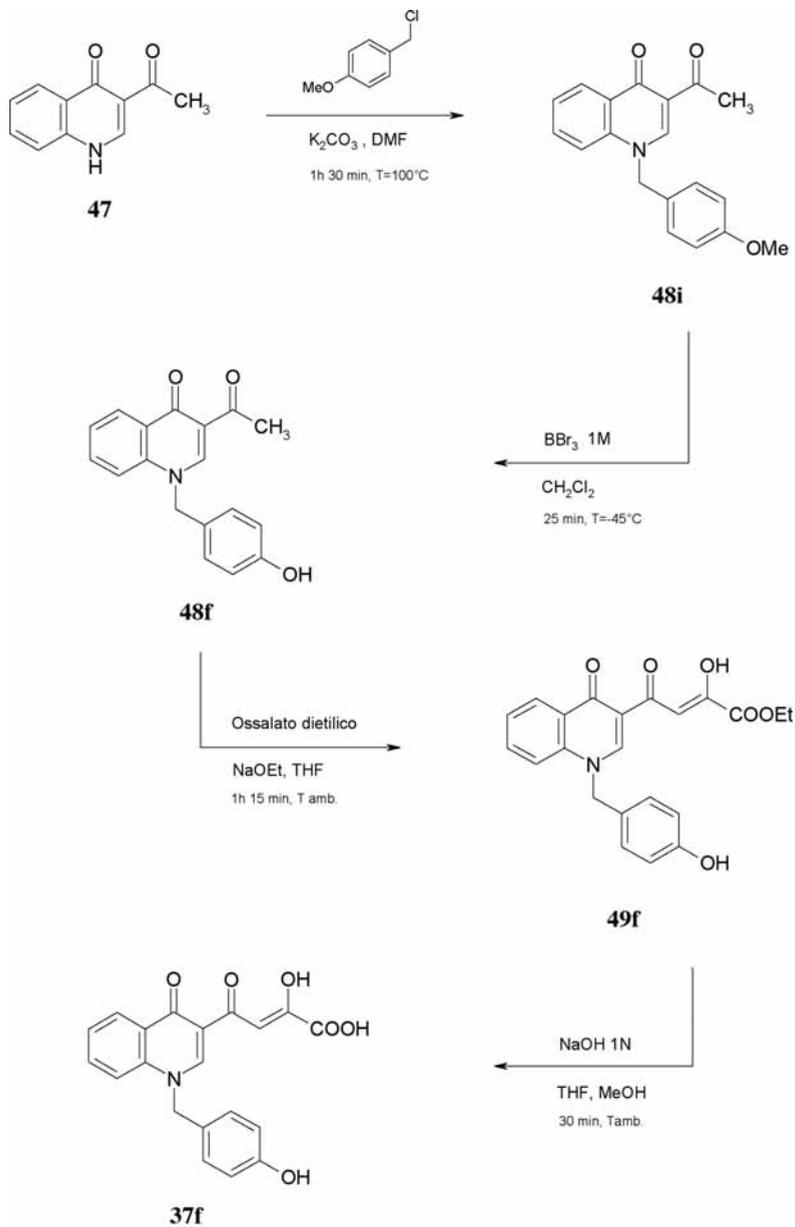
Lo Schema 4 mostra il percorso sintetico seguito per l'ottenimento dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(4-metossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (**37f**).

Il 3-acetil-4(1*H*)-chinolone (**47**) è trattato con il 4-metossibenzilcloruro in presenza di K_2CO_3 anidro a $100^\circ C$, ottenendo il corrispondente chinolone N-alchilato (**48i**).

Per trattamento del composto **48i** con una soluzione 1M di BBr_3 in diclorometano a $-45^\circ C$, si ottiene il derivato ossidrilato **48f**.

In accordo con la via sintetica precedente, la condensazione dell'acetilderivato **48f** con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio, seguita dall'idrolisi alcalina del risultante estere **49f**, fornisce il corrispondente acido carbossilico **37f**.

Schema 4. Percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei derivati **37f** e **49f**.

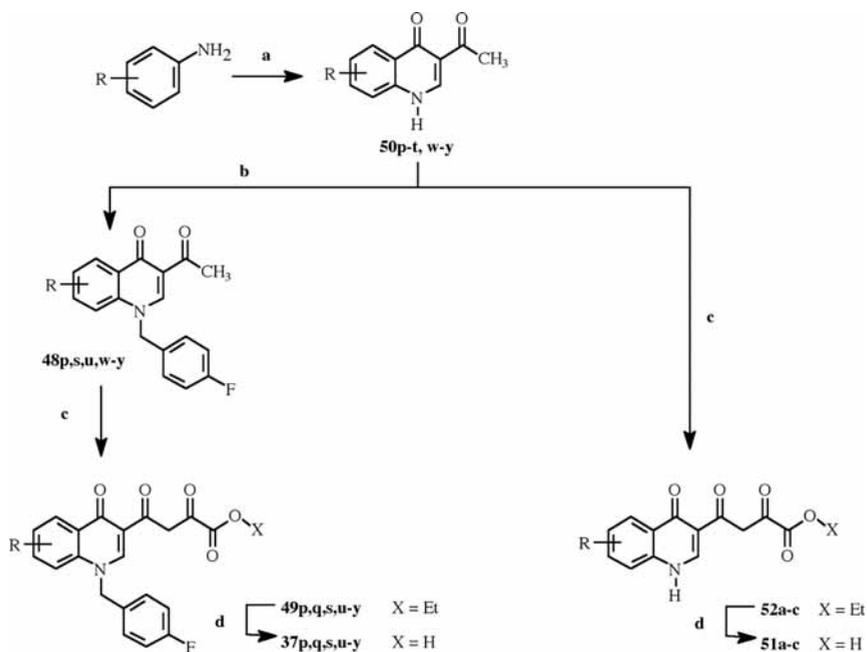


Lo Schema 5 mostra il percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei composti **37p,q,s,u-y** e **49p,q,s,u-y**.

I 3-acetil-4(1*H*)-chinoloni **50**, usati come materiale di partenza, sono stati preparati per reazione della appropriate aniline con il trietilortoformiato e l'etil acetoacetato, in presenza di Dowterm A come solvente, alla temperatura di 256°C. In accordo con la via sintetica, la reazione di alchilazione con il 4-fluorobenzil bromuro porta agli N-arilmetilchinoloni **48** che sono poi condensati con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio, per dare gli esteri etilici degli acidi 4-[1,4-diidro-1-(4-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoici **49p,q,s,u-y**. L'idrolisi alcalina dei composti **49p,q,s,u-y**, fornisce i corrispondenti acidi 4-[1,4-diidro-1-(4-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoici **37p,q,s,u-y**.

La sintesi degli acidi dioxobutanoici non sostituiti sull'atomo di azoto oxochinolinico **51a-c** procede attraverso la condensazione degli acetil chinoloni **50** con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio, seguita dall'idrolisi alcalina dei risultanti esteri **52a-c**, che fornisce i corrispondenti acidi carbossilici **51a-c**.

Schema 5. Percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei derivati **37p,q,s,u-y** e **49p,q,s,u-y**.



Reagenti e condizioni. a) Trietil ortoformiato, etil acetoacetato, Dowterm A, 6h, 256°C; b) 4-fluorobenzil bromuro, K₂CO₃, DMF, 1.5h, 100°C; c) ossalato dietilico, NaOEt, THF, 1h 45 min, 25°C; d) NaOH 1N, THF/MeOH, 2h, 25°C.

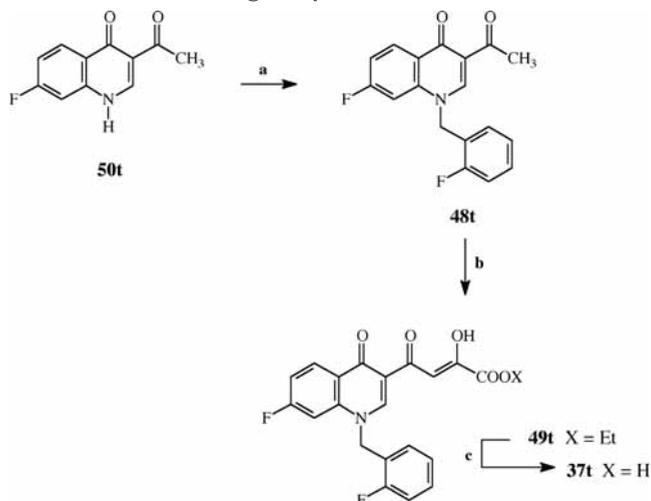
Gli Schemi 6 e 7 mostrano la via sintetica seguita per l'ottenimento dei derivati **37v,t** e **49v,t**.

L'acetil chinolone **50t** viene alchilato secondo le procedure precedentemente descritte con il 2-fluorobenzil bromuro per dare il corrispondente chinolone N-sostituito **48t**.

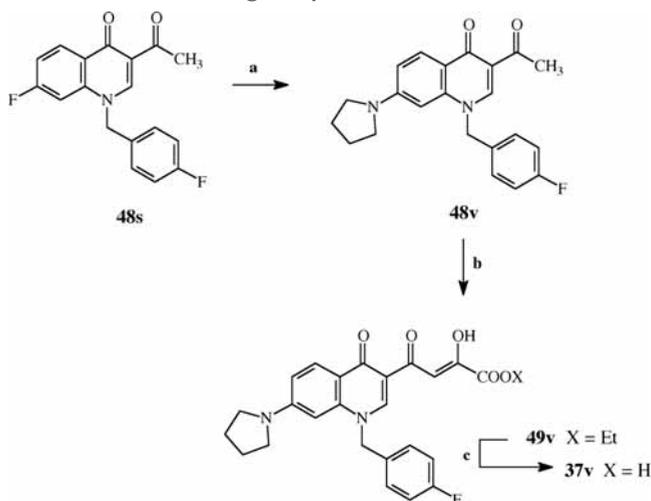
La condensazione con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio come catalizzatore dell'intermedio **48t** fornisce l'estere **49t**, che per idrolisi alcalina con NaOH 1N conduce all'acido carbossilico corrispondente **37t**.

La sintesi del derivato **37v** procede con un'iniziale sostituzione nucleofila dell'atomo di fluoro in posizione 7 dell'anello oxochinolinico del derivato **48s** ad opera della pirrolidina. Tale reazione viene condotta in reattore a microonde CEM Discover, e fornisce il composto **48v**.

La successiva condensazione con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio dell'intermedio **48v** fornisce l'estere **49v**, che per idrolisi alcalina con NaOH 1N conduce all'acido carbossilico corrispondente **37v**.

Schema 6. Percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei derivati **37t** e **49t**.

Reagenti e condizioni. a) 2-Fluorobenzil bromuro, K_2CO_3 , DMF, 1.5h, 100°C ; c) ossalato dietilico, NaOEt, THF, 1h 45 min, 25°C ; d) NaOH 1N, THF/MeOH, 2h, 25°C .

Schema 7. Percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei derivati **37v** e **49v**.

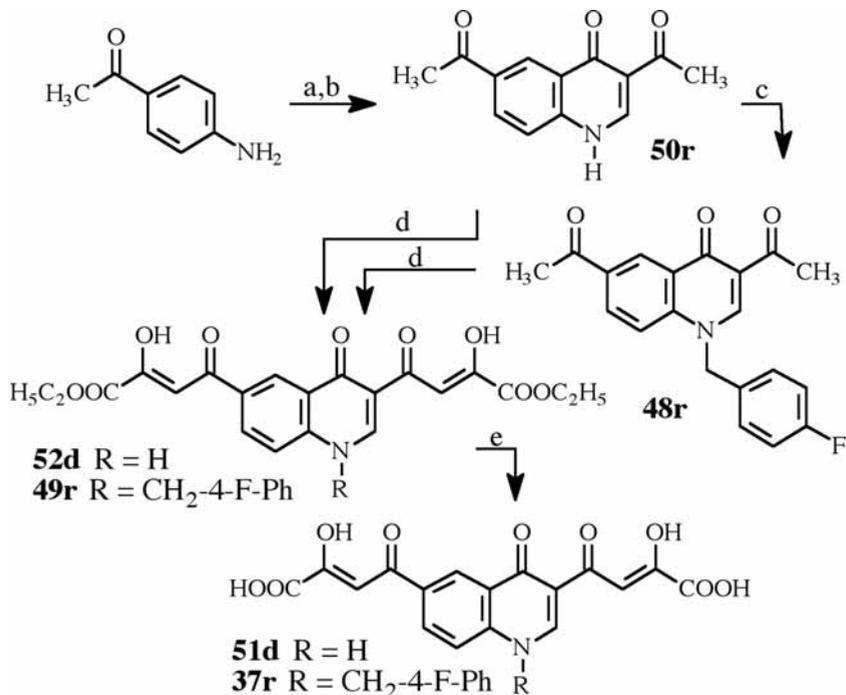
Reagenti e condizioni. a) Pirrolidina, trietilammina, DMF, MW, open vessel; b) ossalato dietilico, NaOEt, THF, 1h 45 min, 25°C ; d) NaOH 1N, THF/MeOH, 2h, 25°C .

Lo Schema 8 mostra la sintesi dei derivati **37r**, **49r**, **51d** e **52d**. L'intermedio chiave **50r** è ottenuto per reazione del 4-ammino acetofenone con etiletossimetilene acetoacetato, seguita dalla ciclizzazione termica in difenil etere.

Il derivato **50r** è quindi alchilato con il 4-fluorobenzil bromuro in ambiente basico (K_2CO_3) per dare il chinolone N-1 sostituito **48r**.

Gli acetili **48r** e **50r** vengono quindi sottoposti a condensazione di Claisen con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio come catalizzatore per dare i dichetoesteri **49r** e **52d**, che vengono idrolizzati con NaOH 1N ai corrispondenti derivati acidi **37r** e **51d**.

Schema 8. Percorso sintetico seguito per l'ottenimento dei derivati **37r**, **49t**, **51d** e **52d**.



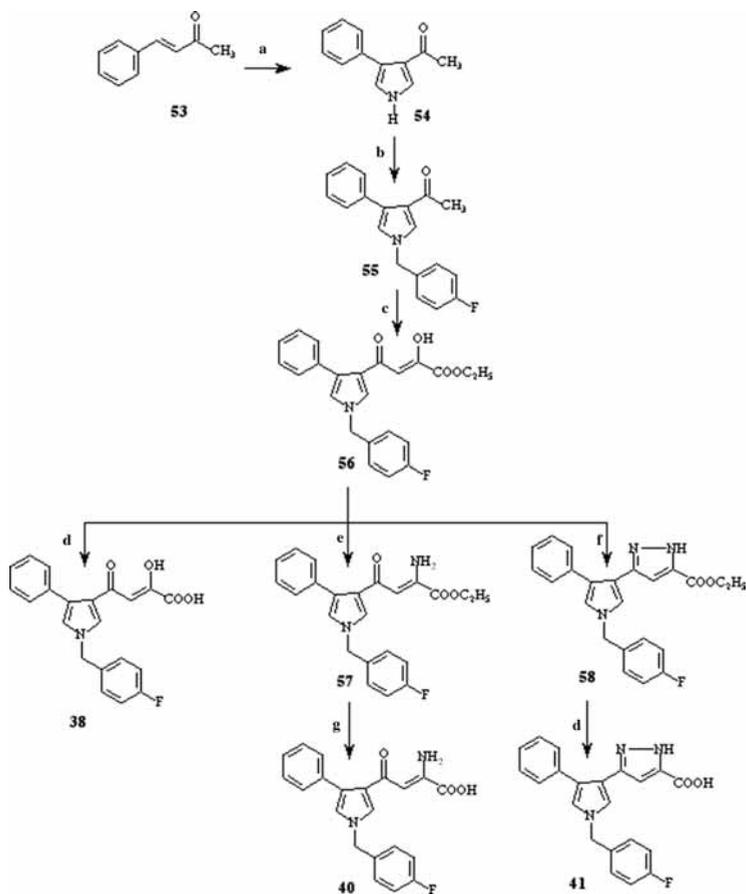
Reagenti e condizioni. a) Etilotossimetilen acetoacetato, 120°C, 5 min; b) PhO₂ refluxo, 50 min; c) 4-fluorobenzil bromuro, K₂CO₃, DMF, 3h, 100°C; c) ossalato dietilico, NaOEt, THF, 2h, 25°C; d) NaOH 1N, THF/MeOH, 1.5h, 25°C.

Lo Schema 9 mostra la sintesi dei derivati **38**, **40** e **41**.

Il propenone **53** è sottoposto a reazione con TosMIC per dare l'acetil pirrolo **54**. Esso viene quindi alchilato con il 4-fluorobenzil bromuro in ambiente basico per K_2CO_3 , per dare il composto **55**. Esso viene sottoposto a condensazione di Claisen con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio, per dare l'intermedio **56**. L'idrolisi dell'estere intermedio **56** con NaOH 1N fornisce il corrispondente acido carbossilico **38**.

Il trattamento dell'estere **56** con acetato d'ammonio ed acido acetico in benzene a riflusso, fornisce l'immino estere **57**, che successivamente è idrolizzato con KOH 0.5N al corrispondente acido carbossilico **40**.

Il trattamento dell'estere **56** con idrazina dicloridrato, trietilammina ed acido acetico glaciale in MeOH, fornisce il pirazolo **58**, che viene idrolizzato con NaOH 1N per dare il corrispondente acido carbossilico **41**.

Schema 9. Sintesi dei derivati **38**, **40** e **41**.

Reagenti e condizioni. a) TosMIC, NaH, DMSO/Et₂O, 20 min, 25°C; b) 4-fluorobenzil bromuro, K₂CO₃, DMF, 20h, 90°C; c) ossalato dietilico, NaOEt, THF, 2h, 25°C; d) NaOH 1N, THF/MeOH, 3h, 25°C; e) acetato d'ammonio, acido acetico glaciale, benzene, 17 h, riflusso; f) idrazina dicloridrato, trietilammina, acido acetico glaciale, MeOH, 16h, 25°C g) KOH 0.5N, THF, 17 h, 25°C.

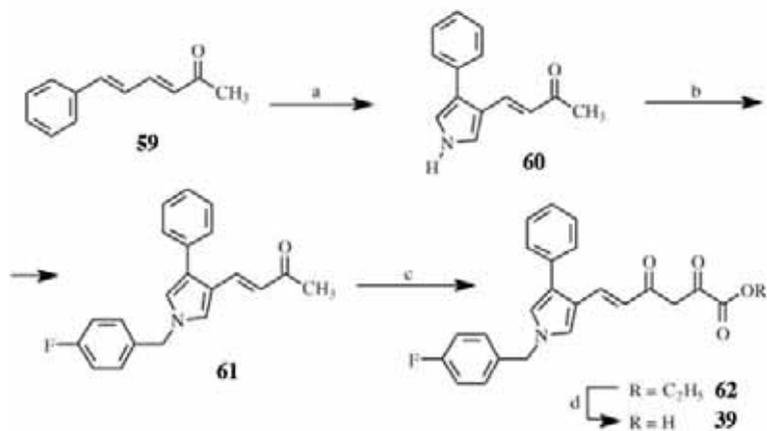
Lo Schema 10 mostra la sintesi dei derivati **39** e **62**.

Il passaggio chiave della sintesi prevede la reazione selettiva del TosMIC con il γ,δ -doppio legame del sistema dienonico per ottenere il pirrolo **60**.

Esso viene quindi alchilato con il 4-fluorobenzil bromuro in ambiente basico per K_2CO_3 , per dare il composto **61**. Esso viene sottoposto a condensazione di Claisen con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio, per dare l'estere **62**.

L'idrolisi dell'estere intermedio **62** con NaOH 1N fornisce il corrispondente acido carbossilico **39**.

Schema 10. Sintesi dei derivati **39** e **62**.



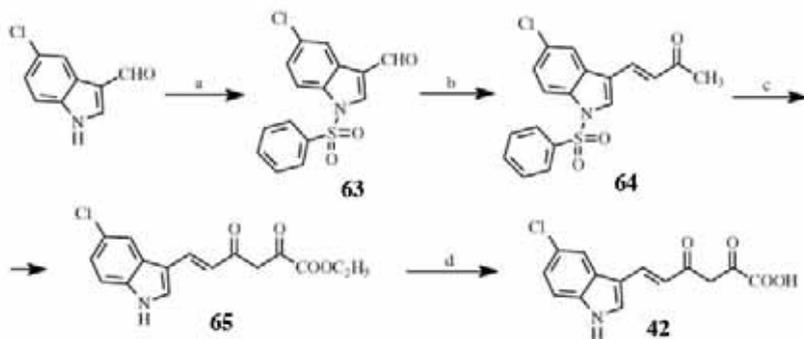
Reagenti e condizioni. a) TosMIC, NaH, DMSO/Et₂O, 20 min, 25°C; b) 4-fluorobenzil bromuro, K₂CO₃, DMF, 20h, 90°C; c) ossalato dietilico, NaOEt, THF, 2h, 25°C; d) NaOH 1N, THF/MeOH, 3h, 25°C.

Lo Schema 11 mostra la sintesi dei derivati **65** e **42**.

La condensazione dell'aldeide con l'acetone in ambiente alcalino avviene dopo la protezione del gruppo NH della porzione cloroindolica con il gruppo benzensolfonico (**63**). L'indolil butenone **64** viene sottoposto a condensazione di Claisen con ossalato dietilico in presenza di etossido di sodio, per dare l'estere **65**. Durante tale reazione avviene anche la rimozione del gruppo protettivo benzensolfonico.

L'idrolisi dell'estere intermedio **65** con NaOH 1N fornisce il corrispondente acido carbossilico **42**.

Schema 11. Sintesi dei derivati **65** e **42**.



Reagenti e condizioni. a) Benzosolfonil cloruro, Bu_4NHSO_4 , NaOH, diclorometano, 1.5 h, 0°C ; b) 2-propanone, NaOH 5N, 24h, 25°C ; c) ossalato dietilico, NaOEt, THF, 2h, 25°C ; d) NaOH 1N, THF/MeOH, 3h, 25°C .

PARTE SPERIMENTALE

APPARECCHIATURE

Le reazioni riscaldate al microonde sono realizzate con reattore a microonde CEM Discover (20 MHz).

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio Büchi 530 e non sono stati corretti.

Gli spettri infrarosso sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Perkin-Elmer 297 (campioni dispersi in Nujol) o con uno spettrofotometro Spectrum-one.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati con uno spettrometro Bruker AC200 (200 MHz) o con uno spettrometro Bruker AC400 (400 MHz), utilizzando tetrametilsilano come standard interno.

Tutti i composti sono stati testati di routine con TLC e $^1\text{H-NMR}$. La TLC è stata eseguita utilizzando lastre di silice su supporto di alluminio (Fluka DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄) o di allumina su supporto di alluminio (Fluka Stratocrom ALF con indicatore di fluorescenza)

Per evidenziare gli Rf è stata utilizzata una lampada UV.

Le purificazioni cromatografiche sono effettuate con allumina Merck (70-230 mesh) o silice Merck (70-230 mesh).

Tutti i solventi hanno grado di purezza di reagenti. La concentrazione delle soluzioni derivanti da reazioni o processi di estrazione è stata ottenuta con l'impiego di un evaporatore rotante Büchi operante alla pressione di circa 20 torr. Le soluzioni organiche sono state essiccate con solfato di sodio anidro.

Le analisi elementari sono in accordo con i valori teorici con uno scarto di $\pm 0.4\%$.

PROCEDURE SINTETICHE

I seguenti esempi illustrano le procedure sintetiche generali.

1-Aril-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeidi (43a-m). Procedura generale.

Una sospensione di 1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (3 g, 31.5 mmoli), K₂CO₃ anidro (8.71 g, 63 mmoli) ed alogenuro benzilico (38 mmoli), in DMF anidra (40 ml), è termostata a 90°C e mantenuta sotto agitazione a questa temperatura per 20 ore.

Dopo raffreddamento, si versa su acqua (200 ml), e la sospensione ottenuta è estratta con acetato di etile (3 x 100 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con soluzione satura di NaCl (3 x 200 ml) ed essiccate. L'evaporazione del solvente fornisce una miscela che viene purificata mediante cromatografia su colonna di gel di silice, eluendo con cloroformio, ottenendo i composti puri.

1-Fenilmetil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43a). Resa 76%; olio.

1-(2-Fluorofenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43b). Resa 100%; p.f. 34-36°C (*n*-esano).

1-(2-Clorofenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43c). Resa 100%; olio.

1-(2-Metilfenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43d). Resa 100%; p.f. 38-40°C (*n*-esano).

1-(2-Metilfenil)metil-1*H*-pirrolo 2-carbossialdeide (43d). Resa 100%; p.f. 38-40°C (*n*-esano).

1-(2-Metossifenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43e). Resa 100%; p.f. 56-58°C (*n*-esano).

1-(2-Etossifenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43f). Resa 72%; olio.

1-(3-Fluorofenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43g). Resa 100%; olio.

1-(3-Clorofenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43h). Resa 100%; olio.

1-(3-Metilfenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43i). Resa 83%; olio.

1-(3-Metossifenil)metil-1*H*-pirrolo 2-carbossialdeide (43j). Resa 69%; olio.

1-(2,6-Difluorofenil)metil-1*H*-pirrolo 2-carbossialdeide (43k). Resa 87%; olio.

1-(3,5-Diclorofenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43l). Resa 100%; p.f. 61-63°C (*n*-esano).

1-(3,5-Dimetilfenil)metil-1*H*-pirrolo-2-carbossialdeide (43m). Resa 52%; olio.

4-(1-Arilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-3-buten-2-oni (44a-m).

Procedura generale.

Ad una soluzione dell'1-arilmetil-1*H*-pirrolo-2-carbossaldeide (**43**) (9.1 mmoli) in acetone (30 ml), vengono aggiunti 12.6 ml di NaOH 5N raffreddando in bagno a ghiaccio.

Dopo aver chiuso accuratamente il pallone di reazione con setto di gomma, la miscela è portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per circa 60 ore. Dopo tale periodo la soluzione è versata su ghiaccio, acidificata fino a pH = 3 con HCl 1N e la sospensione così ottenuta è estratta con acetato di etile (3 x 50 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con soluzione satura di NaCl (3 x 100 ml) ed essiccate. L'evaporazione del solvente fornisce il chetone grezzo che viene purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, eluendo con una miscela acetato di etile /*n*-esano 2:5, ottenendo i composti puri.

4-(1-Fenilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-3-buten-2-one (44a). Resa 100%; olio.

4-[1-(2-Fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44b). Resa 92%; p.f. 46-48°C (ligroina).

4-[1-(2-Clorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44c). Resa 85%; olio.

4-[1-(2-Metilfenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44d). Resa 59%; p.f. 76-77°C (ligroina).

4-[1-(2-Metossifenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44e).

Resa 37%; p.f. 120-122°C (ligroina).

4-[1-(2-Etossifenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44f). Resa 47%; p.f. 81-82°C (ligroina).

4-[1-(3-Fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44g). Resa 69%; olio.

4-[1-(3-Clorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44h). Resa 64%; p.f. 78-80°C (ligroina).

4-[1-(3-Metilfenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44i). Resa 82%; p.f. 65-67°C (ligroina).

4-[1-(3-Metossifenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44j). Resa 66%; p.f. 50-52°C (*n*-esano).

4-[1-(2,6-Difluorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44k). Resa 100%; p.f. 86-88°C (ligroina).

4-[1-(3,5-Diclorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44l). Resa 85%; p.f. 75-77°C (ligroina).

4-[1-(3,5-Dimetilfenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-3-buten-2-one (44m). Resa 72%; p.f. 76-78°C (*n*-esano).

Esteri etilici degli acidi 6-(1-arilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-2,4-dioxo-5-esenoici (45a-m). Procedura generale.

Ad una soluzione del 4-(1-arilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-3-buten-2-one (**44**) (5.8 mmoli) ed ossalato dietilico (1.69 g, 11.6 mmoli) in 5.55 ml di THF anidro, viene aggiunto etossido di sodio (0.8 g, 11.8 mmoli) in atmosfera inerte. La miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore sotto corrente di argon. La soluzione è versata su *n*-esano (105 ml) ed il precipitato ottenuto viene filtrato e triturato in HCl 1N (105 ml).

Il solido in sospensione viene filtrato e lavato con acqua e poi con etere di petrolio. Il prodotto così ottenuto viene essiccato sotto lampada ad IR ottenendo i derivati puri.

Etere etilico dell'acido 6-(1-fenilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-2,4-dioxo-5-esenoico (45a). Resa 69%; p.f. 79-81°C (ligroina). IR 3400 (OH), 1730 (COOC₂H₅), 1620 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.42 (t, 3H, CH₃), 4.38 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.27 (s, 2H, CH₂), 6.33-6.43 (m, 2H, esenoato H-3,5), 6.89-7.38 (m, 8H, benzene H e protoni α-β del pirrolo), 7.68 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-6), 15.50 (bs, 1H, OH).

Etere etilico dell'acido 6-[1-(2-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45b). Resa 88%; p.f. 103-104°C (benzene/toluene). IR 3400 (OH), 1730 (COOC₂H₅), 1620 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.40 (t, 3H, CH₃), 4.37 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.30 (s, 2H, CH₂), 6.33-6.43 (m, 2H, esenoato H-3,5), 6.89-7.38 (m, 8H, benzene H e protoni α-β del pirrolo), 7.68 (d, 1H, J_t=15.3

Hz, esenoato H-6), 15.50 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(2-clorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45c). Resa 100%; p.f. 98-99°C (ligroina). IR 3400 (OH), 1710 (COOC₂H₅), 1590 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H, CH₃), 4.36 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.33 (s, 2H, CH₂), 6.30-6.41 (m, 3H, esenoato H-3,5 e protoni β del pirrolo), 6.64 (m, 1H, protoni β del pirrolo), 6.85-6.92 (m, 2H, benzene H e protoni α del pirrolo), 7.13-7.48 (m, 3H, benzene H), 7.57 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-6), 15.30 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(2-metilfenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45d). Resa 89%; p.f. 104-105°C (benzene/cicloesano). IR 3400 (OH), 1730 (COOC₂H₅), 1620 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ (1.41 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.36 (s, 3H, CH₃), 4.37 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.22 (s, 2H, CH₂), 6.27-6.45 (m, 3H, esenoato H-3,5 e protoni β del pirrolo), 6.69-6.72 (m, 3H, benzene-H e protoni α-β del pirrolo), 7.16-7.31 (m, 3H, benzene H), 7.66 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-6), 15.30 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(2-metossifenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45e). Resa 89%; p.f. 104-105°C (benzene/cicloesano). IR 3400 (OH), 1730 (COOEt), 1620 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.38 (t, 3H, CH₂CH₃), 3.90 (s, 3H, CH₃O), 4.35 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.22 (s, 2H, CH₂), 6.28 (m, 1H, protoni β del pirrolo), 6.35 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-5), 6.37 (s, 1H, esenoato H-3), 6.74 (m, 1H, benzene-H), 6.84 (m, 1H, protoni β del pirrolo), 6.87-6.91 (m, 2H, benzene-H), 6.94 (m, 1H, protoni α del pirrolo), 7.24-7.29 (m, 1H, benzene-H), 7.75 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-6), 15.29 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(2-etossifenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45f). Resa 85%; p.f. 73-75°C (benzene/cicloesano). IR 3200 (OH), 1732 (COOEt), 1621 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.38 (t, 3H, OCH_2CH_3), 1.45 (t, 3H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 4.11 (q, 2H, OCH_2CH_3), 4.35 (q, 2H, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$), 5.22 (s, 2H, CH_2), 6.27 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.33-6.37 (m, 2H, esenoato H-3 e H-5), 6.73-6.75 (m, 1H, benzene-H), 6.83 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.86-6.90 (m, 2H, benzene-H), 6.97 (m, 1H, protone α del pirrolo), 7.21-7.26 (m, 1H, benzene-H), 7.73 (d, 1H, $J_t=15.3$ Hz, esenoato H-6), 15.29 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(3-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45g). Resa 77%; p.f. 84-86°C (ligroina). IR 3300 (OH), 1700 (COOC_2H_5), 1600 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.39 (t, 3H, CH_3), 4.34 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.25 (s, 2H, CH_2), 6.33-6.41 (m, 3H, esenoato H-3,5 e protone β del pirrolo), 6.71 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.82-7.06 (m, 4H, benzene H e protone α del pirrolo), 7.27-7.38 (m, 1H, benzene H), 7.58 (d, 1H, $J_t=15.1$ Hz, esenoato H-6), 15.32 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(3-clorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45h). Resa 75%; p.f. 93-95°C (ligroina). IR 3400 (OH), 1721 (COOC_2H_5), 1600 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.38 (t, 3H, CH_3), 4.35 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.22 (s, 2H, CH_2), 6.32-6.41 (m, 3H, esenoato H-3,5 e protone β del pirrolo), 6.86-7.01 (m, 4H, benzene H e protone α - β del pirrolo), 7.27 (m, 2H, benzene H), 7.58 (d, 1H, $J_t=15.3$ Hz, esenoato H-6), 15.00 (bs,

1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(3-metilfenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45i). Resa 72%; p.f. 76-78°C (benzene). IR 3400 (OH), 1720 (COOC₂H₅), 1590 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.38 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃), 4.34 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.19 (s, 2H, CH₂), 6.32-6.40 (m, 3H, esenoato H-3,5 e protoni β del pirrolo), 6.68-7.26 (m, 6H, benzene-H e protoni α-β del pirrolo), 7.67 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-6), 15.25 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(3-metossifenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45j). Resa 100%; p.f. 80-82°C (ligroina). IR 3300 (OH), 1723 (COOEt), 1585 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H, CH₂CH₃), 3.76 (s, 3H, CH₃O), 4.34 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.20 (s, 2H, CH₂), 6.30 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.34-6.37 (m, 2H, esenoato H-3,5), 6.56-6.68 (m, 2H, benzene-H), 6.80-6.86 (m, 2H, benzene-H e protone α del pirrolo), 6.92 (m, 1H, protone β del pirrolo), 7.21-7.28 (m, 1H, benzene-H), 7.63 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-6), 15.00 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(2,6-difluorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45k). Resa 51%; p.f. 125-127°C (ligroina). IR 3400 (OH), 1710 (COOC₂H₅), 1610 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.42 (t, 3H, CH₃), 4.38 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.27 (s, 2H, CH₂), 6.26 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.41 (d, 1H, J_t=15.2 Hz, esenoato H-5), 6.48 (s, 1H, esenoato H-3), 6,80 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.91-7.09 (m, 3H, benzene-H e protone α del pirrolo), 7.27-7.40 (m, 1H, benzene-H), 7.96 (d, 1H, J_t=15.2 Hz, ese-

noato H-6), 15.14 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(3,5-diclorofenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45l). Resa 62%; p.f. 112-113°C (ligroina). IR 3400 (OH), 1724 (COOC₂H₅), 1646 e 1598 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.39 (t, 3H, CH₃), 4.35 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.20 (s, 2H, CH₂), 6.35-6.43 (m, 3H, esenoato H-3,5 e protone β del pirrolo), 6.89-6.91 (m, 4H, benzene H e protone β del pirrolo), 7.28 (m, 1H, protone α del pirrolo), 7.54 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-6), 14.50 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 6-[1-(3,5-dimetilfenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (45m). Resa 46%; p.f. 99-101°C (benzene). IR 3300 (OH), 1729 (COOC₂H₅), 1616 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.38 (t, 3H, CH₂CH₃), 2.27 (s, 6H, CH₃), 4.34 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.15 (s, 2H, CH₂), 6.30 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.34-6.37 (m, 2H, esenoato H-3,5), 6.68 (m, 2H, benzene-H e protone α del pirrolo), 7.66 (d, 1H, J_t=15.3 Hz, esenoato H-6), 14.60 (bs, 1H, OH).

Acidi 6-(1-arilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-2,4-dioxo-5-esenoici (36a-m).**Procedura generale.**

Ad una soluzione dell'estere etilico dell'acido 6-(1-arilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-2,4-dioxo-5-esenoico (**36**) (2.8 mmoli) in una miscela THF/metanolo (1:1) (12.94 ml) viene aggiunta la NaOH 1N (13.94 ml).

La miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 2 ore e 30 minuti, poi è versata su ghiaccio e la soluzione basica acquosa viene estratta con acetato di etile (10 ml).

La fase acquosa è acidificata fino a pH = 3 con HCl 1N e il precipitato che si forma viene estratto con acetato di etile (3 x 50 ml). Le fasi organiche riunite sono poi lavate con soluzione satura di NaCl (3 x 50 ml) fino a neutralità. L'evaporazione del solvente a pressione ridotta fornisce i composti puri.

Acido 6-(1-fenilmetil-1*H*-pirrol-2-il)-2,4-dioxo-5-esenoico (36a).

Resa 68%; p.f. 146-148 °C (toluene). IR 3400 (OH), 1700 (COOH), 1590 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 5.43 (s, 2H, CH₂), 6.30 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.45 (s, 1H, esenoato H-3), 6.69 (d, 1H, J_t=15.4 Hz, esenoato H-5), 7.01-7.12 (m, 2H, protoni α-β del pirrolo), 7.27-7.40 (m, 5H, benzene H), 7.65 (d, 1H, J_t=15.4 Hz, esenoato H-6), 15.50 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(2-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36b).

Resa 86%; p.f. 132-133°C (benzene/toluene). IR 3400 (OH), 1690 (COOH), 1670 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 5.47 (s, 2H, CH₂), 6.32 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.43 (s, 1H, esenoato H-3), 6.53 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.67 (d, 1H, J_t=15.4 Hz, esenoato H-5), 7.02 (m, 1H, protone α del pirro-

lo), 7.25-7.58 (m, 5H, benzene H ed esenoato H-6), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(2-clorofenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36c). Resa 62%; p.f. 157-159°C (toluene). IR 3400 (OH), 1690 (COOH), 1670 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.48 (s, 2H, CH_2), 6.33 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.44 (s, 1H, esenoato H-3), 6.54 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.68 (d, 1H, $J_t=15.4$ Hz, esenoato H-5), 7.03 (m, 1H, protone α del pirrolo), 7.26-7.59 (m, 5H, benzene H ed esenoato H-6), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(2-metilfenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36d). Resa 95%; p.f. 146-147°C (benzene/toluene). IR 3400 (OH), 1700 (COOH), 1580 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.35 (s, 3H, CH_3), 5.39 (s, 2H, CH_2), 6.33 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.44 (s, 1H, esenoato H-3), 6.54 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.66 (d, 1H, $J_t=15.4$ Hz, esenoato H-5), 6.99 (m, 1H, protone α del pirrolo), 7.06-7.26 (m, 4H, benzene H), 7.49 (d, 1H, $J_t=15.4$ Hz, esenoato H-6), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(2-metossifenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36e). Resa 100%; p.f. 142-143°C (toluene). IR 3400 (OH), 1732 (COOH), 1601 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 3.85 (s, 3H, CH_3), 5.27 (s, 2H, CH_2), 6.25 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.41 (s, 1H, esenoato H-3), 6.63 (d, 1H, $J_t=15.3$ Hz, esenoato H-5), 6.70 (m, 1H, benzene H), 6.83-6.87 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.94 (m, 1H, protone α del pirrolo), 7.02 (m, 1H, benzene H), 7.25 (m, 2H, benzene H), 7.67 (d, 1H, $J_t=15.3$ Hz, esenoato H-6), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(2-etossifenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36f). Resa 100%; p.f. 142-143°C (toluene). IR 3400 (OH), 1732 (COOH), 1601 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.35 (t, 3H, CH_3), 4.10 (q, 2H, CH_2), 5.26 (s, 2H, CH_2), 6.25 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.42 (s, 1H, esenoato H-3), 6.62 (d, 1H, $J_t=15.3$ Hz, esenoato H-5), 6.74 (m, 1H, benzene H), 6.83 (m, 1H, benzene H), 6.95 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.98-7.00 (m, 1H, benzene H), 7.20-7.24 (m, 2H, benzene H e protone α del pirrolo), 7.66 (d, 1H, $J_t=15.3$ Hz, esenoato H-6), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(3-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36g). Resa 76%; p.f. 133-135°C (toluene). IR 3200 (OH), 1700 (COOH), 1600 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.47 (s, 2H, CH_2), 6.31 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.40 (s, 1H, esenoato H-3), 6.68 (d, 1H, $J_t=15.0$ Hz, esenoato H-5), 6.79-7.19 (m, 4H, benzene H e protone β del pirrolo), 7.26-7.47 (m, 2H, benzene H e protone α del pirrolo), 7.60 (d, 1H, $J_t=15.0$ Hz, esenoato H-6), 14.41 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(3-clorofenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36h). Resa 80%; p.f. 144-145°C (toluene/cicloesano). IR 3200 (OH), 1700 (COOH), 1600 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.43 (s, 2H, CH_2), 6.29 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.37 (s, 1H, esenoato H-3), 6.67 (d, 1H, $J_t=15.0$ Hz, esenoato H-5), 6.97-7.09 (m, 3H, benzene H e protone β del pirrolo), 7.30-7.40 (m, 3H, benzene H e protone α del pirrolo), 7.58 (d, 1H, $J_t=15.0$ Hz, esenoato H-6), 14.50 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(3-metilfenil)metil-1*H*-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-

esenoico (36i). Resa 95%; p.f. 121-123°C (benzene/cicloesano). IR 3360 (OH), 1700 (COOH), 1590 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.49 (s, 3H, CH_3), 5.33 (s, 2H, CH_2), 6.28 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.44 (s, 1H, esenoato H-3), 6.54 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.63 (d, 1H, $J_t=15.7$ Hz, esenoato H-5), 6.79-7.34 (m, 6H, benzene H e protoni α - β del pirrolo), 7.49 (d, 1H, $J_t=15.7$ Hz, esenoato H-6), 14.25 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(3-metossifenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36j). Resa 100%; p.f. 145-147°C (toluene). IR 3400 (OH), 1713 (COOH), 1614 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 3.70 (s, 3H, CH_3), 5.36 (s, 2H, CH_2), 6.27 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.43 (s, 1H, esenoato H-3), 6.60-6.64 (m, 3H, benzene H ed esenoato H-5), 6.82(m, 1H, benzene H), 6.97 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.94 (m, 1H, protone α del pirrolo), 7.02 (m, 1H, benzene H), 7.22(m, 1H, benzene H), 7.63 (d, 1H, $J_t=15.4$ Hz, esenoato H-6), 13.80 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(2,6-difluorofenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36k). Resa 65%; p.f. 182-183°C (toluene). IR 3360 (OH), 1720 (COOH), 1610 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.40 (s, 2H, CH_2), 6.23 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.50 (s, 1H, esenoato H-3), 6.68 (d, 1H, $J_t=15.4$ Hz, esenoato H-5), 6.92 (m, 1H, protone β del pirrolo), 7.10-7.21 (m, 3H, benzene H e protone α del pirrolo), 7.42-7.46 (m, 1H, benzene H), 7.97 (d, 1H, $J_t=15.4$ Hz, esenoato H-6), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(3,5-diclorofenil)metil-1H-pirrol-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36l). Resa 96%; p.f. $>300^\circ\text{C}$ (toluene/cicloesano). IR 3200 (OH), 1700 (COOH), 1621 (CO) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6)

δ 5.38 (s, 2H, CH₂), 6.24 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.68 (d, 1H, $J_t=16.0$ Hz, esenoato H-5), 6.88 (s, 1H, esenoato H-3), 7.02 (m, 3H, benzene H), 7.18 (m, 1H, protone β del pirrolo), 7.33 (d, 1H, $J_t=16.0$ Hz, esenoato H-6), 7.50 (m, 1H, protone α del pirrolo), 14.50 (bs, 2H, OH).

Acido 6-[1-(3,5-dimetilfenil)metil-1H-pirrolo-2-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (36m). Resa 78%; p.f. 145-147°C (benzene). IR 3100 (OH), 1712 (COOH), 1608 (CO) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 2.19 (s, 6H, CH₃), 5.29 (s, 2H, CH₂), 6.26 (m, 1H, protone β del pirrolo), 6.45 (s, 1H, esenoato H-3), 6.61 (d, 1H, $J_t=15.4$ Hz, esenoato H-5), 6.68 (m, 2H, benzene H), 6.87, 6.96 e 7.27 (m, 3H, benzene H e protoni α - β del pirrolo), 7.61 (d, 1H, $J_t=15.4$ Hz, esenoato H-6), 13.75 (bs, 2H, OH).

4-[(2-Carbometossifenil)amino]-3-buten-2-one (46)

Il metil antranilato (2.2 g, 14.7 mmoli) e il 3-buten-2-one (1 g, 14.7 mmoli) vengono sciolti in metanolo (11.7 ml) in bagno ad acqua, mantenendo la temperatura al di sotto di 20°C.

Dopo aver chiuso ermeticamente il pallone di reazione con un tappo di plastica, la miscela è portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per 73 ore. Dopo tale periodo, si aggiunge acqua e si raffredda in bagno a ghiaccio.

Il precipitato ottenuto viene filtrato e purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, eluendo con una miscela di acetato di etile/*n*-esano (2:5).

La frazione contenente il prodotto viene cristallizzata in benzene, ottenendo il composto **46** puro (1.11 g, resa 53%); p.f. 103 °C (benzene).

3-Acetil-4(1*H*)-chinolone (47)

Il 4-[(2-Carbometossifenil)amino]-3-buten-2-one (**46**) (5.97 g, 27.2 mmoli) è trattato con una soluzione metanolica di metossido di sodio, preparata sciogliendo il sodio metallico (2.97 g, 129 mmoli) in metanolo (38 ml).

La miscela di reazione viene lasciata a riflusso per 3 ore e 10 minuti; si aggiunge acqua fredda (700 ml) e si estrae con diclorometano (2x175 ml).

La fase acquosa è acidificata con acido solforico 1N e raffreddata in bagno a ghiaccio fino a completa precipitazione.

Il solido ottenuto viene filtrato, lavato con acqua ed essiccato sotto lampada IR, ottenendo il composto **47** puro (2.84 g, resa 56%); p.f. 240-244 °C (acetone).

3-Acetil-4(1H)-chinoloni (50p-t, w-y). Procedura generale

Una miscela di trietil ortoformiato (4.00 g, 27 mmoli), di etil acetato (3.51 g, 27 mmoli), dell'appropriata anilina (27 mmoli) e di Dowterm A (5.64 ml) viene posta in un pallone equipaggiato con separatore di azeotropi e riscaldata a 95°C in un'ora. La temperatura viene innalzata fino a 162°C in un'ora e lasciata sotto agitazione a tale temperatura per 6h, spazzando periodicamente con Argon. Tale miscela viene aggiunta nell'arco di tre ore al Dowterm A precedentemente riscaldato a 253°C e posto in un pallone equipaggiato con separatore di azeotropi. terminate le aggiunte si lascia sotto agitazione a 253°C per 1h e 20 minuti. Si raffredda a 90°C e si aggiunge isopropanolo (10 ml), che favorisce la precipitazione di un solido. Dopo raffreddamento si filtra il solido su gooch e si lava con isopropanolo ed etere di petrolio. Si filtra su colonna di silice eluendo prima con cicloesano e poi con acetato di etile, ottenendo i prodotti puri.

3-Acetil-6-fluoro-4(1H)-chinolone (50p). Resa 25%; p.f. >300°C (EtOH).

3-Acetil-6-cloro-4(1H)-chinolone (50q). Resa 29%; p.f. >300°C (EtOH).

3-Acetil-7-fluoro-4(1H)-chinolone (50s). Resa 41%; p.f. 270-271°C (isopropanolo).

3-Acetil-7-cloro-4(1H)-chinolone (50t). Resa 3%; p.f. >300°C (EtOH).

3-Acetil-8-fluoro-4(1H)-chinolone (50w). Resa 40%; p.f. 268-

270°C (EtOH).

3-Acetil-8-cloro-4(1H)-chinolone (50x). Resa 38%; p.f. >300°C (EtOH).

3-Acetil-6,7-dicloro-4(1H)-chinolone (50y). Resa 19%; p.f. 220-222°C (toluene).

3,6-Diacetil 4(1*H*)-chinolone (50r)

Una miscela di 4-amminoacetofenone (2 g, 14.8 mmoli) ed etil etossimetilene acetoacetato (2.8 g, 14.8 mmoli) è posta a 120°C per 5 minuti. Dopo raffreddamento, si filtra il solido ottenuto e si lava con *n*-esano ed una piccola quantità di cloroformio, ottenendo l'estere etilico dell'acido 2-[[4-acetilfenil)ammino]metilene]-3-oxobutanoico (resa 73%; p.f. (benzene)). Questo intermedio viene aggiunto al difenil etere bollente (25 ml) e posto a riflusso per 50 minuti. Dopo raffreddamento si diluisce con *n*-esano (50 ml) ed il precipitato ottenuto è filtrato su gooch. Si filtra su colonna di gel di silice eluendo prima con etil acetato e poi con una miscela cloroformio-metanolo 10:1, ottenendo il composto **50r** puro. Resa 56%; p.f. >300°C (DMF/acqua).

3-Acetil-1-arilmetil-4(1H)-chinoloni (48a-e, g-u, w-y).

Procedura generale.

Una soluzione di 3-acetil-4(1H)-chinolone (10.7 mmoli) in DMF anidra (93 ml), è trattata con K₂CO₃ anidro (2.04 g, 14.7 mmoli) e alogenuro benzilico (30.9 mmoli).

La miscela di reazione viene termostata a 100°C e mantenuta sotto agitazione per 1 ora.

Dopo raffreddamento, si diluisce con acqua.

Il precipitato ottenuto viene filtrato, lavato con acqua ed etere di petrolio ed essiccato sotto lampada IR, ottenendo i derivati puri.

Per la sintesi dei composti **48l** e **48n**, la miscela di reazione è versata su acqua ed estratta con acetato di etile.

Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione satura di NaCl ed essiccate su Na₂SO₄ anidro.

Si elimina il solvente a pressione ridotta, ottenendo i derivati **48l** (resa 26%) e **48n** (resa 73%) puri.

3-Acetil-1-fenilmetil-4(1H)-chinolone (48a). Resa 73%; p.f. 212-213°C (benzene/cicloesano).

3-Acetil-1-(2-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48b). Resa 79%; p.f. 199-201°C (toluene).

3-Acetil-1-(3-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48c). Resa 82%; p.f. 247-248°C (DMF/acqua).

3-Acetil-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48d). Resa 65%; p.f. 213-214°C (toluene).

3-Acetil-1-(4-clorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48e). Resa 82%;
p.f. 242-243°C (DMF/acqua).

3-Acetil-1-(2-metossifenil)metil-4(1H)-chinolone (48g). Resa
88%; p.f. 204-206°C (benzene).

3-Acetil-1-(3-metossifenil)metil-4(1H)-chinolone (48h). Resa
86%; p.f. 175-177°C (benzene/cicloesano).

3-Acetil-1-(4-metossifenil)metil-4(1H)-chinolone (48i). Resa
88%; p.f. 165-166°C (benzene/cicloesano).

3-Acetil-1-(4-nitrofenil)metil-4(1H)-chinolone (48j). Resa 80%;
p.f. 160-161°C (DMF/acqua).

3-Acetil-1-(2,6-difluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48k). Resa
74%; p.f. 192-193°C (benzene).

3-Acetil-1-(4-fenil)butil-4(1H)-chinolone (48l). Resa 26%; p.f. 99-
101°C (benzene/*n*-esano).

3-Acetil-1-(2-naftil)metil-4(1H)-chinolone (48m). Resa 69%; p.f.
226-227°C (MeOH).

3-Acetil-1-(2-piridinil)metil-4(1H)-chinolone (48n). Resa 73%;
p.f. 254-256°C (DMF/acqua).

3-Acetil-1-(2-chinolinil)metil-4(1H)-chinolone (48o). Resa 100%;
p.f. 241-242°C (DMF/acqua).

3-Acetil-6-fluoro-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48p).

Resa 94%; p.f. 234-235°C (toluene/cicloesano).

3-Acetil-6-cloro-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48q).

Resa 92%; p.f. 214-216°C (toluene/cicloesano).

3,6-Diacetil-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48r).

Resa 89%; p.f. 213-214°C (toluene).

3-Acetil-7-fluoro-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48s).

Resa 100%; p.f. 186-187°C (benzene/cicloesano).

3-Acetil-7-cloro-1-(2-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48t).

Resa 86%; p.f. 213-215°C (benzene).

3-Acetil-7-cloro-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48u).

Resa 73%; p.f. 185-187°C (toluene/cicloesano).

3-Acetil-8-fluoro-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48w).

Resa 80%; p.f. 193-194°C (benzene/cicloesano).

3-Acetil-8-cloro-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48x).

Resa 92%; p.f. 215-216°C (benzene).

3-Acetil-6,7-dicloro-1-(4-fluorofenil)metil-4(1H)-chinolone (48y).

Resa 49%; p.f. 235-237°C (toluene).

3-Acetil-1-(4-idrossifenil)metil-4-(1*H*)-chinolone (48f).

Una soluzione del 3-acetil-1-(4-metossifenil)metil-4(1*H*)-chinolone (**48i**) (0.8 g, 2.6 mmoli) in diclorometano (29 ml) è aggiunta goccia a goccia ad una soluzione 1M di BBr₃ in diclorometano (13.7 mmoli, 13.7 ml) posta alla temperatura di -45°C.

La miscela di reazione è mantenuta sotto agitazione a -45°C per 25 minuti. Si diluisce con acqua e si filtra il precipitato ottenuto. Il solido viene lavato con acqua ed etere di petrolio, essiccato sotto lampada IR, ottenendo il composto **48f** puro (0.73 g, resa 96%); p.f. 203-205°C (MeOH).

**3-Acetil-7-(1-pirrolidinil)1-(4-fluorofenil)metil-4-(1*H*)-chinolone
(48v).**

Il chinolone di partenza (**48s**) (2.67 g, 8.5 mmoli) è sospeso in 40 ml di DMF e trattato con trietilammina (0.67g, 6.7 mmoli) e pirrolidina (1.82g, 25.6 mmoli, 2.12 ml). Si pone a reagire in reattore a microonde (potenza massima applicata: 100 W, temperatura: 153°C, tempo di rampa: 10 minuti, open vessel) per 10 minuti. Dopo raffreddamento si versa su acqua, si porta il pH a 7 e si filtra il solido ottenuto. Si lava con acqua ed etere di petrolio. Si cromatografa su colonna in gel di silice eluendo con una miscela acetato di etile/cloroformio 1:1, ottenendo il composto **48v** puro. Resa 62%; p.f. 155-157°C (toluene/cicloesano).

Esteri etilici degli acidi 4-(1,4-diidro-1-aril-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoici (49a-y). Procedura generale.

Ad una miscela del 3-acetil-1-aril-4(1*H*)-chinolone (**48**) (6.3 mmoli) ed ossalato dietilico (1.84 g, 12.6 mmoli) in THF anidro (7 ml) è aggiunto, in atmosfera inerte, etossido di sodio solido, preparato sciogliendo il sodio metallico (0.29 g, 12.8 mmoli) in EtOH assoluto (10 ml).

La miscela di reazione è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 ora e 30 minuti.

La soluzione è versata su *n*-esano (126 ml) ed il precipitato ottenuto viene filtrato e triturato in HCl 1N (126 ml).

Il solido in sospensione viene filtrato, lavato con acqua e poi con etere di petrolio. Il prodotto così ottenuto viene essiccato sotto lampada IR, ottenendo i derivati puri.

Per la preparazione dei derivati **49n** e **49o**, la miscela di reazione viene versata su *n*-esano. Il precipitato ottenuto è filtrato e triturato con acqua (**49n**) o con una soluzione satura di sodio bicarbonato (**49o**). Il solido viene quindi filtrato, lavato con acqua ed etere di petrolio, ed essiccato sotto lampada IR, ottenendo i composti **40n** (resa 78%) e **40o** (100%) puri.

Estere etilico dell'acido 4-(1,4-diidro-1-fenilmetil-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (49a). Resa 99%; p.f. 141-142°C (benzene). IR 1740 (CO estere), 1648 e 1629 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1.30 (t, 3H, CH₃), 4.30 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.77 (s, 2H, CH₂), 7.23-7.36 (m, 5H, benzene-H), 7.45-7.52 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.69-7.74 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.02 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.31-8.33 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.12 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.75 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(2-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49b). Resa 92%; p.f. 152-153°C (toluene). IR 1744 (CO estere), 1652 e 1612 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.29 (t, 3H, CH_3), 4.30 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.81 (s, 2H, CH_2), 7.12-7.28 (m, 3H, benzene H), 7.34-7.52 (m, 2H, chinolone C6-H e benzene H), 7.68-7.76 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.99 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.31-8.33 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.09 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.75 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(3-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49c). Resa 94%; p.f. 174-175°C (MeOH). IR 1740 (CO estere), 1650 e 1613 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.29 (t, 3H, CH_3), 4.29 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.78 (s, 2H, CH_2), 7.07-7.21 (m, 3H, benzene H), 7.35-7.51 (m, 2H, chinolone C6-H e benzene H), 7.66-7.74 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.01 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.31-8.33 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.12 (s, 1H, chinolone C2-H), 16.00 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(4-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49d). Resa 82%; p.f. 175-177°C (EtOH). IR 3400 (OH), 1721 (CO estere), 1661 e 1607 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.44 (t, 3H, CH_3), 4.42 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.48 (s, 2H, CH_2), 7.06-7.26 (m, 4H, benzene H), 7.39 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.51 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.63 (m, 1H, chinolone C8-H), 8.16 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.56 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.77 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.50 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(4-clorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49e). Resa 91%; p.f. 174-176°C (toluene). IR 1723 (CO estere), 1643 e 1611 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.30 (t, 3H, CH_3), 4.29 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.77 (s, 2H, CH_2), 7.30-7.32 (m, 2H, benzene H), 7.40-7.42 (m, 2H, benzene H), 7.49-7.52 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.66-7.68 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.72-7.74 (m, 1H, chinolone C7-H), 8.01 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.31-8.34 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.14 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.60 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(4-idrossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49f). Resa 64%; p.f. 179-181°C (MeOH). IR 3141 (OH), 1733 (CO estere), 1600 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.30 (t, 3H, CH_3), 4.31 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.61 (s, 2H, CH_2), 6.71-6.73 (m, 2H, benzene H), 7.13-7.15 (m, 2H, benzene H), 7.41-7.50 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.72-7.76 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.78-7.80 (m, 1H, chinolone C8-H), 8.00 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.30-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.06 (s, 1H, chinolone C2-H), 9.51 (bs, 1H, fenolo OH), 14.00 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(2-metossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49g). Resa 98%; p.f. 154-156°C (toluene). IR 1734 (CO estere), 1638 e 1602 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.28 (t, 3H, CH_3CH_2), 3.82 (s, 3H, CH_3O), 4.29 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.63 (s, 2H, CH_2), 6.88-6.91 (m, 1H, benzene H), 7.06-7.08 (m, 1H, benzene H), 7.13-7.15 (m, 1H, benzene H), 7.29-7.33 (m, 1H, benzene H), 7.44-7.52 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.71-7.76 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.01 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.30-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H),

9.05 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.25 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(3-metossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49h). Resa 94%; p.f. 177-179°C (toluene). IR 1729 (CO estere), 1628 e 1603 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.29 (t, 3H, CH_3CH_2), 3.70 (s, 3H, CH_3O), 4.29 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.73 (s, 2H, CH_2), 6.71-6.73 (m, 1H, benzene H), 6.85-6.90 (m, 2H, benzene H), 7.22-7.26 (m, 1H, benzene H), 7.47-7.52 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.70-7.75 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.01 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.31-8.33 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.11 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.75 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(4-metossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49i). Resa 91%; p.f. 154-156°C (MeOH). IR 1734 (CO estere), 1638 e 1602 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.28 (t, 3H, CH_3CH_2), 3.68 (s, 3H, CH_3O), 4.29 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.67 (s, 2H, CH_2), 6.89-6.91 (m, 2H, benzene H), 7.24-7.26 (m, 2H, benzene H), 7.48-7.52 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.71-7.79 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.00 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.29-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.10 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.60 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(4-nitrofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49j). Resa 88%; p.f. 175-176°C (toluene). IR 1718 (CO estere), 1638 e 1607 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.30 (t, 3H, CH_3), 4.32 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.94 (s, 2H, CH_2), 7.46-7.54 (m, 3H, chinolone C6-H e benzene H), 7.59-7.61 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.66-7.69 (m, 1H, chinolone C7-H), 8.02 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.18-8.20 (m,

2H, benzene H), 8.32-8.34 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.18 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.60 (bs, 1H, OH).

Etere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(2,6-difluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49k). Resa 92%; p.f. 172-173°C (benzene/toluene). IR 3400 (OH), 1736 (CO estere), 1637 e 1602 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.29 (t, 3H, CH_3), 4.30 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.85 (s, 2H, CH_2), 7.15-7.20 (m, 2H, benzene H), 7.45-7.54 (m, 2H, chinolone C6-H e benzene H), 7.66-7.69 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.78-7.82 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.99 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.28-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.11 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.50 (bs, 1H, OH).

Etere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(2-fenilbutil)-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49l). Resa 76%; p.f. 88-90°C (cicloesano). IR 1716 (CO estere), 1635 e 1606 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.26 (t, 3H, CH_3), 1.58-1.65 (m, 2H, CH_2), 1.75-1.77 (m, 2H, CH_2), 2.59 (t, 2H, CH_2Ph), 4.25 (q, 2H, CH_2CH_3), 4.47 (t, 2H, CH_2N), 7.12-7.25 (m, 5H, butenoato C3-H e benzene H), 7.48-7.50 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.74-7.78 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.30-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.77 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.75 (bs, 2H, OH).

Etere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(2-naftil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49m). Resa 78%; p.f. 153-154°C (DMF/acqua). IR 3447 (OH), 1734 (CO estere), 1629 e 1603 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.28 (t, 3H, CH_3), 4.32 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.94 (s, 2H, CH_2), 7.36-7.49 (m, 4H, naftalene H), 7.66-7.75 (m, 2H, naftalene H), 7.79 (s, 1H, naftalene H), 7.84-7.92 (m, 3H, chinolone C8-H, C7-H e C6-H), 8.04 (s, 1H, bute-

noato C3-H), 8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.20 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.20 (bs, 1H, OH).

Etere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(2-piridinil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49n). Resa 66%; p.f. 172-173°C (benzene/toluene). IR 1717 (CO estere), 1645 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.28 (t, 3H, CH_3), 4.28 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.82 (s, 2H, CH_2), 7.08 (m, 2H, piridina H), 7.39 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.55 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.79 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.95 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.50 (m, 2H, piridina H), 9.10 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.50 (bs, 1H, OH).

Etere etilico dell'acido 4-[1,4-diidro-1-(2-chinolinil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49o). Resa 100%; p.f. 237-238°C (DMF/acqua). IR 3400 (OH), 1712 (CO estere), 1634 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.16 (m, 3H, CH_3), 4.30 (m, 2H, CH_2CH_3), 5.98 (s, 1H, CH_2), 7.11-7.94 (m, 9H, C6-H, C7-H, C8-H chinolone, butenoato C3-H e chinolina H), 8.30 (m, 2H, chinolone C5-H e chinolina C5-H), 9.04 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.40 (bs, 1H, OH).

Etere etilico dell'acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49p). Resa 92%; p.f. 152-153°C (toluene/cicloesano). IR 1740 (CO estere), 1650 e 1624 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.29 (t, 3H, CH_3), 4.30 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.78 (s, 2H, CH_2), 7.16-7.20 (m, 2H, benzene H), 7.29-7.37 (m, 2H, benzene H), 7.66 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.81 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.97 (m, 1H, chinolone C2-H), 15.33 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-6-cloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49q). Resa 34%; p.f. 131-133°C (lavaggi con cicloesano). IR 3400 (OH), 1722 (CO estere), 1700 e 1628 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.33 (t, 3H, CH_3), 4.33 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.71 (s, 2H, CH_2), 7.14-7.34 (m, 4H, benzene H), 7.71-7.77 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.91 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.25 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.09 (s, 1H, chinolone C2-H), 12.70 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[6-(3-carbossietil-3-oxopropionil)-1,4-diidro-1-(4-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49r). Resa 52%; p.f. 177-180°C (DMF/acqua). IR 3300 (OH), 1720 (CO estere), 1670 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.32 (t, 6H, CH_3), 4.29 (q, 4H, CH_2CH_3), 5.72 (s, 2H, CH_2), 7.16-7.35 (m, 5H, benzene H e butenoato C3-H), 7.79 (m, 1H, chinolone C8-H), 8.28 (m, 1H chinolone C8-H), 8.82 (m, 1H chinolone C5-H), 8.98 (m, 1H, chinolone C2-H), 14.00 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-7-fluoro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49s). Resa 84%; p.f. 152-153°C (benzene/cicloesano). IR 1726 (CO estere), 1644 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.30 (t, 3H, CH_3), 4.30 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.72 (s, 2H, CH_2), 7.17-7.21 (m, 2H, benzene H), 7.31-7.40 (m, 3H, benzene H e chinolone C6-H), 7.62 (m, 1H, chinolone C8-H) 7.97 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.36 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.10 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.00 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1-(2-fluorofenil)metil-7-cloro-1,4-dii-

dro-4-oxochinolin-3-il)]-2,4-dioxobutanoico (49t). Resa 80%; p.f. 173-175°C (benzene). IR 1721 (CO estere), 1627 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.35 (t, 3H, CH_3), 4.35 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.88 (s, 2H, CH_2), 7.22-7.26 (m, 1H, benzene H), 7.31-7.37 (m, 2H, benzene H), 7.43-7.48 (m, 1H, benzene H), 7.60-7.62 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.90-7.92 (m, 1H, chinolone C8-H), 8.00 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.35-8.37 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.12 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.75 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-7-cloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il)]-2,4-dioxobutanoico (49u). Resa 76%; p.f. 173-175°C (lavaggi con isopropanolo). IR 3300 (OH), 1727 (CO estere), 1647 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.30 (t, 3H, CH_3), 4.32 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.76 (s, 2H, CH_2), 7.16-7.25 (m, 2H, benzene H), 7.36-7.38 (m, 2H, benzene H), 7.54 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.88 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.96 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.29 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.08 (s, 1H, chinolone C2-H), 12.70 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-7-(1-pirrolidinil)-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il)]-2,4-dioxobutanoico (49v). Resa 82%; p.f. 170°C (dec) (MeOH). IR 3300 (OH), 1735 (CO estere), 1621 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.31 (t, 3H, CH_3), 1.98-2.10 (m, 4H, pirrolidina H), 3.32-3.36 (m, 1H, pirrolidina H), 4.30 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.64 (s, 2H, CH_2), 6.37-6.39 (m, 1H, chinolone C8-H), 6.77-6.79 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.29-7.32 (m, 2H, benzene H), 7.45-7.48 (m, 2H, benzene H), 8.12-8.16 (m, 2H, chinolone C5-H e butenoato C3-H), 8.79 (s, 1H, chinolone C2-H), 13.50 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-8-fluoro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49w). Resa 83%; p.f. 179-180°C (benzene/cicloesano). IR 3300 (OH), 1744 (CO estere), 1648 e 1604 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.27 (t, 3H, CH_3), 4.30 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.78 (s, 2H, CH_2), 7.14-7.24 (m, 4H, benzene H), 7.48-7.53 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.59-7.69 (m, 1H, chinolone C7-H) 7.97 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.17-8.19 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.01 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.50 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-8-cloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49x). Resa 98%; p.f. 164-165°C (toluene). IR 3400 (OH), 1749 (CO estere), 1644 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.29 (t, 3H, CH_3), 4.30 (q, 2H, CH_2CH_3), 6.09 (s, 2H, CH_2), 7.14-7.16 (m, 4H, benzene H), 7.15 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.82 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.91 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.34 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.81(s, 1H, chinolone C2-H), 15.25 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-6,7-dicloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (49y). Resa 98%; p.f. 144-145°C (toluene/cicloesano). IR 1727 (CO estere), 1638 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.35 (t, 3H, CH_3), 4.38 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.82 (s, 2H, CH_2), 7.18-7.30 (m, 2H, benzene H), 7.43-7.46 (m, 2H, benzene H), 7.98 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.14 (s, 1H, chinolone C8-H), 8.41 (s, 1H, chinolone C5-H), 9.14 (s, 1H, chinolone C2-H), 16.00 (bs, 1H, OH).

Acidi 4-(1,4-diidro-1-aril-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoici (37a-y). Procedura generale.

Ad una soluzione dell'estere etilico dell'acido 4-(1,4-diidro-1-aril-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (**49**) (3.3 mmoli) in una miscela THF/metanolo (1:1) (32 ml), viene aggiunta NaOH 1N (16.5 ml).

La miscela di reazione è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 ora, quindi versata su ghiaccio e acidificata fino a pH 3 con HCl 1N.

Il solido ottenuto viene filtrato e lavato con acqua, *n*-esano ed etere di petrolio, essiccato sotto lampada IR, ottenendo i derivati **37** puri.

Per la sintesi del derivato **37n**, la miscela di reazione, dopo essere stata versata su ghiaccio, è acidificata fino a pH 5.

Per la purificazione dei derivati **37c-e**, il precipitato ottenuto dopo acidificazione viene lavato con acqua, etanolo assoluto bollente (1 volta) e con etere di petrolio.

Per la purificazione dei derivati **37f-g**, il solido ottenuto viene lavato con acqua, isopropanolo (1 volta) e con etere di petrolio.

Per la purificazione dei derivati **37j,k,m,o**, il solido viene lavato con acqua, etanolo assoluto e con etere di petrolio.

Acido 4-(1,4-diidro-1-fenilmetil-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (37a). Resa 81%; p.f. 141-142°C (DMF/acqua). IR 3424 (OH), 1726 (CO acido), 1625 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 5.75 (s, 2H, CH₂), 7.22-7.36 (m, 5H, benzene H), 7.42-7.48 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.65-7.70 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.90 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.30-8.32 (m, 2H, chinolone C5-H), 9.08 (s, 1H, chinolone C2-H), 16.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(2-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37b). Resa 83%; p.f. 172-174°C (toluene). IR 3400 (OH), 1748 (CO acido), 1621 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 5.81 (s, 2H, CH_2), 7.14-7.28 (m, 3H, benzene H), 7.35-7.50 (m, 2H, chinolone C6-H e benzene H), 7.70-7.74 (m, 2H, chinolone C7-H and C8-H), 7.95 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.31-8.33 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.08 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(3-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37c). Resa 75%; p.f. 158-159°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3392 (OH), 1720 (CO acido), 1630 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 5.76 (s, 2H, CH_2), 7.05-7.18 (m, 3H, benzene H), 7.26-7.48 (m, 2H, chinolone C6-H e benzene H), 7.66-7.69 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.03 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.29-8.31 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.08 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.75 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(4-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37d). Resa 50%; p.f. 207-209°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3400 (OH), 1732 (CO acido), 1619 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 5.79 (s, 2H, CH_2), 7.22-7.38 (m, 4H, benzene H), 7.53 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.76 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.01 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.34 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.16 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.50 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(4-clorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37e). Resa 86%; p.f. 177-199°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3400 (OH), 1700 (CO acido), 1630 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 5.76 (s, 2H, CH_2), 7.29-7.31 (m,

2H, benzene H), 7.39-7.41 (m, 2H, benzene H), 7.48-7.51 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.65-7.67 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.70-7.73 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.97 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.30-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.11 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.53 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(4-idrossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37f). Resa 77%; p.f. 207-208°C (lavaggi con isopropanolo). IR 3135 (OH), 1718 (CO acido), 1600 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.59 (s, 2H, CH_2), 6.71-6.73 (m, 2H, benzene H), 7.11-7.13 (m, 2H, benzene H), 7.46-7.49 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.67-7.78 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.92 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.28-8.30 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.00 (s, 1H, chinolone C2-H), 9.50 (bs, 1H, fenolo OH), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(2-metossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37g). Resa 94%; p.f. 172-175°C (lavaggi con isopropanolo). IR 3400 (OH), 1728 (CO acido), 1620 e 1611 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 3.82 (s, 3H, CH_3), 5.68 (s, 2H, CH_2), 6.86-6.90 (m, 1H, benzene H), 7.01-7.08 (m, 1H, benzene H), 7.11-7.13 (m, 1H, benzene H), 7.29-7.32 (m, 1H, benzene H), 7.43-7.50 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.71-7.75 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.95 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.29-8.31 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.02 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(3-metossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37h). Resa 80%; p.f. 179-181°C (lavaggi con isopropanolo). IR 3400 (OH), 1748 (CO acido), 1630 e 1602 (CO

chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 3.70 (s, 3H, CH_3), 5.65 (s, 2H, CH_2), 6.70-6.72 (m, 1H, benzene H), 6.85-6.89 (m, 2H, benzene H), 7.22-7.26 (m, 1H, benzene H), 7.45-7.51 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.66-7.74 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.98 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.30-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.09 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(4-metossifenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37i). Resa 100%; p.f. 149-150°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3400 (OH), 1726 (CO acido), 1620 e 1611 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 3.69 (s, 3H, CH_3), 5.66 (s, 2H, CH_2), 6.89 (m, 2H, benzene H), 7.24-7.26 (m, 2H, benzene H), 7.44-7.50 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.70-7.78 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.93 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.29-8.31 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.07 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.15 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(4-nitrofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37j). Resa 90%; p.f. 230-232°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3100 (OH), 1731 (CO acido), 1634 e 1602 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 5.87 (s, 2H, CH_2), 7.45-7.52 (m, 3H, chinolone C6-H e benzene H), 7.57-7.59 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.67-7.69 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.92 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.18-8.20 (m, 2H, benzene H), 8.31-8.33 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.12 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(2,6-difluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37k). Resa 64%; p.f. 179-181°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3600 (OH), 1748 (CO acido), 1620 (CO

chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 5.82 (s, 2H, CH_2), 7.14-7.18 (m, 2H, benzene H), 7.47-7.49 (m, 2H, chinolone C6-H e benzene H), 7.66-7.68 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.76-7.78 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.88 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.29-8.31 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.06 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(4-fenilbutil)-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37l). Resa 100%; p.f. 136-138°C (DMF/acqua). IR 3400 (OH), 1747 (CO acido), 1623 e 1603 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 1.61-1.66 (m, 2H, CH_2), 1.72-1.82 (m, 2H, CH_2), 2.60 (t, 2H, CH_2Ph), 4.47 (t, 2H, CH_2N), 7.12-7.25 (m, 6H, butenoato C3-H e benzene H), 7.47-7.53 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.78-7.83 (m, 2H, chinolinone C7-H and C8-H), 8.30-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.86 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.00 (bs, 1H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(2-naftil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37m). Resa 50%; p.f. 212-213°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3400 (OH), 1710 (CO acido), 1638 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 5.89 (s, 2H, CH_2), 7.38-7.49 (m, 4H, naftalene H), 7.64-7.75 (m, 3H, naftalene H), 7.85-7.91 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.97 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.30-8.32 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.14 (s, 1H, chinolone C2-H), 16.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(4-piridinil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37n). Resa 66%; p.f. >270°C (DMSO/acqua). IR 3240 (OH), 1700 (CO acido), 1600 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 5.79 (s, 2H, CH_2), 7.18 (m, 2H, piridina H), 7.45-

7.66 (m, 3H, chinolone C8-H, C7-H e C6-H), 7.98 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.33 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.51 (m, 2H, piridina H), 9.12 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1,4-diidro-1-(2-chinolinil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37o). Resa 62%; p.f. >300°C (DMF/acqua). IR 3400 (OH), 1700 (CO acido), 1633 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.98 (s, 2H, CH_2), 7.40-7.48 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.47-7.49 (m, 1H, chinolina C4-H), 7.55-7.62 (m, 2H, chinolina C7-H e C6-H), 7.68-7.72 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.81-7.83 (m, 1H, chinolina C8-H), 7.93-7.95 (m, 2H, chinolone C8-H e butenoato C3-H), 8.30-8.32 (m, 1H, chinolina C5-H), 8.38-8.40 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.94 (s, 1H, chinolone C2-H), 17.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37p). Resa 95%; p.f. 183-184°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3100 (OH), 1730 (CO acido), 1613 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.76 (s, 2H, CH_2), 7.16-7.20 (m, 2H, benzene H), 7.33-7.36 (m, 2H, benzene H), 7.65 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.80 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.94-7.97 (m, 2H, chinolone C5-H e butenoato C3-H), 9.10 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.67 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-6-cloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37q). Resa 71%; p.f. 194-197°C (DMF/acqua). IR 3385 (OH), 1710 (CO acido), 1663 e 1622 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.72 (s, 2H, CH_2), 7.18-7.32 (m, 4H, benzene H), 7.75-7.85 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.22 (m, 1H, C5-H chinolone), 7.90 (s, 1H, butenoato C3-

H), 9.08 (s, 1H, chinolone C2-H), 13.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[6-(3-carbossietil-3-oxopropionil)-1,4-diidro-1-(4-fluorofenil)metil-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37r). Resa 75%; p.f. 184-187°C (DMF/acqua). IR 3400 (OH), 1732 (CO acido), 1651 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.79 (s, 2H, CH_2), 7.06 (s, 1H, butenoato C3-H), 7.16-7.20 (m, 2H, benzene H), 7.35-7.37 (m, 2H, benzene H), 7.84 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.95 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.30 (m, 1H, chinolone C7-H), 8.85 (m, 1H, C5-H chinolone), 9.13 (s, 1H, C2-H chinolone), 12.0-16.0 (bs, 4H, OH).

Acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-7-fluoro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37s). Resa 95%; p.f. 162-163°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3300 (OH), 1719 (CO acido), 1635 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.70 (s, 2H, CH_2), 7.14-7.21 (m, 2H, benzene H), 7.31-7.37 (m, 3H, benzene H e chinolone C6-H), 7.60 (m, 1H, chinolone C8-H) 7.93 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.34 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.05 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.60 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1-(2-fluorofenil)metil-7-cloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37t). Resa 82%; p.f. 187-189°C (lavaggi con isopropanolo). IR 3400 (OH), 1732 (CO acido), 1621 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.88 (s, 2H, CH_2), 7.22-7.36 (m, 3H, benzene H), 7.44-7.46 (m, 1H, benzene H), 7.59-7.62 (m, 2H, chinolone C6-H), 7.70-7.74 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.90 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.35-8.37 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.10 (s, 1H, chinolone C2-H), 15.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-7-cloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37u). Resa 64%; p.f. 188-190°C (lavaggi con isopropanolo). IR 3400 (OH), 1734 (CO acido), 1646 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.75 (s, 2H, CH_2), 7.21-7.36 (m, 4H, benzene H), 7.55 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.83-7.85 (m, 2H, chinolone C8-H e butenoato C3-H), 8.30 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.07 (s, 1H, chinolone C2-H), 13.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-7-(1-pirrolidinil)-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37v). Resa 87%; p.f. 197-199°C (lavaggi con isopropanolo). IR 3300 (OH), 1718 (CO acido), 1614 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 2.06-2.13 (m, 4H, pirrolidina H), 3.26-3.30 (m, 4H, pirrolidina H), 5.77 (s, 2H, CH_2), 6.42-6.45 (m, 1H, chinolone C8-H), 6.81-6.85 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.18-7.25 (m, 2H, benzene H), 7.49-7.52 (m, 2H, benzene H), 8.02 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.15-8.17 (m, 1H, chinolone C5-H), 9.09 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.00 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-8-fluoro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37w). Resa 78%; p.f. 180-181°C (lavaggi con EtOH assoluto freddo). IR 3300 (OH), 1732 (CO acido), 1634 e 1602 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.86 (s, 2H, CH_2), 7.12-7.23 (m, 4H, benzene H), 7.45-7.50 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.57-7.62 (m, 1H, chinolone C7-H), 7.70 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.16-8.18 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.96 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.30 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-8-cloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-

3-il]-2,4-dioxobutanoico (37x). Resa 82%; p.f. 175-177°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3300 (OH), 1742 (CO acido), 1637 e 1603 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 6.08 (s, 2H, CH_2), 7.00-7.30 (m, 4H, benzene H), 7.44-7.46 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.81-7.83 (m, 2H, butenoato C3-H e chinolone C7-H), 8.33-8.35 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.89 (s, 1H, chinolone C2-H), 14.70 (bs, 2H, OH).

Acido 4-[1-(4-fluorofenil)metil-6,7-dicloro-1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (37y). Resa 86%; p.f. 175-177°C (lavaggi con isopropanolo). IR 3300 (OH), 1722 (CO acido), 1630 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 5.75 (s, 2H, CH_2), 7.17-7.22 (m, 2H, benzene H), 7.32-7.39 (m, 2H, benzene H), 7.88 (s, 1H, chinolone C8-H), 8.06 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.32 (s, 1H, chinolone C5-H), 9.05 (s, 1H, chinolone C2-H), 16.00 (bs, 2H, OH).

Esteri etilici dell'acidi 4-(1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoici (52a-d). Procedura generale.

Ad una miscela dell'appropriato chinolone **50** (2.67 mmoli) ed ossalato dietilico (0.78 g, 5.34 mmoli) in THF anidro (2.67 ml) è aggiunto etossido di sodio (0.38 g, 5.4 mmoli) in atmosfera inerte. La miscela è tenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 20 ore, quindi è effettuata un'aggiunta di etossido di sodio (0.1 g, 1.35 mmoli). Dopo 3 ore 55 min la miscela di reazione è versata su n-esano (50 ml). Il risultante precipitato è filtrato e tritato per 30 min in HCl 1N (50 ml). Il solido giallo è filtrato, lavato con acqua ed etere di petrolio ed essiccato sotto lampada IR, ottenendo i prodotti puri.

Estere etilico dell'acido 4(1H)-(1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (52a). Resa 43%; p.f. 235-237 °C (DMF/acqua). IR 3200 (NH e OH), 1710 (CO estere), 1620 e 1600 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.35 (t, 3H, CH_3), 4.32 (q, 2H, CH_2), 7.47-7.55 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.67-7.83 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.03 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.24-8.27 (m, 1H, C5-H chinolone), 8.79 (s, 1H, chinolone C2-H), 12.90 (bs, 1H, NH), 15.75 (bs, 1H, OH).

Estere etilico dell'acido 4(1H)-(1,4-diidro-6-cloro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (51b). Resa 57%; p.f. 209-211°C (EtOH). IR 3300 (NH e OH), 1734 (CO estere), 1684 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.31 (t, 3H, CH_3), 4.25 (q, 2H, CH_2), 7.40-7.80 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.00 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.20 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.50 (s, 1H, chinolone C2-H), 12.75 (bs, 2H, NH e OH).

Estere etilico dell'acido 4(1H)-(1,4-diidro-7-cloro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (52c). Resa 77%; p.f. 187-189°C (EtOH). IR 3200, 3064 (NH e OH), 1726 (CO estere), 1700 e 1624 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.30 (t, 3H, CH_3), 4.30 (q, 2H, CH_2), 7.47 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.68 (s, 1H, chinolone C8-H), 7.94 (s 1H, butenoato C3-H), 8.18 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.77 (s, 1H, chinolone C2-H), 13.00 (bs, 1H, NH e OH).

Estere etilico dell'acido 4-[6-(3-carbossietil-3-oxopropionil)-1,4-diidro-4(1H)-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (52d). Resa 100%; p.f. >300°C (DMF/acqua). IR 3400, 3261(NH e OH), 1728 (CO estere), 1621 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.30 (t, 6H, CH_3), 4.28 (q, 4H, CH_2), 7.16 (s, 1H, butenoato C3-H), 7.78 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.97 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.36 (m, 1H, chinolone C7-H), 8.81 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.83 (s, 1H, chinolone C2-H), 13.13 (bs, 1H, NH), 15.50 (bs, 2H, OH).

**Acidi 4(1H)-(1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoici
(51a-d). Procedura generale.**

Ad una soluzione dell'estere **52** (6.6 mmoli) in una miscela THF/metanolo 1:1 (6 ml) è aggiunta NaOH 1N (4.3 ml). La miscela di reazione è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore. Si versa su ghiaccio e si estrae con acetato di etile (5 x 10 ml). La fase acquosa è acidificata fino a pH 3 con HCl 1N. Il risultante solido giallo è filtrato, lavato con acqua, etanolo assoluto ed etere di petrolio per dare i composti **51** puri.

Acido 4(1H)-(1,4-diidro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (51a). Resa 47%; p.f. > 290°C (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3400, 3214 (NH e OH), 1715 (CO acido), 1622 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.52 (m, 1H, chinolone C6-H), 7.62 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 7.99 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.26 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.79 (s, 1H, chinolone C2-H), 13.00 (bs, 3H, NH e OH).

Acido 4(1H)-(1,4-diidro-6-cloro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (51b). Resa 50%; p.f. 220°C(dec) (toluene/cicloesano). IR 3400, 3200 (NH e OH), 1718 (CO acido), 1640 e 1611 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 7.72-7.75 (m, 2H, chinolone C7-H e C8-H), 8.13 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.53 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.80 (s, 1H, chinolone C2-H), 13.00 (bs, 3H, NH e OH).

Acido 4(1H)-(1,4-diidro-7-cloro-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoico (51c). Resa 52%; p.f. 200°C (dec) (lavaggi con EtOH assoluto). IR 3400, 3200 (NH e OH), 1740 (CO acido), 1640 e 1616

(CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 7.47 (m, 1H, chinolone C6-H) 7.69 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.92 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.21 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.88 (s, 1H, chinolone C2-H), 12.75 (bs, 3H, NH e OH).

Acido 4-[6-(3-carbossietil-3-oxopropionil)-1,4-diidro-4(1H)-oxochinolin-3-il]-2,4-dioxobutanoico (51d). Resa 52%; p.f. $>300^\circ\text{C}$ (lavaggi con acetone bollente). IR 3300-3100 (NH e OH), 1718 (CO acido), 1640 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 6.80 (s, 1H, butenoato C3-H), 7.75 (m, 1H, chinolone C8-H), 7.98 (s, 1H, butenoato C3-H), 8.29 (m, 1H, chinolone C7-H), 8.75 (m, 1H, chinolone C5-H), 8.79 (s, 1H, chinolone C2-H), 13.08 (bs, 5H, NH e OH).

4-fenil 3-acetil-1H-pirrolo (54).

Ad una sospensione di sodio idruro (4.95g, 123mmol) in dietil etere (200 ml) si aggiunge goccia a goccia sotto corrente di Ar una soluzione TosMIC (20.0 g, 103 mmoli) e di benzalacetone (15.0 g, 103 mmoli) sciolti in DMSO anidro (170 ml) e in dietil etere anidro (340 ml). Si mantiene sotto agitazione a 25°C per 15 minuti, poi si diluisce cautamente con acqua. Si estrae con acetato di etile, si lava con una soluzione satura di cloruro di sodio (6x100 ml), si essicca su solfato di sodio anidro e si elimina il solvente a pressione ridotta ottenendo 21.42 g di **54** puro come solido giallo. Resa 100%; p.f. 110-112°C (cicloesano).

4-fenil-3-acetil-1-(4-fluorofenil)metil-1*H*-pirrolo (55).

Ad una sospensione del pirrolo di partenza (3 g, 16 mmoli) in DMF (20 ml) si aggiungono il cloruro benzilico (2.81 g, 19.4 mmoli) e il carbonato di potassio anidro (4.48 g, 32.4 mmoli). Si mantiene sotto agitazione per 16 ore a 90°C. Si versa la soluzione su acqua e si estrae con acetato di etile. La fase organica è lavata con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità. Si essicca sul solfato di sodio anidro e si elimina il solvente a pressione ridotta, ottenendo un grezzo di reazione che viene cromatografato su colonna in allumina eluendo con CHCl₃, ottenendo il derivato **55** puro. Resa 100%; olio.

Estere etilico dell'acido 4-[4-fenil-1-(4-fluorofenil)metil-1H-pirrol-3-il]-2,4-dioxobutanoico (56).

Ad una soluzione del pirrolo di partenza (1g, 3.4 mmoli) ed ossalato dietilico (0.99 g, 6.8 mmoli) in THF anidro (3.4 ml) si aggiunge NaOEt solido preparato sciogliendo il sodio (160 mg, 6.95 mmoli) in 3 ml di etanolo assoluto. Si mantiene sotto agitazione a temperatura ambiente in atmosfera inerte per 1 ora e 20 minuti. Si versa su n-esano (60 ml), si filtra il precipitato giallo che successivamente è lasciato sotto vigorosa agitazione in HCl 1N (60 ml). Si filtra il solido e si essicca sotto lampada IR, ottenendo il derivato **56** puro. Resa 88%; p.f. 111-112°C (benzene/cicloesano). IR 1740 (CO estere), 1600 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.29 (t, 3H, CH_3), 4.25 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.06 (s, 2H, CH_3), 6.49 (s, 1H, butenoato C3-H), 6.66 (m, 1H, pirrolo C5-H), 7.02-7.11 (m, 2H, benzene H), 7.17-7.27 (m, 2H, benzene H), 7.33-7.42 (m, 5H, benzene H), 7.46 (m, 1H, pirrolo C2-H), 15.18 (bs, 1H, OH).

**Acido 4-[4-fenil-1-(4-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-3-il]-2,4-dioxo
butanoico (38).**

L'estere di partenza **56** (0.5 g, 1.3 mmoli) è sciolto in una miscela 1:1 di THF/MeOH (6 ml) e trattato con NaOH 1N (6.5 ml). Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 4 ore e 35 minuti. Si versa su ghiaccio e si estrae con acetato di etile (1 x 20 ml). La fase acquosa è acidificata fino a pH=3 con HCl 1N ed estratta con acetato di etile (3 x 50 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione satura di NaCl (3 x 50 ml) ed essiccate su Na₂SO₄ anidro. Si elimina il solvente a pressione ridotta ottenendo il derivato **38** puro. Resa 17%; p.f. 109-111°C (benzene). IR 3125 (OH), 1739 (CO acido), 1621 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 5.06 (s, 2H, CH₃), 6.59 (s, 1H, butenoato C3-H), 6.67 (m, 1H, pirrolo C5-H), 7.06-7.10 (m, 2H, benzene H), 7.18-7.26 (m, 2H, benzene H), 7.30-7.39 (m, 5H, benzene H), 7.50 (m, 1H, pirrolo C2-H), 14.00 (bs, 2H, OH).

Estere etilico dell'acido 2-ammino-4-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1*H*-pirrol-3-il]-4-oxo-2-butenico (57).

Il pirrolo di partenza **56** (1 g, 2.5 mmoli) è sciolto in benzene (30 ml) e trattato con acetato d'ammonio (0.22 g, 2.9 mmoli) e acido acetico glaciale (0.2 ml, 3.9 mmoli). La miscela è posta a riflusso in un pallone equipaggiato con separatore di azeotropi per 16 ore e 35 minuti. Dopo raffreddamento la miscela viene lavata con una soluzione satura di NaHCO₃ (1 x 50 ml) ed essiccata su Na₂SO₄ anidro. Si elimina il solvente a pressione ridotta ottenendo un grezzo come olio bruno, che viene cromatografato su colonna di allumina eluendo con cloroformio, ottenendo il derivato **57** puro. Resa 51%; p.f. 135-137°C (toluene). IR 3400 (NH), 1730 (CO estere), 1620 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 1.27 (t, 3H, CH₃), 4.26 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.08 (s, 2H, CH₂), 6.13 (s, 1H, butenoato C3-H), 6.66 (m, 1H, pirrolo C5-H), 7.04-7.48 (m, 10H, benzene H e pirrolo C2-H), 9.00 (bs, 2H, NH₂).

Acido 2-ammino-4-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1H-pirrol-3-il]-4-oxo-2-butenoico (40).

Il pirrolo di partenza **57** (0.34 g, 2.50.9 mmoli) è sciolto in THF anidro (4.35 ml) sotto atmosfera inerte e raffreddato a 0°C. Si aggiunge goccia a goccia una soluzione di KOH 0.5 N (0.06 g, 1.0 mmoli, 2 ml) e la miscela è lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore e 50 minuti. Si concentra a pressione ridotta; il residuo è ripartito tra acqua e acetato di etile. La fase acquosa è raffreddata su ghiaccio e acidificata con HCl 1N. Si pone sotto agitazione a 4°C per 2 ore. Si forma un precipitato che viene estratto con acetato di etile (3 x 50 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione satura di NaCl (3 x 50 ml) ed essiccate su Na₂SO₄ anidro. Si elimina il solvente a pressione ridotta ottenendo il derivato **40** puro (miscela di isomeri E/Z). Resa 76%; p.f. 86-100°C (benzene). IR 3400 (NH), 1710 (CO acido), 1620 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃) δ 5.08 (s, 2H, CH₂), 6.66 (m, 2H, butenoato C3-H e pirrolo C5-H), 7.02-7.44 (m, 10H, benzene H e pirrolo C2-H), 9.00 (bs, 2H, NH₂).

Etere etilico dell'acido 5-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1H-pirrol-3-il]-1H-pirazol-3-carbossilico (58).

Il pirrolo di partenza **56** (0.5 g, 1.3 mmoli) è sciolto in MeOH (96 ml) e trattato con idrazina dicloridrato (0.68 g, 6.5 mmoli) trietilammina (0.66 g, 6.5 mmoli, 0.9 ml) e acido acetico glaciale (5 gocce). Si lascia sotto agitazione lenta a temperatura ambiente per 16 ore. Si elimina il solvente a pressione ridotta, si riprende con acetato di etile e si lava con una soluzione satura di NaCl (3 x 100 ml). Si essicca su Na₂SO₄ anidro. Si elimina il solvente a pressione ridotta ottenendo il derivato **58** puro. Resa 100%; p.f. 180-183°C (toluene). IR 3117 (NH), 1716 (CO estere) cm⁻¹. ¹H-NMR (acetone-d₆) δ 1.27 (t, 3H, CH₃), 4.26 (q, 2H, CH₂CH₃), 5.20 (s, 2H, CH₂), 6.47 (s, 1H, pirazolo C4-H), 7.02 (d, 1H, J_{2,5}=2.3 Hz, pirrolo C5-H), 7.20 (d, 1H, J_{2,5}=2.3 Hz, pirrolo C2-H), 7.25-7.30 (m, 3H, benzene H), 7.40-7.44 (m, 2H, benzene H).

Acido 5-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1H-pirrol-3-il]-1H-pirazol-3-carbossilico (41).

L'estere di partenza **58** (0.68 g, 1.7 mmoli) è sciolto in una miscela 1:1 di THF/MeOH (8 ml) e trattato con NaOH 1N (8.5 ml). Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore e 30 minuti. Si effettua un'aggiunta di NaOH 1N (2.5 ml) e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Si versa su ghiaccio e si estrae con acetato di etile (1 x 50 ml). La fase acquosa è acidificata fino a pH=3 con HCl 1N ed estratta con acetato di etile (3 x 100 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione satura di NaCl (3 x 100 ml) ed essiccate su Na₂SO₄ anidro. Si elimina il solvente a pressione ridotta ottenendo il derivato **41** puro. Resa 65%; p.f. 193-195°C (EtOH). IR 3224 (NH e OH), 1713 (CO acido), cm⁻¹. ¹H-NMR (acetone-d₆) δ 5.21 (s, 2H, CH₂), 6.48 (s, 1H, pirazolo C4-H), 6.67 (d, 1H, J_{2,5}=1.7 Hz, pirrolo C5-H), 7.10-7.18 (m, 2H, benzene H), 7.22 (d, 1H, J_{2,5}=1.7 Hz, pirrolo C2-H), 7.29 (m, 5H, benzene H), 7.38-7.47 (m, 2H, benzene H).

6-Fenil-3,5-esadien-2-one (59).

Ad una soluzione di trans-cinnamaldeide (10 g, 75.6 mmoli) in acetone (250 ml), vengono aggiunti 108 ml di NaOH 5N raffreddando in bagno a ghiaccio.

Dopo aver chiuso accuratamente il pallone di reazione con setto di gomma, la miscela è portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per 16 ore. Dopo tale periodo la soluzione è versata su acqua, ed estratta con acetato di etile (3 x 250 ml).

Le fasi organiche riunite sono lavate con soluzione satura di NaCl (3 x 250 ml) ed essiccate. L'evaporazione del solvente fornisce il chetone grezzo che viene purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice, eluendo con cloroformio ottenendo il composto **59** puro. Resa 67%; olio.

4-(4-Fenil-1*H*-pirrol-3-il)-3-buten-2-one (60).

Ad una sospensione di sodio idruro (1.02 g, 25.5 mmoli) in dietil etere anidro (64 ml) si aggiunge goccia a goccia sotto corrente di Ar una soluzione TosMIC (2.49 g, 12.8 mmoli) e di diene (2.0 g, 11.5 mmoli) sciolti in DMSO anidro (22 ml) e in dietil etere anidro (44 ml). Si mantiene sotto agitazione a 25°C per 20 minuti, poi si diluisce cautamente con acqua. Si estrae con acetato di etile, si lava con una soluzione satura di cloruro di sodio (6 x 100 ml), si essicca su solfato di sodio anidro e si elimina il solvente a pressione ridotta ottenendo un grezzo che viene cromatografato su colonna in gel di silice eluendo con cloroformio, ottenendo il derivato **60** puro come solido giallo. Resa 57%; p.f. 112-114°C (toluene).

**4-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1*H*-pirrol-3-il]-3-buten-2-one
(61).**

Ad una sospensione del pirrolo di partenza (0.94 g, 4.4 mmoli) in DMF (5.5 ml) si aggiungono il bromuro benzilico (1 g, 5.3 mmoli) e il carbonato di potassio anidro (1.22 g, 8.8 mmoli). Si mantiene sotto agitazione per 20 ore e 15 minuti a 90°C. Si versa la soluzione su acqua e si estrae con acetato di etile. La fase organica è lavata con una soluzione satura di cloruro di sodio fino a neutralità. Si essicca sul solfato di sodio anidro e si elimina il solvente a pressione ridotta, ottenendo un grezzo di reazione che viene cromatografato su colonna in gel di silice eluendo con CHCl₃, ottenendo il derivato **61** puro. Resa 63%; olio.

Etere etilico dell'acido 6-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1H-pirrol-3-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (62).

Ad una soluzione del pirrolo di partenza (0.46 g, 14.4 mmoli) ed ossalato dietilico (0.42 g 28.8 mmoli) in THF anidro (1.4 ml) si aggiunge NaOEt solido preparato sciogliendo il sodio (70 mg, 2.9 mmoli) in 10 ml di etanolo assoluto. Si mantiene sotto agitazione a temperatura ambiente in atmosfera inerte per 1 ora e 50 minuti. Si versa su *n*-esano (26 ml), si filtra il precipitato giallo che successivamente è lasciato sotto vigorosa agitazione in HCl 1N (26 ml). Si filtra il solido e si essicca sotto lampada IR, ottenendo il derivato **62** puro. Resa 56%; p.f. 121-123°C (cicloesano). IR 1730 (CO estere), 1620 (CO chetone) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 1.43 (t, 3H, CH_3), 4.40 (q, 2H, CH_2CH_3), 5.09 (s, 2H, CH_2), 6.73 (s, 1H, esenoato C3-H), 6.88 (d, 1H, $J_t = 16.6$ Hz, esenoato C5-H), 7.01-7.54 (m, 11H, benzene H e pirrolo H), 7.75 (d, 1H, $J_t = 16.6$ Hz, esenoato C6-H), 14.75 (bs, 1H, OH).

Acido 6-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1*H*-pirrol-3-il]-2,4-dioxo-5-esenoico (39).

L'estere di partenza **62** (0.23 g, 0.55 mmoli) è sciolto in una miscela 1:1 di THF/MeOH (2.5 ml) e trattato con NaOH 1N (2.85 ml). Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore e 10 minuti. Si versa su ghiaccio e si estrae con acetato di etile (1 x 20 ml). La fase acquosa è acidificata fino a pH=3 con HCl 1N ed estratta con acetato di etile (3 x 50 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con una soluzione satura di NaCl (3 x 50 ml) ed essiccate su Na₂SO₄ anidro. Si elimina il solvente a pressione ridotta ottenendo il derivato **39** puro. Resa 75%; p.f. 128-130°C (benzene/cicloesano). IR 3100 (OH), 1710 (CO acido), 1620 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 5.25 (s, 2H, CH₂), 6.74 (s, 1H, esenoato C3-H), 7.00 (d, 1H, J_t= 16.0 Hz, esenoato C5-H), 7.30-7.80 (m, 12H, benzene H, pirrolo H e esenoato C6-H), 14.75 (bs, 2H, OH).

5-Cloro-1-(fenilsulfonil)-1*H*-indolo-3-carbossialdeide (63).

Ad una miscela di *n*-Bu₄NHSO₄ (0.08 g, 0.25 mmoli) e di NaOH solida (1.37 g, 3.4 mmoli) in CH₂Cl₂ (17 ml) sotto vigorosa agitazione, si aggiunge l'indolo 3-carbossialdeide (2 g, 11.1 mmoli) in bagno a ghiaccio. Quindi si aggiunge una soluzione di benzen-sulfonil cloruro (2.41 g, 14 mmoli, 1.75 ml) in CH₂Cl₂ (8.5 ml). Si lascia sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 0 e 5°C per 25 minuti, quindi si diluisce con CH₂Cl₂ (8.5 ml) e si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 ora e 30 minuti. Si filtra il solido ottenuto e si lava con CH₂Cl₂, ottenendo il prodotto **63** puro. Resa 94%; p.f. 244-246°C (MeOH).

5-Cloro-3-(3-oxo-1-butenil)-1-(fenilsulfonyl)-1H-indolo (64).

Ad una soluzione dell'aldeide **63** (2 g, 11 mmoli) in acetone (22 ml), vengono aggiunti 16 ml di NaOH 5N raffreddando in bagno a ghiaccio.

Dopo aver chiuso accuratamente il pallone di reazione con setto di gomma, la miscela è portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione per 24 ore. Dopo tale periodo la soluzione è versata su acqua, ed estratta con acetato di etile (3 x 100 ml).

Le fasi organiche riunite sono lavate con soluzione satura di NaCl (3 x 100 ml) ed essiccate. L'evaporazione del solvente fornisce il chetone **64** puro. Resa 62%; p.f. 188-189°C (benzene).

Estere etilico dell'acido 6-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2,4-dioxo-5-esenoico (65).

Ad una soluzione dell'indolo di partenza (1.5 g, 4.7 mmoli) ed ossalato dietilico (1.37 g, 9.4 mmoli) in THF anidro (4 ml) si aggiunge NaOEt solido preparato sciogliendo il sodio (220 mg, 9 mmoli) in 14 ml di etanolo assoluto. Si mantiene sotto agitazione a temperatura ambiente in atmosfera inerte per 2 ore e 15 minuti. Si versa su *n*-esano (85 ml), si filtra il precipitato giallo che successivamente è lasciato sotto vigorosa agitazione in HCl 1N (85 ml). Si filtra il solido e si essicca sotto lampada IR, ottenendo il derivato **65** puro. Resa 62%; p.f. 181-183°C (toluene/EtOH). IR 3200 (NH), 1730 (CO estere), 1600 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 1.33 (t, 3H, CH₃), 4.30 (q, 2H, CH₂CH₃), 6.68 (s, 1H, esenoato C3-H), 7.04 (d, 1H, J_t= 16.2 Hz, esenoato C5-H), 7.27 (dd, 1H, J_o= 8.5 Hz, J_m= 1.9 Hz, indolo C6-H), 7.53 (d, 1H, J_o= 8.5 Hz, indolo C7-H), 8.02 (d, 1H, J_t= 16.2 Hz, esenoato C6-H), 8.13 (s, 1H, indolo C2-H), 8.21 (d, 1H, J_m= 1.9 Hz, indolo C4-H), 12.05 (bs, 2H, NH e OH).

Acido 6-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2,4-dioxo-5-esenoico (42).

L'estere di partenza **65** (0.45 g, 1.4 mmoli) è sciolto in una miscela 1:1 di THF/MeOH (4.5 ml) e trattato con NaOH 1N (4.85 ml). Si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 ore. Si versa su ghiaccio e si estrae con acetato di etile (1 x 20 ml). La fase acquosa è acidificata fino a pH=3 con HCl 1N; il precipitato ottenuto è filtrato, lavato con acqua ed etere di petrolio ed essiccato sotto lampada IR ottenendo il derivato **42** puro. Resa 45%; p.f. 193-194°C (DMF/acqua). IR 3100 (NH e OH), 1710 (CO acido), 1620 (CO chetone) cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 6.73 (s, 1H, esenoato C3-H), 7.00 (d, 1H, J_t= 15.7 Hz, esenoato C5-H), 7.26 (dd, 1H, J_o= 8.6 Hz, J_m= 1.9 Hz, indolo C6-H), 7.52 (d, 1H, J_o= 8.6 Hz, indolo C7-H), 8.04 (d, 1H, J_t= 15.7 Hz, esenoato C6-H), 8.15 (d, 1H, J_m= 1.9 Hz, indolo C4-H), 8.22 (s, 1H, indolo C2-H), 12.05 (bs, 3H, NH e OH).

SAGGI MICROBIOLOGICI

Saggi di inibizione dell'integrasi

I composti oggetto della presente tesi sono stati testati per la capacità di inibire l'integrasi di HIV-1 *in vitro*. Nel saggio viene usato un oligonucleotide 21-mer di DNA a doppio filamento (oligonucleotide marcato all'estremità *A 5'-terminale legato all'oligonucleotide B), che corrisponde alla sequenza delle ultime 21 basi della porzione U5 delle LTR virali, per entrambi gli step 3'-processing e strand transfer della reazione di integrazione.

L'oligonucleotide A è marcato sull'estremità 5'-terminale mediante una T4-Polinnucleotide Chinasi (Gibco BRL / Life Technologies, Rockville, MD). 10 pmoli dell'oligonucleotide A sono incubate a 37°C per 30 minuti in 50 µl di un tampone 1X chinasi che contiene 10 µCi di α-ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) e 10 unità di chinasi. La soluzione marcata è quindi caricata su una colonna G25 Quick Spin (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) ed il filtrato viene legato con 20 pmoli dell'oligonucleotide B (filamento complementare) per 5 minuti a 95°C e per 30 minuti a 37°C.

Nella reazione di 3'-processing l'integrasi libera un dinucleotide GT dall'estremità 3'-terminale del filamento marcato con la generazione di un prodotto marcato 19-mero. La reazione di strand transfer consiste nell'inserimento del nucleotide processato all'estremità 3'-terminale in un altro DNA target. Questo step di strand transfer porta alla formazione di specie ad alto e a basso peso molecolare che migrano, rispettivamente, lentamente e velocemente, rispetto al substrato originale 21-mero. Le specie ad elevato peso molecolare (STP) sono generalmente usate per valutare lo strand transfer (integrazione).

Per testare l'inibitore si forma dapprima un complesso DNA-enzima mescolando 500 nM di integrasi di HIV-1 e 5 nM della doppia catena di DNA template marcata all'estremità 5'-terminale (*A/B) in un tampone contenente 50 mM di MOPS, a pH 7.2, 7.5 mM di MgCl₂ e 14.3 mM di β-mercaptoetanololo per 15 minuti in ghiaccio. La reazione di integrazione è quindi iniziata per aggiunta del farmaco e continua in un volume totale di 10 µl per 30 minuti a 37°C. La reazione è fermata per aggiunta dello stesso volume di "electrophoresis denaturing dye" che contiene il 99% di formamide (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI), l'1% di SDS, , 0.2 mg/ml di blu di bromofenolo (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) e 0.2 mg/ml di xylene cyanol blue (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI). I campioni sono caricati su gel denaturato al 20% di acrilamide 19/1 Accugel (National Diagnostics, Atlanta, GA) che contiene urea 7M (Gibco BRL / Life Technologies, Rockville, MD) in 1X di TBE (Gibco BRL / Life Technologies, Rockville, MD). I gel sono esposti per una notte ed analizzati usando un Molecular Dynamics Phosphorimager (Sunnyvale, CA).

Esempio di un saggio biologico di screening per gli inibitori dell'integrasi

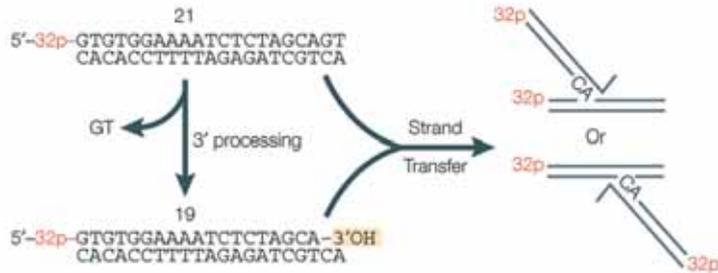


Figura 19. Oligonucleotidi marcati usati per i saggi di screening nei confronti dell'integrasi.

La Figura 19 mostra i piccoli oligonucleotidi derivanti dalle estremità U5 delle LTR generalmente usati per i saggi biologici. La scelta del metallo bivalente, Mg^{2+} o Mn^{2+} , è molto importante, poichè gli inibitori attivi come antivirali generalmente sono attivi sia in presenza Mg^{2+} che di Mn^{2+} , mentre i composti attivi solo in presenza di Mn^{2+} sono in genere citotossici e non possono perciò essere usati come antivirali. L'oligodeossinucleotide 21-mero è marcato all'estremità 5'-terminale con il fosforo 32 (^{32}P), mostrato in rosso. L'integrasi ricombinante può usare questo oligonucleotide marcato sia come donatore che come accettore. Il rilascio di un dinucleotide GT all'estremità 3'-terminale genera un oligonucleotide 19-mero che può essere separato dall'oligonucleotide di partenza 21-mero mediante elettroforesi.

La reazione di strand transfer genera una serie di nucleotidi più lunghi dei nucleotidi a 21 basi (Figura 20).

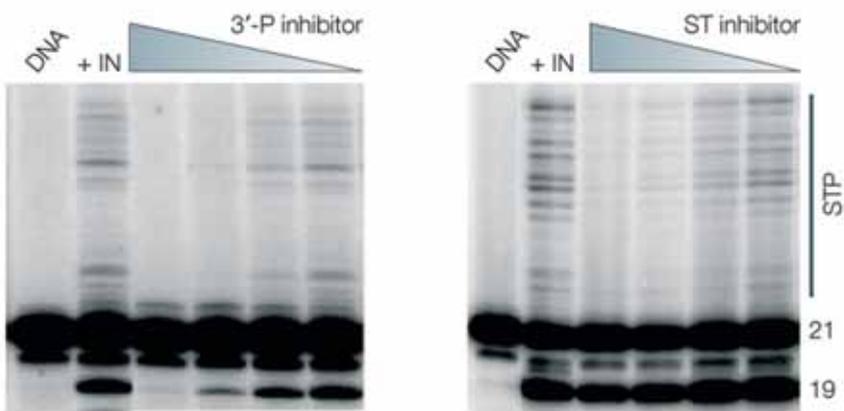


Figura 20. Differenti effetti delle reazioni di 3'-processing e di strand transfer.

In Figura 20 sono mostrati i differenti effetti delle reazioni di 3'-processing e di strand transfer. È da notare l'inibizione del 3'-processing nella parte sinistra della figura e non in quella destra.

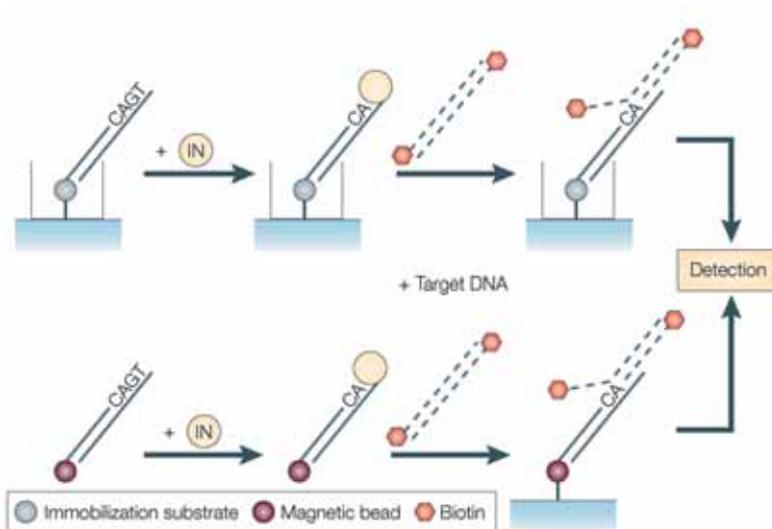


Figura 21. Saggi high-throughput usati per lo screening degli inibitori dell'integrasi.

Il DNA donatore, generalmente derivante dalle sequenze U5 LTR, è immobilizzato su una piastra o legato ad una sfera magnetica (Dynabead), come mostrato in Figura 21. Il 3'-processing è indispensabile per attivare il DNA donatore, che diventa perciò capace di reagire con il DNA target marcato con la biotina. L'integrazione può essere evidenziata dopo il legame del DNA donatore. L'integrazione è misurata come segnale di estinzione. Anche il saggio del complesso di preintegrazione (PIC) può evidenziare il grado di inibizione dell'integrasi, attraverso i PICs isolati dagli estratti cellulari infetti. Tali saggi però sono poco pratici e necessitano di cellule infettate dal virus dell'HIV, perciò in genere vengono utilizzati i saggi di high-throughput.

Attività antivirale nei confronti dell'HIV

I composti oggetto della presente tesi sono stati testati per valutare la loro capacità di inibire la replicazione dell'HIV in cellule. I composti sono stati solubilizzati in DMSO alla concentrazione di 200 mM e diluiti col mezzo di coltura. Le cellule MT-4, C8166, H9/IIIB e CEM sono fatte crescere a 37°C in un'atmosfera al 5% di CO₂ in mezzo RPMI 1640, addizionato al 10% con siero fetale di vitello (FCS), 100 IU/ml di penicillina G e 100 µg/ml di streptomina. Le colture cellulari sono testate periodicamente per verificare l'assenza di contaminazione da micoplasma con Myco Tect Kit (Gibco). I virus dell'immunodeficienza umana di tipo-1 (HIV-1, catene III B), sono ottenuti dal supernatante di cellule H9/IIIB persistentemente infettate. Le soluzioni di HIV-1 usate, hanno un titolo di 4.5×10^6 volte la dose in grado di infettare il 50% di una cultura cellulare (CCID₅₀)/ml. La titolazione dell'HIV-1 è stata effettuata in cellule C8166 attraverso il metodo di diluizione standard (diluizione 1:2), in una piastra a 96 pozzetti. Il titolo del virus è determinato con il microscopio ottico, segnando la citotossicità dopo 4 giorni di incubazione ed esprimendo il titolo virale in CCID₅₀/ml. L'attività dei composti contro la moltiplicazione dell'HIV-1 nelle cellule infettate in fase acuta è basata sull'inibizione della citotossicità virus-indotta, nelle cellule MT-4. Il mezzo di coltura (50 µl), contenente 1×10^4 cellule, è aggiunto in alcune flat-bottom contenenti 50 µl di mezzo di coltura con o senza i composti testati a varie concentrazioni. Vengono quindi aggiunti 20 µl di una sospensione di HIV-1 contenente 100 CCID₅₀. Dopo 4 giorni di incubazione a 37°C, viene determinato il numero di cellule vitali con il metodo del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT).

Saggi di citotossicità

La citotossicità dei composti è stata valutata su linee cellulari di *human histiocytic lymphoma* (U937) ottenute dalla "American type culture collection" (ATCC, Rockville, MD). Le cellule sono poste in una piastra a 96 pozzetti ad una concentrazione di 5×10^3 /ml nel mezzo di coltura RPMI-1640 senza rosso fenolo, addizionato con il 20% di siero fetale di vitello ed antibiotici. Dopo due ore si aggiungono i composti da testare a differenti concentrazioni (comprese tra 1 mg/ml e 200 mg/ml) e le cellule vengono incubate a 37 °C per 24 ore. Quindi le cellule sono incubate a 37°C per 3 ore con 1 mg/ml di MTT (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Dopo incubazione il formazano insolubile in acqua viene sciolto in isopropanolo assoluto contenente HCl 0.1 N. L'assorbanza viene misurata attraverso un lettore ELISA operante alla lunghezza d'onda di 570 nm. La citotossicità dei composti viene calcolata come la percentuale di riduzione della vitalità cellulare, per confronto con la vitalità delle cellule della coltura di controllo in assenza di farmaco. La concentrazione di farmaco richiesta per ridurre la vitalità delle cellule del 50% è detta CC_{50} .

MOLECULAR MODELING

Dinamica Molecolare

La struttura del dominio catalitico (CCD) dell'integrasi di HIV-1 è stata ricavata dalla Protein Data Bank (PDB), struttura 1BIS.⁵⁹ Per i nostri studi è stata presa in considerazione la catena B della struttura a raggi X. Uno ione Mg^{2+} è stato posizionato nel sito attivo tra gli atomi di ossigeno del carbossilato dei residui Asp64 e Asp116, tenendo in considerazione la geometria dello ione Mg^{2+} presente nella subunità A della struttura 1QS4 della PDB.⁶⁰ Per avere un'idea dello spazio conformazionale dell'enzima integrasi, è stata realizzata una simulazione MD a 1 ns, in alcuni solventi. Tutte le molecole di acqua presenti nella struttura a raggi X dell'enzima sono state allontanate e sono stati aggiunti atomi di idrogeno ai residui, considerando i residui Arg, Lys, Glu e Asp nella loro forma carica, e tutte le istidine neutre. Per rendere il sistema neutro, sono stati aggiunti due ioni Cl^- con l'aiuto del programma VEGA (versione 1.5.0). L'enzima è stato quindi solvatato con uno strato di acqua spesso 10 Å. I calcoli sono stati effettuati con il modulo DISCOVER del programma INSIGHT II, usando il campo di forza CVFF. È stata usata una procedura multi-step. L'energia del complesso è minimizzata con 5000 step di minimizzazione a discesa rapida, seguiti da 3000 step di minimizzazione a gradiente coniugato per riordinare le molecole di acqua e i controioni ed eliminare ogni residua costrizione geometrica, mantenendo gli atomi di metallo dell'enzima fisso. Come struttura iniziale per lo stadio di equilibrizzazione (100ps) è stato usato il sistema minimizzato solvatato, tale stadio è seguito da un "production run" di 1 ns. Nello stadio di equilibrizzazione l'energia di mini-

mizzazione delle catene laterali delle proteine sono state calcolate impiegando 5000 step di discesa rapida e 3000 step di gradiente coniugato. Il sistema è stato quindi scaldato gradualmente da 10 a 300 K in step da 5 ns ed è stato equilibrato a 300 K. Durante l'equilibratura ed il production run, la struttura secondaria dell'enzima è mantenuta fissa. Per le interazioni di non-legame è stata considerata un'interruzione di 13 Å. Le coordinate e le energie sono state salvate ogni 10 ps, fornendo 100 diverse strutture. Il docking inoltre ha scattato in automatico un'istantanea ogni 100 ps.

Docking

Il docking di **37r** nel CCD è stato realizzato usando il programma AutoDock (versione 3.0.5). L'algoritmo LGA, come effettuato nel programma AutoDock, applica un protocollo con un numero di valutazioni di energia pari a 1.5×10^{-6} , una velocità di mutazioni di 0.01, una velocità di crossover di 0.80 ed un valore di elitismo pari a 1. Per lo studio di **37r** sono stati realizzati 50 docking indipendenti in differenti istantanee MD dell'enzima. I risultati che differiscono per meno di 1.5 Å per ogni posizione (metodo dei minimi quadrati), sono sempre raggruppati e rappresentati dal risultato con energia libera di legame più favorevole. I complessi ottenuti sono minimizzati energeticamente usando 3000 step dell'algoritmo a discesa rapida, permettendo solamente al ligando e agli atomi della catena laterale della proteina di rilassarsi entro un raggio di 5 Å intorno al ligando. L'ottimizzazione geometrica è stata realizzata impiegando il programma DISCOVER con il campo di forza CVFF.

Ligand setup

La struttura di **37r** è stata generata dai frammenti standard della libreria del software SYBYL versione 7.0. L'ottimizzazione geometrica è stata realizzata con il minimizzatore SYBYL/MAXIMIN2 applicando l'algoritmo BFGS con una convergenza dei criteri di 0.001 kcal/mole ed impiegando il campo di forza TRIPOS. Le cariche atomiche parziali sono state assegnate usando i formalismi di Gasteiger e Marsili, come impostato nel pacchetto SYBYL. Il derivato **37r** è stato modellato nella sua forma cheto-enolica con la carica negativa sul gruppo carbossilato. Sono state specificate sei possibili torsioni: due intorno all'anello chinolinico, due a livello del gruppo benzilico e due che consentono la rotazione dei gruppi ossidrilici.

Protein setup

La struttura della proteina è stata settata per il docking come segue: sono stati rimossi tutti gli atomi di idrogeno non polari e sono state assegnate le cariche atomiche parziali secondo Kollman. Sono stati aggiunti dei parametri di solvatazione al complesso proteina-DNA usando l'utility ADDSOL del programma AutoDock. Le mappe delle griglie sono state calcolate con l'ausilio di AutoGrid. Le griglie scelte sono abbastanza larghe in modo da includere una parte significativa della proteina intorno al sito catalitico. In tutti i casi sono state usate griglie di 61 x 61 x 61 punti con uno spaziatura griglia-punto di 0.375 Å. Il centro della griglia è stato fatto coincidere con lo ione Mg^{2+} nel sito attivo del dominio catalitico.

RISULTATI E DISCUSSIONE

RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITÀ

Tutti i derivati progettati **36-42** ed i corrispondenti esteri etilici sono stati saggiati in test enzimatici per determinarne l'inibizione nel 3'-processing e nello strand transfer, in saggi su cellule infettate da HIV-1, e su cellule non infettate, per determinare la citotossicità, usando come sostanza di riferimento il derivato Merck L-731,988.

I risultati di questi saggi sono riportati nelle Tabelle 3-8.

Inizialmente sono stati sintetizzati i composti a struttura pirrolil dichetoeseoica **36**. Essi risultano ibridi tra due classi di inibitori dell'integrasi riportati in letteratura: gli arildichetoacidi ed i cinnamoil derivati. Essi infatti presentano la funzione cinnamoilica modificata a livello della porzione aromatica dall'introduzione del fenilpirrolo e la catena dioxobutanoica parzialmente sovrapposta alla porzione cinnamoilica. Il risultato di questa parziale sovrapposizione è l'elongazione della catena dioxobutanoica grazie all'inserimento di un ponte etilenico tra il fenilpirrolo e il carbonile del dichetoacido: si crea così una catena 2,4-dioxo-5-eseoica. Per valutare la efficacia di tale classe di inibitori si è pensato di sintetizzare all'inizio il composto non sostituito sull'anello benzenico (**36a**) e di determinarne l'attività enzimatica e cellulare.

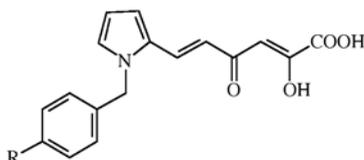
Esso ha mostrato un'ottima azione inibente nei confronti dell'integrasi, sia sul 3'-processing, con una IC_{50} di $7.9 \mu M$, che sullo strand transfer con una IC_{50} pari a $7 \mu M$ ed una attività antivirale, con una EC_{50} di $1.5 \mu M$ paragonabile a quella del composto Merck L-731,988, che presenta una EC_{50} di $1 \mu M$.

Dato l'ottimo risultato ottenuto con questo composto, per studiare le relazioni tra struttura ed attività biologica, è stata sintetizzata una serie di derivati che hanno diversi sostituenti in posizione 4

dell'anello benzenico. E' stata scelta proprio la posizione 4 dell'anello benzenico per analogia al derivato Merck L-731,988, che presenta un fluoro in tale posizione.

L'introduzione di gruppi lipofili come il metile (**36p**), di gruppi ingombranti come il cloro (**36o**) o di gruppi a diverso effetto elettronico come il nitro (**36r**) o il metossile (**36q**) hanno portato al completo annullamento dell'attività, sia in saggi enzimatici che cellulari. L'unico che ha mantenuto una discreta attività su cellule infettate è risultato il derivato 4-F sostituito (**36n**) ($EC_{50} = 11 \mu M$) (Tabella 2).

Tabella 2. Attività su cellule infettate e citotossicità dei derivati **36n-r**.



Composto	R	CC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (μM)	
					3'-P	ST
36n	F	80	11	7.3	>10	>10
36o	Cl	95	>95	-	>10	>10
36p	CH ₃	41	>41	-	>10	>10
36q	CH ₃ O	78	>78	-	>10	>10
36r	NO ₂	33	>33	-	>10	>10

Ciò rende evidente che fattori come la lipofilia, il rilascio e l'attrazione elettronica dei vari gruppi non sono determinanti per l'attività biologica. Si potrebbe quindi ipotizzare che un ruolo fondamentale per l'attività biologica sia giocato dall'ingombro sterico. Infatti i migliori risultati sono stati ottenuti attraverso la sostituzione dell'idrogeno con un fluoro, il più piccolo fra i sostituenti scel-

ti.⁵⁶

Dati i risultati ottenuti con i derivati arilmetil-2,4-dioxi-5-esenoici sostituiti in posizione 4 dell'anello aromatico, sono stati sintetizzati derivati 2-sostituiti, 3-sostituiti, 2,6-disostituiti, e 3,5-disostituiti. Questi composti hanno evidenziato in generale una buona attività inibitoria nei confronti del target biologico in questione.

Gli acidi 2-sostituiti (**36b-f**) e i corrispondenti esteri etilici (**45b-f**) non presentano sostanziali differenze di attività contro cellule infettate da HIV-1.

Visto che ai fini dell'attività mostrata su cellule infettate non sembrava giocare un ruolo rilevante la presenza della porzione carbossilica in luogo di quella esterea e viceversa, a questo punto è risultato logico pensare come la presenza di diversi sostituenti sul benzile sia la sola discriminante al fine di ottenere composti con diversa attività in questa serie omologa.

Per descrivere le SAR di questa serie di composti si è preso in considerazione il composto **36a** come lead compound.

Le relazioni struttura-attività in questa serie di dichetoacidi sono descritte in base all'attività antivirale poichè non sono ancora disponibili i dati relativi all'inibizione enzimatica. Ciò nonostante si può asserire con ragionevole certezza che tali composti inibiscono l'integrasi. Infatti il nostro lead compound **36a** è risultato un inibitore dell'integrasi in test enzimatici.

Ai fini dell'attività sembra giocare un ruolo importante la presenza di un sostituito ad attrazione elettronica in posizione 2, come il fluoro nei composti **36b** e **45b** ($EC_{50}=1 \mu\text{M}$, $EC_{50}=0.5 \mu\text{M}$, rispettivamente) anche se l'effetto di attrazione elettronica non appare evidente come unica prerogativa intesa a giustificare l'attività dei composti in questione. Infatti nei composti **36c** e **45c** ($EC_{50}=4.2 \mu\text{M}$, $EC_{50}=4.6 \mu\text{M}$), la presenza del cloro, con le medesime caratteristiche elettroniche del fluoro, non porta ad un

aumento dell'attività, bensì a composti meno attivi, forse per l'effetto ingombrante del medesimo. Bisogna comunque sottolineare che nel passaggio dal fluoro al cloro si ha un aumento della citotossicità e una conseguente diminuzione della selettività dei derivati **36c** e **45c**.

Anche la presenza del metile in posizione 2 dell'anello benzenico, che presenta al contrario un effetto di rilascio elettronico, ha portato a derivati con attività paragonabile a quella di **36b** e **45b** con il fluoro in posizione 2. Infatti i derivati **36d** e **45d** presentano rispettivamente una EC_{50} pari a $0.7 \mu\text{M}$ e $1.5 \mu\text{M}$: probabilmente la loro attività non dipende dagli effetti elettronici dei sostituenti sull'anello. Il derivato **36d** presenta un S.I.= 50, con una buona selettività nei confronti delle cellule infettate.

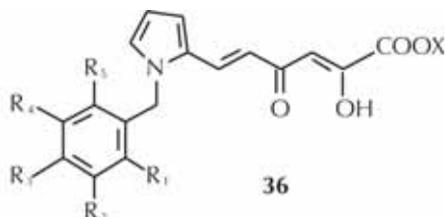
La presenza di sostituenti a rilascio elettronico con un certo grado di lipofilia quali il gruppo OEt e OCH_3 nei composti **36e**, **45e**, **36f**, e **45f** ($EC_{50}=2 \mu\text{M}$, $EC_{50}=8 \mu\text{M}$, $EC_{50}=2.4 \mu\text{M}$, $EC_{50}=2.5 \mu\text{M}$, rispettivamente), non ha portato a composti più attivi di quelli già menzionati.

Successivamente sono stati sintetizzati gli acidi 3-sostituiti **36g-m**. I valori di EC_{50} evidenziano come la sostituzione in posizione 3 dell'anello aromatico fornisca composti con minore attività rispetto agli acidi **36b-f**. Anche in questo caso non esistono grandi differenze di attività tra gli acidi e gli esteri. Infatti per ogni coppia di derivati, i valori di EC_{50} sono molto simili tranne che per il derivato **36j** che mostra una $EC_{50}= 6.5 \mu\text{M}$ rispetto al suo estere corrispondente **45j**, che invece risulta inattivo. In questo gruppo di composti non sembrano giocare un ruolo chiave le differenze steriche ed elettroniche dei sostituenti. Nei derivati 3-sostituiti non sembra fondamentale ai fini dell'attività la presenza del fluoro in luogo del cloro, visto che i valori di EC_{50} si mantengono molto

simili (**36g**: $EC_{50} = 7 \mu\text{M}$, **45g**: $EC_{50} = 9 \mu\text{M}$, **36h**: $EC_{50} = 7 \mu\text{M}$, **45h**: $EC_{50} = 7.9 \mu\text{M}$). Persino la presenza di un gruppo metile (**36i**, **45i**) o di un gruppo metossile (**36j**, **45j**) al posto del fluoro o del cloro non cambia di molto l'attività di tali composti. Tra i derivati 3-sostituiti quello che presenta maggiore attività è il composto **36j** con una $EC_{50} = 6.5 \mu\text{M}$ in cui compare il gruppo metossile a rilascio elettronico. Gli altri derivati 3-sostituiti presentano attività molto simili e valori di S.I. abbastanza bassi.

Tra i composti disostituiti mostrano una ottima attività i derivati 2,6-difluoro sostituiti **36k** e il **45k**. I derivati 3,5-disostituiti **36l,m** e **45l,m** risultano invece inattivi in saggi cellulari, ad eccezione del composto **36l** che mostra una debole attività, con una $EC_{50} = 16 \mu\text{M}$. La presenza di due atomi di fluoro in posizione 2,6 quindi fornisce i composti più attivi (**36k**: $EC_{50} = 0.35 \mu\text{M}$, **45k**: $EC_{50} = 0.44 \mu\text{M}$). Anche in questo caso è importante sottolineare come la presenza di un gruppo ad attrazione elettronica poco ingombrante come il fluoro sia fondamentale per l'attività rispetto a gruppi più ingombranti come il cloro.

Confrontando l'attività dei composti sintetizzati con il derivato L-731,988 sintetizzato dalla Merck Company, risulta evidente come uno dei composti da noi sintetizzati, ed in particolare il derivato 2,6-difluorosostituito (**36k**) sia ben tre volte più attivo del composto di riferimento. Questo testimonia che ai fini dell'attività risulta fondamentale la presenza del fluoro in posizione *orto* dell'anello aromatico. I buoni risultati ottenuti con il derivato 2-fluoro sostituito **36b** sono notevolmente incrementati dall'introduzione di un secondo atomo di fluoro in posizione 6 (Tabelle 3,4).

Tabella 3. Attività su cellule infettate e citotossicità dei derivati **36a-m**.

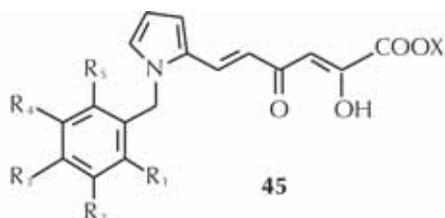
Compd	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	CC ₅₀ ^a (μ M)	EC ₅₀ ^b (μ M)	S.I. ^c
36a	H	H	H	H	H	H	61	1.5	7
36b	F	H	H	H	H	H	49	1.0	49
36c	Cl	H	H	H	H	H	52	4.2	12
36d	Me	H	H	H	H	H	35	0.7	50
36e	OMe	H	H	H	H	H	56	2	28
36f	OEt	H	H	H	H	H	32.5	2.4	13.5
36g	H	F	H	H	H	H	57	7	8
36h	H	Cl	H	H	H	H	54	7	7.7
36i	H	Me	H	H	H	H	46	7.4	6
36j	H	OMe	H	H	H	H	54	6.5	8.3
36k	F	H	H	H	F	H	37	0.35	106
36l	H	Cl	H	Cl	H	H	45.6	16	2.8
36m	H	Me	H	Me	H	H	47	33 (40%) ^d	-
L-731,988							54	1.5	36

^a Citotossicità: dose di composto richiesta per ridurre la vitalità delle cellule del 50% come determinato col metodo MTT.

^b Concentrazione di composto richiesta per ridurre la crescita esponenziale delle cellule MT-4KB del 50%.

^c Indice di Selettività: rapporto CC₅₀/EC₅₀.

^d Concentrazione di composto richiesta per ridurre la crescita esponenziale delle cellule MT-4KB del 40%.

Tabella 4. Attività su cellule infettate e citotossicità dei derivati 45a-m.

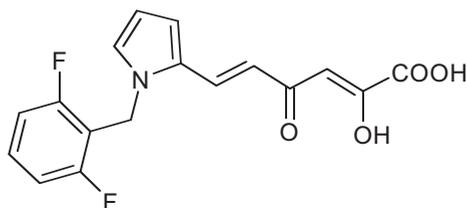
Compd	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	CC ₅₀ ^d (μM)	EC ₅₀ ^b (μM)	S.I. ^c
45a	H	H	H	H	H	Et	17	1.5	7.5
45b	F	H	H	H	H	Et	27	0.5	54
45c	Cl	H	H	H	H	Et	22	4.6	4.8
45d	Me	H	H	H	H	Et	26	1.5	17
45e	OMe	H	H	H	H	Et	17	8	2
45f	OEt	H	H	H	H	Et	20	2.5	8
45g	H	F	H	H	H	Et	19	9	2
45h	H	Cl	H	H	H	Et	31	7.9	3.5
45i	H	Me	H	H	H	Et	13	8	1.6
45j	H	OMe	H	H	H	Et	11	>11	-
45k	F	H	H	H	F	Et	9.4	0.44	21
45l	H	Cl	H	Cl	H	Et	16	>16	-
45m	H	Me	H	Me	H	Et	8	>8	-
L-731,988							54	1.5	36

^a Citotossicità: dose di composto richiesta per ridurre la vitalità delle cellule del 50% come determinato col metodo MTT.

^b Concentrazione di composto richiesta per ridurre la crescita esponenziale delle cellule MT-4/KBI del 50%.

^c Indice di Selettività: rapporto CC₅₀/EC₅₀.

Nell'ambito della serie degli acidi pirrolidichetoeseoici quindi i risultati migliori sono stati ottenuti con il derivato 2,6-difluoro sostituito **36k**, che presenta una EC_{50} pari a $0.35 \mu M$, una CC_{50} pari a $37 \mu M$, ed un indice di selettività S.I.= 106, dimostrandosi tre volte più attivo del derivato Merck **27** preso come riferimento.

**36k**

L'elevato valore di attività riscontrato per il derivato **36k** potrebbe essere dovuto al fatto che la doppia sostituzione in posizione 2,6 sull'anello benzilico genera un composto conformazionalmente bloccato, che probabilmente si lega più efficacemente al sito attivo enzimatico e ne potenzia l'attività.

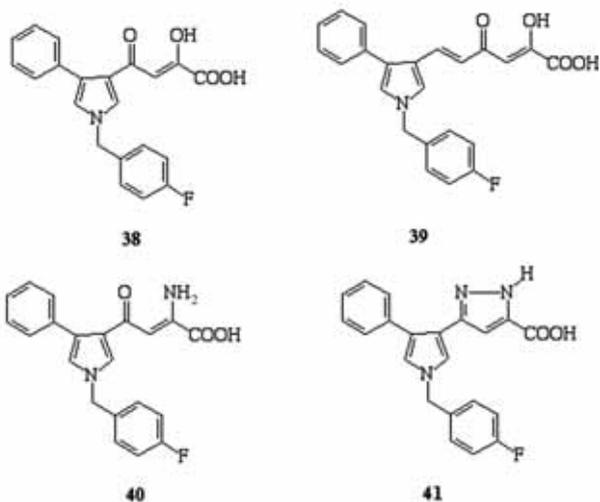
I buoni risultati ottenuti con i derivati **36**, ci hanno condotto ad ulteriori indagini sugli arildichetoacidi come inibitori dell'integrasi. In particolare, dato che i ricercatori della Merck hanno messo in evidenza che l'orientamento ottimale tra la catena dichetoacida ed il gruppo benzilico dei dichetoacidi è di circa 120° , è stato sintetizzato il derivato 4-[4-fenil-1-(4-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-3-il]-2,4-dioxobutanoico (**38**). In effetti questo composto mostra le seguenti caratteristiche chimiche:

- 1) un fenile in posizione 4 del pirrolo;
- 2) un gruppo benzilico in posizione 1 dell'anello pirrolico;
- 3) una catena dichetoacida disposta in posizione 1,3 rispetto alla porzione benzilica. Esso è risultato attivo sia in saggi enzimatici

($IC_{50} = 0.026 \mu\text{M}$) che cellulari ($EC_{50} = 9 \mu\text{M}$, S.I. >22) (Tabella 5). Successivamente sul derivato **38** sono state effettuate le seguenti modifiche:

- 1) allungamento della catena dioxobutanoica, che porta all'acido 4-[4-fenil-1-(4-fluorofenil)metil-1*H*-pirrol-3-il]-2,4-dioxo-5-ese-noico (**39**);
- 2) sostituzione della catena dioxobutanoica con un gruppo cheto-imminico (acido 2-ammino-4-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1*H*-pirrol-3-il]-4-oxo-2-butenico, **40**);
- 3) introduzione di un pirazolo allo scopo di mascherare il dicheto gruppo (acido 5-[1-[(4-fluorofenil)metil]-4-fenil-1*H*-pirrol-3-il]-1*H*-pirazol-3-carbossilico, **41**).

Tali composti hanno mostrato una discreta attività biologica, comunque inferiore a quella dei derivati **36** e **37**, ad eccezione del derivato pirazolico, che è risultato completamente inattivo (Tabella 5). Probabilmente l'introduzione di un sistema rigido, che mima la funzione cheto-enolica, non è adeguata al mantenimento dell'attività nei confronti dell'integrasi.⁵⁷

**Tabella 5.** Attività antivirale e citotossicità dei derivati **38-41**^a.

Compound	CC ₅₀ ^b (μ M)	EC ₅₀ ^c (μ M)	S.I. ^d	IC ₅₀ ^e (μ M)	
				3'-Proc.	S.T.
38	≥ 200	9	≥ 22	5.1	0.026
39	182	8	23	8.8	0.044
40	≥ 100	20	≥ 5	> 100	0.340
41	ND	ND		> 333	> 333
L-731-988	54	1.5	36	10	0.057

^a I dati rappresentano la media di tre determinazioni.

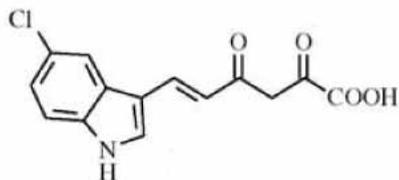
^b Citotossicità: dose di composto richiesta per inibire la crescita delle cellule del 50%.

^c Dose di composto richiesta per inibire la crescita delle cellule MT4 del 50%.

^d Indice di Selettività: rapporto CC₅₀/EC₅₀.

^e Dose di composto richiesta per inibire l'integrasi del 50%.

Come ulteriore sviluppo della ricerca da acidi eteroaril dicheto-
senoici come agenti anti integrasi, abbiamo inoltre realizzato la
sintesi dell'acido 6-(5-cloro-1*H*-indol-3-il)-2,4-dioxo-5-esenoico
42.

**42**

Questo composto è stato progettato come risultato della fusione
della porzione 5-cloroindolica del 5-CITEP con la catena diche-
toesenica degli acidi arildichetoesenici. Anche tale derivato
però è risultato inattivo ($EC_{50} > 100 \mu M$) nei confronti del target
biologico.

Nell'ambito della serie dei derivati pirrolici, comunque, i migliori risultati sono stati ottenuti con gli acidi pirrolidichetoeseoici **36**, ed in particolare con il derivato 2,6-difluorosostituito **36k**. L'elevato valore di attività riscontrato per il derivato **36k** potrebbe essere dovuto al fatto che la doppia sostituzione in posizione 2,6 sull'anello benzilico genera un composto conformazionalmente bloccato, che probabilmente si lega più efficacemente al sito attivo enzimatico e ne potenzia l'attività.

Sulla base di questa ipotesi strutturale, il nostro gruppo di ricerca si è rivolto alla progettazione di nuovi potenziali inibitori dell'integrasi dell'HIV-1.

Abbiamo deciso di conservare inalterate le caratteristiche strutturali necessarie all'attività inibitoria, e cioè la funzione cinnamoilica, l'1,3-dichetogruppo e la funzione carbossilica acida. Inoltre si è pensato di incorporare la porzione cinnamoilica in un sistema rigido, ed in particolare in un anello oxochinolinico, in modo da generare analoghi conformazionalmente bloccati degli acidi aril-dioeseoici **36**, per migliorare l'interazione con il sito catalitico enzimatico e l'attività biologica.

Da un'analisi iniziale dei valori ottenuti, si può notare che, in generale, tutti i derivati acidi chinolonici (**37a-o**) mostrano un profilo di attività e una capacità inibitoria nei confronti dell'integrasi migliore rispetto ai corrispondenti derivati esterei. Questo dato sperimentale conferma ulteriormente l'importanza della porzione dichetoacida come caratteristica strutturale fondamentale ai fini dell'attività biologica.

Si è pensato perciò di valutare l'influenza delle modifiche strutturali del sostituente in posizione N-1 dell'anello oxochinolinico sulla capacità inibitoria.

Inizialmente è stato sintetizzato il composto **37a**, introducendo un gruppo benzilico non sostituito, e ne è stata determinata l'attività

enzimatica e cellulare.

Il composto ha mostrato un'ottima azione inibente nei confronti dell'integrasi in test enzimatici, sia sul 3'-processing ($IC_{50} = 4.0 \mu\text{M}$), che sullo strand transfer ($IC_{50} = 0.034 \mu\text{M}$). Presenta inoltre una notevole attività inibitoria nei confronti delle cellule infettate con una $EC_{50} = 9.6 \mu\text{M}$, ed un indice di selettività > 20.8 .

È necessario sottolineare che passando dalla serie pirrolica a quella chinolonica si è avuto un notevole incremento dell'attività, stimabile intorno ai 2-3 ordini di grandezza (**36a**: $IC_{50\text{ ST}} = 7.9 \mu\text{M}$, **37a**: $IC_{50\text{ ST}} = 0.034 \mu\text{M}$).

Dato l'ottimo risultato ottenuto, sono stati sintetizzati una serie di derivati acidi con diversi sostituenti sull'anello benzilico in N-1 (**37b-k**), al fine di valutare l'influenza che queste sostituzioni hanno sull'attività biologica.

L'introduzione di un atomo di piccole dimensioni e ad attrazione elettronica come il fluoro in posizione 4 ha portato ad ottimi risultati: il 4-fluoro derivato **37d**, risulta infatti molto attivo nell'inibire lo strand transfer ($IC_{50} = 0.0313 \mu\text{M}$), con attività paragonabile al derivato non sostituito **36a**.

La sostituzione in posizione 4 con un gruppo ingombrante come il cloro, ha portato invece ad un composto (**37e**) moderatamente attivo, con valori di IC_{50} pari a $22 \mu\text{M}$ (3'-P) e $0.54 \mu\text{M}$ (ST).

L'introduzione in posizione para di un gruppo ad elevato ingombro sterico e a rilascio elettronico come il metossile (**36i**) o di un gruppo elettron-attrattore come il nitro (**37j**), non provoca un sostanziale incremento di attività. Si ottengono comunque composti moderatamente attivi nei saggi enzimatici, con una IC_{50} pari rispettivamente a 28 e $27 \mu\text{M}$ per il 3'-processing e 0.51 e $0.64 \mu\text{M}$ per lo strand transfer, paragonabili a quella del derivato 4-cloro sostituito **37e**. Ciò rende evidente che fattori come la lipofilia, il

rilascio o l'attrazione elettronica dei vari sostituenti esaminati in questa posizione non influenzano significativamente l'attività biologica. Si può solo notare che le attività dei composti che presentano un qualunque sostituente nella posizione 4 sono inferiori a quella del composto non sostituito **37a**.

Si potrebbe quindi ipotizzare che un fattore determinante per l'attività biologica sia l'ingombro sterico: i migliori risultati sono stati infatti ottenuti attraverso la sostituzione con il fluoro, che risulta essere l'atomo più piccolo fra tutti quelli scelti per la sostituzione in posizione 4 dell'anello benzenico.

Lo spostamento del fluoro dalla posizione 4 alla posizione 2 dell'anello benzenico ha portato ad un incremento dell'attività: il composto così ottenuto **37b** presenta infatti valori di IC_{50} pari a $1.2 \mu M$ per il 3'-processing e $0.016 \mu M$ per lo strand transfer, un valore di EC_{50} nei saggi cellulari uguale a $9.04 \mu M$, con indice di selettività pari a 17.8. Infine lo spostamento del fluoro dalla posizione 2 alla posizione 3, porta ad un composto ugualmente molto attivo **37c**, con un profilo di attività enzimatica paragonabile a quella del composto **37b** ($IC_{50} = 4.6 \mu M$ per il 3'-P e $0.015 \mu M$ per lo ST), ed una EC_{50} pari $37.8 \mu M$. I composti **37b** e **37c** risultano infatti i più attivi della serie tra gli acidi chinolinil-2,4-dioxobutanoici da noi sintetizzati, con valori di attività nei confronti dello strand transfer circa doppi rispetto al derivato non sostituito **37a**.

Inoltre, come si può facilmente notare dai valori di EC_{50} nei saggi cellulari e dai rispettivi indici di selettività, i composti **37a** e **37b** presentano una notevole attività inibitoria nei confronti della replicazione virale in cellule infettate da HIV-1, a concentrazioni di inibitore notevolmente inferiori a quelle citotossiche.

Buoni risultati sono stati ottenuti anche attraverso la doppia sosti-

tuzione con il fluoro in posizione 2,6: il composto **37k** risulta infatti molto attivo nei saggi enzimatici con un valore di IC_{50} di $0.7 \mu\text{M}$ per il 3'-processing e di $0.019 \mu\text{M}$ per lo strand transfer. Mentre le modifiche a livello dell'anello benzilico hanno portato ad un miglioramento dei valori di IC_{50} , diversa è la situazione per quanto riguarda l'effetto della sostituzione del nucleo benzilico sull'azoto della oxochinolina con altri gruppi.

Introducendo infatti in questa posizione un gruppo fenilbutilico, e quindi allungando la catena alchilica tra il nucleo oxochinolinico e quello aromatico, si ottiene il composto **37l** dotato di buona attività enzimatica ma inattivo nei test su cellule infettate ($IC_{50} > 333 \mu\text{M}$ per il 3'P e $< 0.45 \mu\text{M}$ per lo ST, $CC_{50} = 180 \mu\text{M}$ e $EC_{50} > 180 \mu\text{M}$).

Analoghi risultati sono stati ottenuti inserendo un anello aromatico più ingombrante del fenile come il gruppo naftilico (**37m**), od anelli eterociclici come la piridina (**37n**) e la chinolina (**37o**). Infatti, nei saggi enzimatici, tali derivati risultano tutti meno attivi dei corrispondenti derivati benzilici.

Si può quindi ipotizzare che la presenza di un eterociclo nel sostituente in posizione 1 non influisca positivamente sull'attività di questi composti.

Inoltre l'elevato ingombro sterico di alcuni gruppi (**37l**, **37m** e **37o**) probabilmente non permette l'instaurarsi di interazioni favorevoli con il sito attivo dell'integrasi.

Infine, dall'analisi dei valori di EC_{50} e CC_{50} , si può facilmente osservare che, per i composti **37l-o**, l'attività inibitoria nei confronti della replicazione virale in cellule infettate, si manifesta solo a concentrazioni che vicine a quelle citotossiche.

E' molto importante sottolineare che i derivati da noi sintetizzati, analogamente agli altri dichetoacidi riportati in letteratura, sono

attivi selettivamente nei confronti dello strand transfer. Infatti i derivati più attivi **37a-d** da noi sintetizzati mostrano un rapporto $IC_{50} 3'-P/IC_{50} ST$ molto elevato (> 70 per i derivati **37b** e **d**, >100 per **37a** e >300 per **37c**).

Questo fattore ci fa presupporre che interagiscano specificatamente con il sito di catalisi dello strand transfer, inibendo solamente tale step del processo di integrazione.

Riguardo le sostituzioni sulle posizioni 6, 7 e 8 dell'anello oxochinolinico, si può osservare che, in generale, si ottengono derivati ad attività paragonabile rispetto ai composti non sostituiti e che gli esteri risultano meno attivi degli acidi carbossilici corrispondenti (nei test enzimatici).

L'introduzione di un atomo di fluoro in posizione 6 ha portato al derivato **37p** che ha mostrato una buona attività nei confronti dello strand transfer ($IC_{50} = 0.047 \mu M$), pur risultando meno attivo dell'analogo non sostituito **37d** ($IC_{50} = 0.0313 \mu M$).

L'inserimento del cloro in posizione 6 conduce invece ad un composto (**37q**) poco attivo nei confronti dello ST ($IC_{50} = 0.124 \mu M$). Evidentemente l'introduzione di un atomo di grosse dimensioni come il cloro in posizione 6 non porta ad interazioni favorevoli con l'enzima.

La sostituzione in posizione 7 con il fluoro (**37s**) o con il cloro (**37u**) ha portato a derivati abbastanza attivi nei confronti dell'integrasi con valori di IC_{50} paragonabili o addirittura superiori, come nel caso del derivato 7-cloro sostituito ($IC_{50} = 0.0210 \mu M$), rispetto al composto non sostituito **37d**.

La doppia sostituzione con un atomo di cloro in posizione 6,7 ha portato ad un peggioramento dell'attività: il derivato **37z** ($IC_{50} = 0.032 \mu M$) risulta infatti più attivo del composto 6-cloro sostituito **37p** ($IC_{50} = 0.124 \mu M$), ma risulta meno attivo dell'isomero in

posizione 7 (**37s**), che presenta una IC_{50} sullo ST pari a 0.0210 μM .

Ottimi risultati sono stati invece ottenuti con l'introduzione di atomi di fluoro o di cloro in posizione 8 dell'anello oxochinolinico. Il derivato **37w**, 8-fluoro sostituito risulta infatti il piú attivo della serie fluorurata con una IC_{50} pari a 0.025 μM , risultando piú attivo anche del composto non sostituito **37d**.

I migliori risultati sono stati comunque ottenuti con il derivato 8-cloro sostituito **37x**. Esso presenta una IC_{50} per lo ST pari a 0.014 μM , doppia rispetto a quella del derivato non sostituito **37d** e paragonabile a quella dei derivati **37b** e **37c**.

L'introduzione di un anello pirrolidinico in posizione 7 ha portato ad una diminuzione dell'attività inibitoria nei confronti dell'integrasi: si hanno infatti valori di IC_{50} pari a 0.079 μM , circa 6 volte superiori rispetto a quelli del derivato 8-cloro sostituito. È comunque importante sottolineare che tale derivato risulta attivo nei saggi cellulari, e questo offre l'opportunità di indagare a fondo sulla possibilità di effettuare altre sostituzioni con ammine, in modo da valutare l'effettivo impiego terapeutico di tali composti. Ottimi risultati sono stati ottenuti con il derivato **37r**. Tale composto mostra due catene dioxobutanoiche in posizione 3,6 dell'anello oxochinolinico, quindi può essere considerato un dichetoacido bifunzionale. Esso è risultato il piú attivo della serie degli acidi 4-(1,4-diidro-1-aryl-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoici **37**, mostrando un'ottima attività nei confronti dell'integrasi con valori di $IC_{50} = 0.012 \mu\text{M}$ e risultando dalle 17 alle 540 volte piú attivo di alcuni dichetoacidi bifunzionali riportati in letteratura. Esso inoltre è attivo anche nei confronti delle cellule infettate da HIV-1 ($EC_{50} = 4.29 \mu\text{M}$), risulta scarsamente citotossico ($CC_{50} > 200 \mu\text{M}$) e mostra un indice di selettività >47 : può essere quindi considera-

to un ottimo derivato sul quale investire per una potenziale applicazione terapeutica. (Tabella 6).

L'elevata attività di tale composto potrebbe essere legata al fatto che esso presenta l'anello aromatico centrale 1,3 disostituito in modo da formare un angolo di 120° tra il sostituito benzilico e il gruppo dichetoacido in 3. Tali requisiti strutturali sembrano aumentare molto l'attività inibitoria dei derivati arildioxobutanoinici nei confronti dell'integrasi.

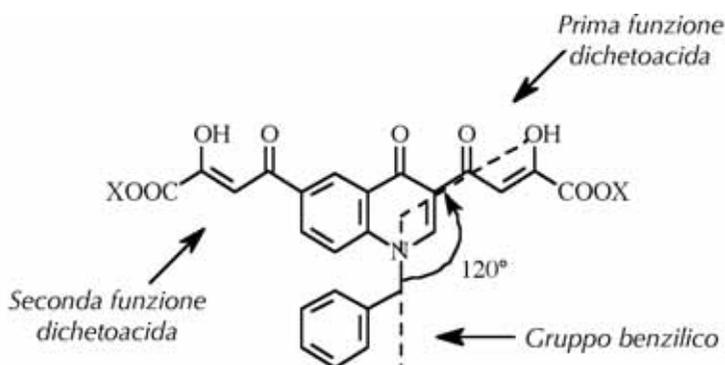


Figura 22. Requisiti strutturali dei derivati a struttura chinolonil dichetoacida.

Il composto **37r** presenta il gruppo benzilico sulla posizione 1 dell'anello oxochinolinico che consente di ottenere un derivato 1,3 disostituito che ben si adatta ai requisiti geometrici per un'elevata attività anti-integrasi. Una seconda funzione dioxobutanoica inoltre può essere facilmente introdotta attraverso un acetil derivato intermedio (Figura 22).

Come è mostrato in Figura 23, i nuovi dichetoacidi bifunzionali presentano un'elevata attività sia nei confronti dello strand transfer che del 3'-processing. In particolare i derivati **37r** e **49r** (Tabelle 6,7), che presentano un gruppo 4-fluorobenzilico sull'azoto1 del-

l'anello oxochinolinico, risultano più attivi dei corrispondenti derivati non alchilati **51d** e **52d** (Tabella 8). Il derivato **37r** risulta il più potente della serie dei dichetoacidi bifunzionali, con valori di IC_{50} per lo ST di circa 15 nM, inoltre risulta selettivo nei confronti dello strand transfer con valori di IC_{50} per lo ST 20 volte più bassi rispetto a quelli del 3'-P.⁵⁸

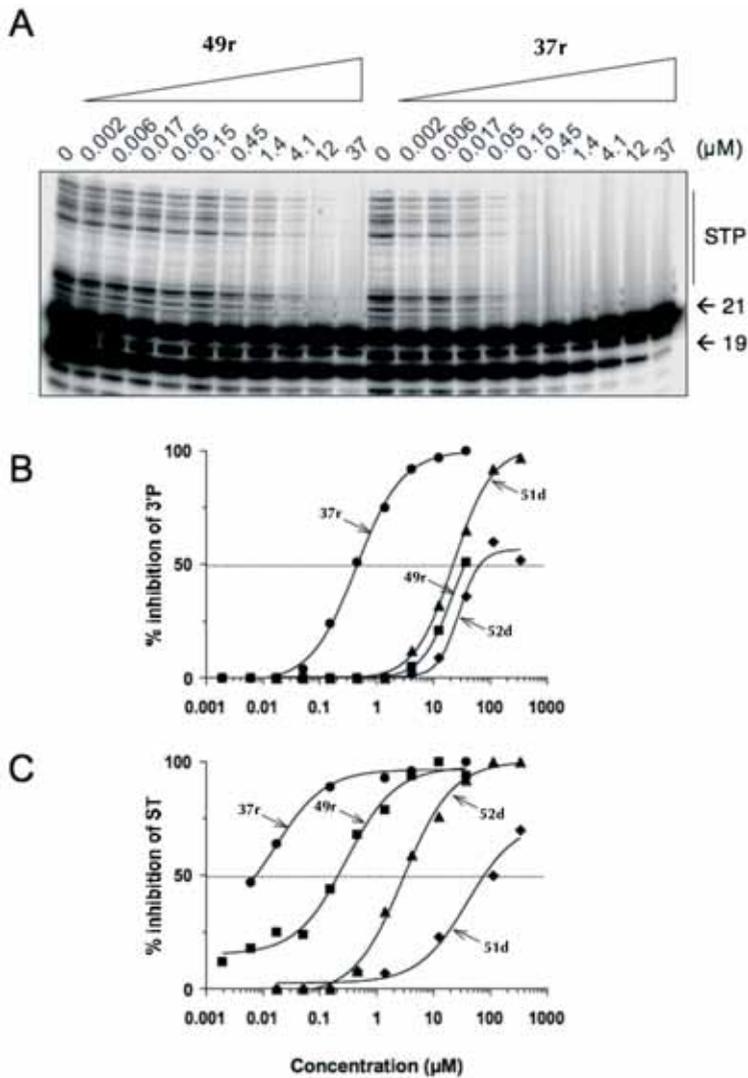
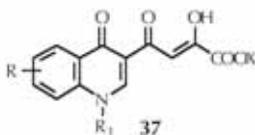


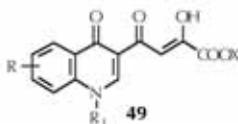
Figura 23. Confronto dell'inibizione nei confronti dell'integrasi di HIV-1 dei derivati **49r** e **37r** in presenza di Mg^{2+} . (A) Immagine "phosphorimager" che rappresenta un esperimento rappresentativo. 21, 19 e STP corrispondono rispettivamente al DNA substrato, ai prodotti del 3'-P e ai prodotti dello ST. (B) Curva di inibizione dell'integrasi di HIV-1 (derivanti dall'analisi densitometrica di esperimenti tipici) relative al 3'-processing. (C) Curve di inibizione dell'integrasi di HIV-1 relative allo strand transfer.

È molto importante sottolineare che il composto **37r** inibisce l'integrasi con potenza simile sia in presenza di Mg^{2+} che in presenza di Mn^{2+} . L'attività in presenza di Mg^{2+} è molto importante in quanto tutti i derivati attivi solamente in presenza di Mn^{2+} sono generalmente citotossici ed inattivi in saggi cellulari.³⁹ Inoltre la selettività nei confronti dello ST, aggiunta all'attività inibente in presenza di Mg^{2+} , e ai valori di IC_{50} sub-micromolari, rendono il derivato **37r** il dichetoacido bifunzionale più attivo riportato in letteratura.⁵⁸

Tabella 6. Attività enzimatica e cellulare dei derivati **37a-x**.

Compd	R	R ₁	X	IC ₅₀ ^a (μM)		CC ₅₀ ^b (μM)	EC ₅₀ ^c (μM)	SI ^d
				3'-P	ST			
37a	H	benzil	H	4.0	0.034	>200	9.6	>20.8
37b	H	2-F-benzil	H	1.2	0.016	161	9.04	17.8
37c	H	3-F-benzil	H	4.6	0.015		37.8	
37d	H	4-F-benzil	H	2.20	0.0313			
37e	H	4-Cl-benzil	H	22	0.54		12.1	
37f	H	4-OH-benzil	H	>37	0.45		nd ^e	
37g	H	2-OCH ₃ -benzil	H	>4.1	0.038		22.9	
37h	H	3-OCH ₃ -benzil	H	>4.1	0.14		nd	
37i	H	4-OCH ₃ -benzil	H	28	0.51		nd	
37j	H	4-NO ₂ -benzil	H	27	0.64		18.1	
37k	H	2,6-F ₂ -benzil	H	0.7	0.019		11.62	
37l	H	4-fenilbutil	H	>333	<0.45	180	>180	-
37m	H	2-naftilmetil	H	18	<0.45	>200	>200	-
37n	H	4-piridinilmetil	H	>333	16			
37o	H	2-chinolinil	H	70	0.40	200	>200	-
37p	6-F	4-F-benzil	H	2.9	0.047		nd	
37q	6-Cl	4-F-benzil	H	28.7	0.124		32.5	
37r	6-(4-carbossi-2,4-dioxobutil)	4-F-benzil	H	0.20	0.012	>200	4.29	46.6
37s	7-F	4-F-benzil	H	1.9	0.042		nd	
37t	7-Cl	2-F-benzil	H				5.3	
37u	7-Cl	4-F-benzil	H	14	0.0210		40.4	
37v	7-(1-pirrolidinil)	4-F-benzil	H		0.079		10	
37w	8-F	4-F-benzil	H	>4.1	0.025		nd	
37x	8-Cl	4-F-benzil	H	>4.1	0.014		nd	
37i	6,7-Cl ₂	4-F-benzil	H		0.032		7.8	
L-731,988				10	0.057	54	1.5	36

^a Concentrazione di composto richiesta per ridurre l'attività dell'enzima del 50%.^b Concentrazione dose di composto richiesta per ridurre la vitalità delle cellule del 50% come determinato col metodo MTT.^c Concentrazione di composto richiesta per ridurre la crescita esponenziale delle cellule MT-438 del 50%.^d Indice di Selettività: rapporto CC₅₀/IC₅₀.

Tabella 7. Attività enzimatica e cellulare dei derivati **49a-x**.

Compd	R	R ₁	X	IC ₅₀ ^a (μM)		CC ₅₀ ^b (μM)	EC ₅₀ ^c (μM)	SI ^d
				3'-P	ST			
49a	H	benzil	Et	>1000	0.70	7	>7	-
49b	H	2-F-benzil	Et	125	0.28	43	3.6	11.9
49c	H	3-F-benzil	Et	>12.3	4.9		43.8	
49d	H	4-F-benzil	Et	>100	0.326			
49e	H	4-Cl-benzil	Et	>37	>37		nd	
49f	H	4-OH-benzil	Et	>333	1.4		nd	
49g	H	2-OCH ₃ -benzil	Et	>333	1.4		29.4	
49h	H	3-OCH ₃ -benzil	Et	>333	16		nd	
49i	H	4-OCH ₃ -benzil	Et	>37	>37		nd	
49j	H	4-NO ₂ -benzil	Et	>37	>37		nd	
49k	H	2,6-F ₂ -benzil	Et	>12.3	0.25		6.89	
49l	H	4-fenilbutil	Et	>333	>120	27.7	>27.7	-
49m	H	2-naftilmetil	Et	>333	32	76	>76	-
49n	H	4-piridinilmetil	Et	>333	14			
49o	H	2-chinolinil	Et	>1000	3.5	200	>200	-
49p	6-F	4-F-benzil	Et	>37	0.49		nd	
49q	6-Cl	4-F-benzil	Et	>100	>100			
49r	6-(4-carboxietil-2,4-dioxobutil)	4-F-benzil	Et	40	0.34	191		
49s	7-F	4-F-benzil	Et	25	1.9		nd	
49t	7-Cl	2-F-benzil	Et		3		2.9	
49u	7-Cl	4-F-benzil	Et	>100	>100			
49v	7-(1-pirrolidinil)	4-F-benzil	Et		1.3		8	
49w	8-F	4-F-benzil	Et	>333	4		nd	
49x	8-Cl	4-F-benzil	Et	>333	10 ⁴	0.057	nd	
49y	6,7-Cl ₂	4-F-benzil	Et		16		11.07	
L-731,988				10	0.057	54	1.5	36

^a IC₅₀: dose di composto richiesta per ridurre l'attività dell'integasi del 50%.

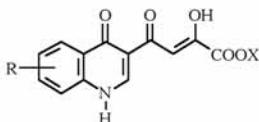
^b Citotossicità: dose di composto richiesta per ridurre la vitalità delle cellule del 50% come determinato col metodo MTT.

^c Concentrazione di composto richiesta per ridurre la crescita esponenziale delle cellule MT-4XII del 50%.

^d Indice di Selettività: rapporto CC₅₀/EC₅₀.

Per valutare l'importanza della presenza di un sostituente in posizione N-1 dell'anello oxochinolinico sono stati sintetizzati i derivati non sostituiti **51** ed i loro corrispondenti esteri etilici e ne è stata determinata la capacità inibitoria nei confronti dell'integrasi di HIV-1. Dall'analisi dei risultati di attività dei derivati **51a-d** e **52a-d** si può notare che i composti non alchilati sulla posizione N-1 dell'anello oxochinolinico non risultano attivi, ad eccezione del dichetoacido bifunzionale **51d**, che risulta scarsamente attivo sullo strand transfer ($IC_{50} = 0.43 \mu M$), come mostrato in Tabella 8. Chiaramente la presenza della porzione benzilica è indispensabile per instaurare delle interazioni favorevoli con l'enzima.⁵⁸

Tabella 8. Attività dei derivati **51a-d** e **52a-d** nei confronti dell'integrasi del virus HIV-1.



comp	R	X	IC ₅₀ (μM)	
			3'-P	ST
51a	H	H	>100	>100
51b	6-Cl	H	>100	>100
51c	7-Cl	H	>100	>100
51d	6-COCH=CH(OH)COOH	H	>4.1	0.43
52a	H	Et	>100	>100
52b	6-Cl	Et	>100	>100
52c	7-Cl	Et	>1000	>1000
52d	6-COCH=CH(OH)COOEt	Et	>333	80

MOLECULAR MODELING

Per confermare le nostre ipotesi di lavoro, abbiamo effettuato uno studio preliminare di molecular modeling sui derivati a struttura aril dichetoeseenoica **36** e **45** e sui derivati a struttura chinolinil dioxobutanoica **37** e **49**.

Sono stati inoltre eseguiti studi di docking attraverso l'uso del programma Autodock. Le coordinate relative al complesso 5-CITEP/IN (Brookheaven Protein Database, PDB, codice di accesso 1QS4) sono state sottoposte a minimizzazione e a procedure di dinamica molecolare usando il programma AMBER. Il docking mostra chiaramente che, in generale, tutti i derivati presentano un sito di legame comune.

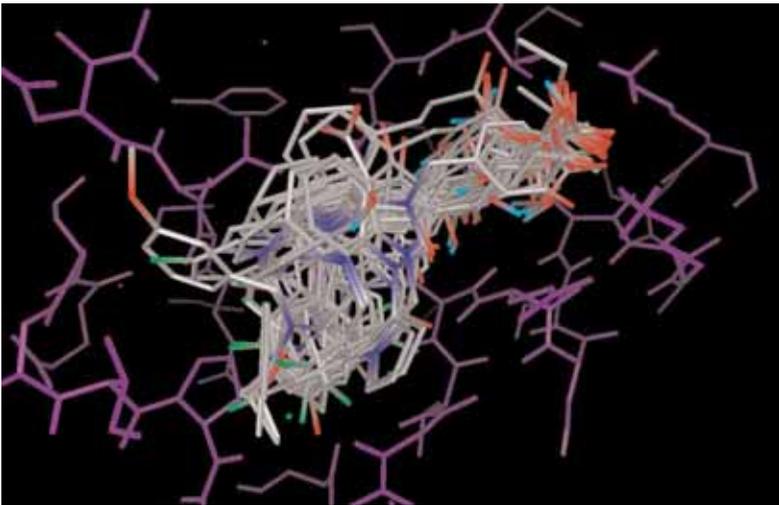


Figura 24. Acidi arildiooesenoici “docked” nel sito catalitico dell’integrasi. In viola è riportata l’integrasi. Gli atomi di idrogeno sono omessi per semplicità.

In Figura 24 sono riportati i risultati degli studi di docking, dai

quali si deduce che è possibile osservare un buon grado di sovrapposizione tra le molecole.

In particolare la sovrapposizione del composto **49d** al derivato pirrolico 2,6-F₂ sostituito **36k**, ci mostrano come effettivamente l'anello oxochinolinico vada a posizionarsi in regioni del sito catalitico analoghe a quella della porzione fenilmetil pirrolica (Figura 25).⁵⁷

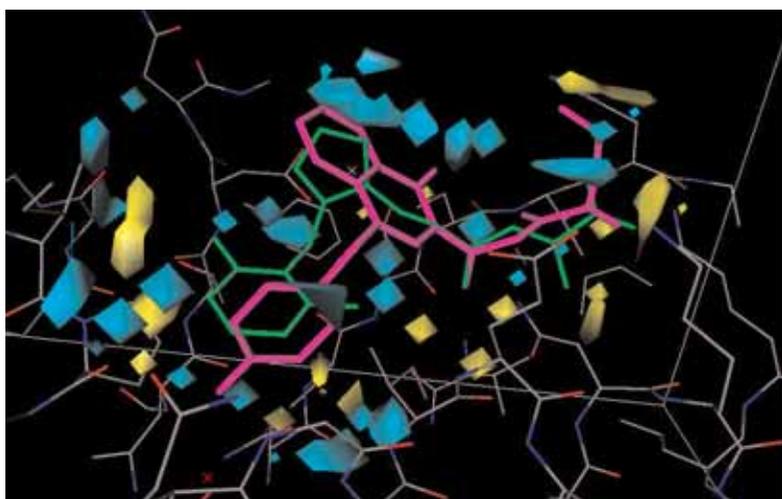


Figura 25. Coefficienti PLS per il modello preliminare di 3D-QSAR.

Sono stati effettuati inoltre degli studi 3D QSAR attraverso l'uso combinato dei programmi GRID e GOLPE. I modelli preliminari 3D QSAR dimostrano un'elevata correlazione tra l'attività biologica e la struttura chimica del training set, mostrando buoni valori dei coefficienti di correlazione ($r^2 = 0.95$, $q^2 = 0.78$). (Figura 24).⁵⁷ Per comprendere il modo in cui il composto più attivo della serie degli acidi oxochinolinil dioxobutanoici **37r** si lega al sito catalitico dell'integrasi (CCD), sono stati effettuati degli studi di

Docking, usando la struttura a raggi-X 1BIS (subunità B)⁵⁹. Uno ione Mg^{2+} è stato posto nel sito attivo tra i due atomi di ossigeno dei residui Asp64 e Asp116, considerando la geometria dello ione Mg^{2+} presente nella struttura 1QS4 (subunità A) della Protein Data Bank (PDB)⁶⁰.

Tenendo conto della flessibilità della proteina, il derivato **37r** è analizzato con una simulazione molecolare dinamica (MD) per 1 ns, in accordo con il metodo Relaxed-Complex⁶¹. È stato scelto il programma AutoDock 3.0.5 poichè utilizza un ligando completamente flessibile nel suo algoritmo di docking e poichè ha dimostrato di essere in grado di rappresentare in modo soddisfacente numerose strutture cristalline complesse⁶².

La proteina analizzata con la MD sembra essere veramente molto stabile, ad eccezione dei tre loop 139-147, 165-172 e 185-196. Il primo, detto anche "loop catalitico", è molto vicino al sito catalitico, ed è importante, data la sua flessibilità, per l'attività catalitica dell'integrasi⁶³. In accordo con i precedenti studi MD il loop catalitico si muove indietro verso la regione del sito attivo⁶⁴. L'atomo di Mg^{2+} coordinato dai residui Asp64 e Asp116 resta inalterato durante tale movimento.

Il docking di **37r**, realizzato attraverso un'analisi di circa 100 ps, mostra due possibili modelli di legame (Figura 26). Nella Figura 26a è mostrato l'orientamento di legame del derivato: il gruppo carbossilico di una delle due catene dichetoacide del ligando chela lo ione Mg^{2+} , mentre l'altro si inserisce tra i residui Lys156 e Lys159, formando dei legami idrogeno con entrambe le catene laterali e con il carbonile dell'Asn155. Il gruppo 4-fluorobenzilico è invece posizionato in una tasca idrofobica formata dai residui del loop catalitico Tyr143, Pro142, Ile141, Gly140 e dai residui Ile60, Gln62, Val77, Val79, His114, Gly149, Val150, Ile151, Glu152, Ser153, Met154. In particolare si ha un'interazione elet-

trostatica favorevole tra l'atomo di fluoro del benzile con il gruppo ammidico del residuo Gln62. L'anello chinolinico della molecola instaura un'interazione ammido-anello aromatico con la catena laterale di Asn155, mentre l'ossigeno carbonilico della chinolina non è in grado di formare un legame idrogeno con la catena laterale di Thr66. Nel nostro modello Thr66, Ser153 e Met154, le cui mutazioni sembrano essere responsabili della resistenza ai DKAs, sono tutti in prossimità del ligando⁴⁹.

Un'alternativa molto significativa a tale modello di legame è fornita dal modello in cui il metallo è chelato in modo bidentato dall'ossigeno carbonilico della chinolina e dall'ossigeno della funzione dichetoacida, mentre i gruppi ossidrilico e carbossilato della stessa catena laterale legano rispettivamente l'Asp116 e l'Asn117 (Figura 26b). Sul lato opposto della molecola, l'altra catatena dichetoacida si estende tra i residui di Lys156 e Lys159, entrando in contatto esclusivamente con l'ultimo amminoacido. Il gruppo 4-fluorobenzilico è completamente inserito nella tasca idrofobica in cui è stabilizzato da interazioni idrofobiche con le catene laterali di Ile151 e Pro142. Sebbene i due modelli di legame differiscano in alcuni dettagli, in entrambe i casi i ligandi interagiscono con l'enzima attraverso gli stessi punti di attacco:

- 1) ione metallico;
- 2) lisina 156 e/o lisina 159;
- 3) tasca idrofobica.

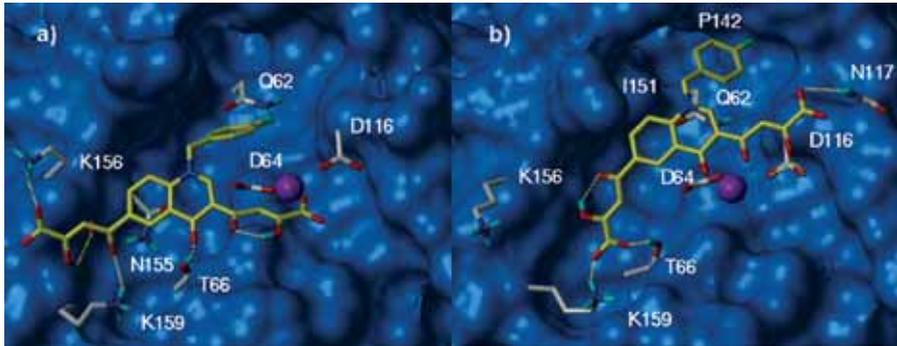


Figura 26. I due principali binding mode di **37r** nel sito catalitico dell'integrasi.

La ridotta attività dei dichetoesteri rispetto ai corrispondenti dichetoacidi è dovuta alla capacità delle funzioni carbossiliche di chelare uno ione metallico e di interagire con i residui di lisina precedentemente nominati, a differenza dei dichetoesteri che legano solo blandamente questa porzione dell'enzima. Quindi per una forte interazione con l'enzima integrasi, ed in particolare con lo ione metallico, sono indispensabili le funzioni carbossiliche libere. D'altro canto, la perdita di attività osservata per i derivati non sostituiti sull'atomo di azoto dell'anello oxochinolinico rispetto a quelli N-alchilati, sia nel 3'-processing che nello strand transfer, può essere chiaramente attribuita all'assenza della catena benzilica, che nel nostro modello si inserisce nella tasca idrofobica, creando un legame più stabile.

Come già riportato in precedenza⁵¹, il derivato **37r** è efficace su entrambe gli step catalitici dell'integrasi, il 3'-processing e lo strand transfer, differenziandosi perciò dai dichetoacidi monofunzionali, che generalmente sono selettivi nei confronti dello strand transfer. Tenedo conto di ciò, abbiamo ipotizzato che i dichetoacidi bifunzionali (BDKAs) possano legare sia il sito accettore che il sito donatore dell'integrasi di HIV-1, essendo inibitori sia del 3'-

processing che dello strand transfer, a differenza dei dichetoacidi monofunzionali che legano solo il sito accettore, essendo efficaci solo contro lo strand transfer⁵⁷. A questo punto per comprendere a fondo il meccanismo d'azione di tali derivati, abbiamo riesaminato i risultati del docking, con l'aiuto di modelli teorici del tetramero dell'integrasi dell'HIV-1 complessata con il DNA donatore ed il DNA accettore, come riportato da McCammon e collaboratori⁶⁵.

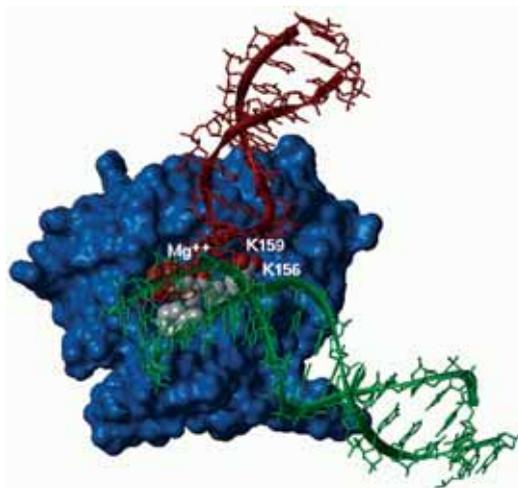


Figura 27. Modello del complesso CCD-DNA con **37r** nel sito catalitico dell'integrasi.

L'immagine del composto **37r** minimizzato nel complesso CCD-DNA (Figura 27) porta alle seguenti considerazioni:

- 1) la catena dichetoacida che coordina lo ione Mg^{2+} è chiaramente importante nell'ancoraggio del ligando al sito catalitico. È noto che mentre questa porzione della molecola non sembra interferire con il legame al DNA donatore può impe-

dire fisicamente il legame al DNA accettore. Nel nostro modello sia il DNA accettore che quello donatore hanno un contatto con il residuo Asn117 (Figura 26b). Questo amminoacido gioca un ruolo cruciale nella funzionalità enzimatica ed una sua mutazione porta ad un'integrasi difettosa soprattutto nello strand transfer⁶⁶;

- 2) l'altra funzione dichetoacida, inserendosi tra i residui di lisina 156 e lisina 159, potrebbe interferire con l'avvicinamento ed il legame del DNA donatore. Questo risultato è in accordo con i dati di photo-crosslinking, che rivelano che le lisine sopra citate sono importanti per il legame al DNA donatore⁶⁷. Questo potrebbe spiegare la capacità del derivato **37r** di inibire il 3'-processing;
- 3) il gruppo 4-fluorobenzilico, che si inserisce nella tasca idrofobica, potrebbe ridurre la mobilità del loop catalitico ed impedire fisicamente il legame del DNA accettore. Nel modello proposto entrambe le molecole di DNA sono poste in prossimità del loop; in particolare, il DNA accettore è in stretto contatto con i residui Ile151 e Pro142, che contribuiscono al legame dell'inibitore (Figura 26b). Questi risultati confermano, in accordo con le osservazioni sperimentali, che il gruppo benzilico nei DKAs è determinante nell'inibizione dello strand transfer^{51,58}.

CONCLUSIONI

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), causata dal virus HIV-1, rimane ancora un problema irrisolto. Dopo anni di duro lavoro, sono stati scoperti ed introdotti nella pratica clinica numerosi inibitori della trascrittasi inversa e della proteasi.

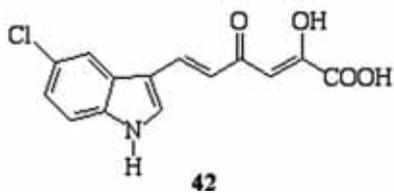
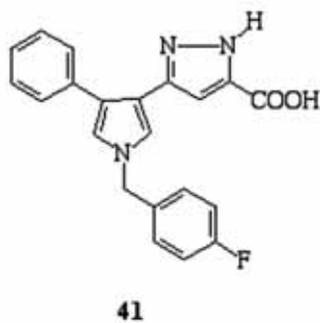
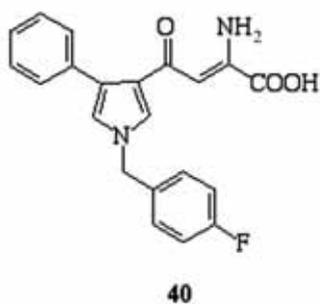
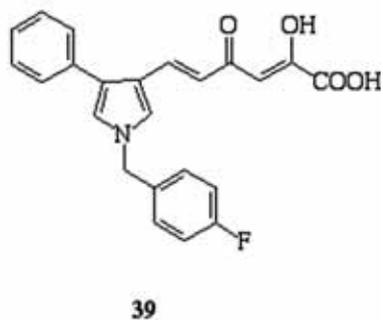
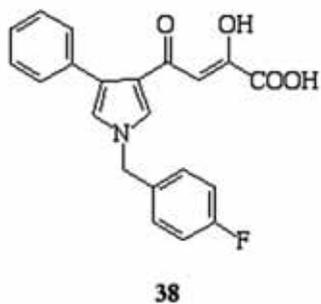
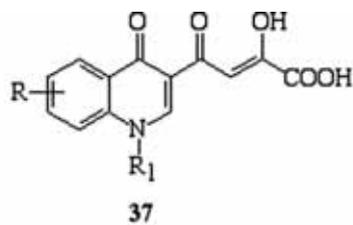
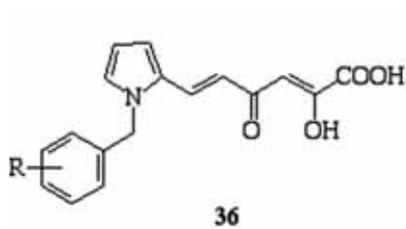
Però, a causa della resistenza sviluppata dal virus HIV-1, tutte le terapie farmacologiche intraprese per inibire l'uno e l'altro enzima, si sono rivelate sfortunatamente inefficaci nei trattamenti a lungo termine. Per questo motivo si è pensato di combinare, in una unica terapia farmacologica, sia gli inibitori della proteasi che quelli della trascrittasi inversa: visto che in questo caso si tende ad inibire il ciclo di replicazione virale bloccando due diverse tappe del processo, la terapia si è rivelata molto più efficace.

Dopo la scoperta dell'enzima integrasi, numerosi studi farmaceutici sono stati rivolti alla sintesi e alla progettazione di molecole capaci di inibire il target in questione.

In sinergia con le terapie farmacologiche già utilizzate, l'utilizzo di queste nuove molecole ha potenziato l'effetto inibitorio nei confronti della replicazione virale.

Il fatto che non esista al momento alcun inibitore dell'HIV-1 integrasi nella pratica clinica indirizza tutti gli sforzi della ricerca farmaceutica verso la sintesi di nuove molecole attive nei confronti dell'integrasi e con minore citotossicità possibile.

Il lavoro presentato in questa tesi riguarda la sintesi e la progettazione di nuovi inibitori dell'integrasi a struttura arilmetil-1*H*-pirrol-2-il-dioxoesenoica e loro analoghi **36-42**.



I derivati sintetizzati hanno mostrato un'elevata attività anti-HIV-1, del tutto paragonabile o superiore a quella di composti molto promettenti descritti in letteratura, rivelandosi attivi nei confronti di cellule infettate.

Nella serie degli acidi arildichetoeseoici **36** risultati importanti sono stati ottenuti saggiando i composti **36b** ($EC_{50} = 1.0 \mu M$), **45b** ($EC_{50} = 0.5 \mu M$), **36d** ($EC_{50} = 0.7 \mu M$), **36k** ($EC_{50} = 0.35 \mu M$) **45k** ($EC_{50} = 0.44 \mu M$), che presentano S.I. maggiore dell'unità e che quindi possono essere considerati una nuova classe di inibitori dell'integrasi che blocca la replicazione dell'HIV in cellule infettate.

Riguardo i derivati a struttura chinolinildioxobutanoica **37**, essi hanno mostrato un'attività anti-integrasi estremamente elevata e sono risultati inoltre attivi in saggi cellulari.

I risultati più importanti sono stati ottenuti modificando il nucleo benzilico sull'azoto dell'anello oxochinolinico, attraverso l'introduzione di vari sostituenti nelle diverse posizioni dell'anello, e valutando l'influenza di tali modifiche strutturali sulla capacità inibitoria.

Al contrario, la sostituzione del nucleo benzilico con altri gruppi aromatici od eterocicli ha portato a derivati scarsamente attivi in saggi cellulari.

In particolare ottimi risultati sono stati ottenuti con i derivati **37a-d**.

Il composto non sostituito **37a** ha mostrato un'ottima azione inibente nei confronti dell'integrasi, sia sul 3'-processing ($IC_{50} = 4.0 \mu M$) che sullo strand transfer ($IC_{50} = 0.034 \mu M$), e una notevole attività inibitoria nei confronti delle cellule infettate ($EC_{50} = 9.6 \mu M$).

Il 4-fluoro derivato **37d** risulta molto attivo nei confronti dello ST

($IC_{50} = 0.0313 \mu M$) con una attività paragonabile al composto **37a**. I derivati **37b** ($IC_{50} = 0.016 \mu M$) e **37c** ($IC_{50} = 0.015 \mu M$) risultano tra i più attivi della serie di acidi chinolinil-2,4-dioxobutanoici da noi sintetizzati, con un'attività nei confronti dello strand transfer circa doppia rispetto al derivato non sostituito **37a**.

Inoltre i derivati **37a** (S.I. > 20.8) e **37b** (S.I. = 17.8) presentano una notevole attività inibitoria nei confronti della replicazione virale in cellule infettate da HIV-1, a concentrazioni di inibitore notevolmente inferiori a quelle citotossiche.

Buoni risultati sono stati inoltre ottenuti con il derivato **37x**, che presenta un atomo di cloro in posizione 8 dell'anello oxochinolinico. Esso presenta una IC_{50} per lo ST pari a $0.014 \mu M$, doppia rispetto a quella del derivato non sostituito **37d** e paragonabile a quella dei derivati **37b** e **37c**.

I risultati migliori sono stati comunque ottenuti con il dichetoacido bifunzionale **37r**. Esso è risultato il più attivo della serie degli acidi 4-(1,4-diidro-1-aril-4-oxochinolin-3-il)-2,4-dioxobutanoici **37**, mostrando un'ottima attività nei confronti dell'integrasi con valori di $IC_{50} = 0.012 \mu M$ e risultando dalle 17 alle 540 volte più attivo di alcuni dichetoacidi bifunzionali riportati in letteratura. Gli esperimenti di Docking sono stati indispensabili per comprendere meglio l'interazione del derivato **37r** con l'enzima e ci hanno permesso di ipotizzare un suo possibile meccanismo d'azione. Esso inoltre è attivo anche nei confronti delle cellule infettate da HIV-1 ($EC_{50} = 4.29 \mu M$), risulta scarsamente citotossico ($CC_{50} > 200 \mu M$) e mostra un indice di selettività >47.

Sulla base di tali risultati, i composti descritti in questa tesi, ed in particolare il dichetoacido bifunzionale **37r**, risultano tra i più potenti inibitori dell'integrasi di HIV-1 descritti in letteratura e possono essere considerati degli ottimi derivati sui quali investire per

una potenziale applicazione terapeutica.

BIBLIOGRAFIA

RIFERIMENTI

- 1) www.unaids.org
- 2) Jaffe, H. Public health. Whatever happened to the US AIDS epidemic? *Science* **2004**, *305*, 1243-1244.
- 3) Richman, D.D. HIV chemotherapy. *Nature* **2001**, *410*, 995-1001.
- 4) Coen, J. Therapies. Confronting the limits of success. *Science* **2002**, *296*, 2320-2324.
- 5) Dianzani, F.; Ippolito, G.; Moroni, M.; "AIDS in Italia 20 anni dopo" ed. Masson.
- 6) Chiu, T.K. & Davies, D.R. Structure and function of HIV-1 integrase. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 965-977.
- 7) Chen, J.C. et al Crystal structure of the HIV-1 integrase catalytic core and C-terminal domains: a model for viral DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 8233-8238.
- 8) Wang J.Y., Ling H., Young, W. & Craigie, R. Structure a two domain fragment of HIV-1 integrase: implication for domain organization in the intact protein. *EMBO J.* **2001**, *20*, 7333-7343.
- 9) Rice, P.A. & Baker, T.A. Comparative architecture of transposases and integrase complexes. *Nature Struct. Biol.* **2001**, *8*, 302-307.
- 10) Bujoucz, G. et al Binding of different divalent cations to the active site of avian sarcoma virus integrase and their effects on enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18161-18168.
- 11) Young, W. & Steitz, T.A. Recombining the structures of HIV integrase RuvC and RNaseH structure **1995**, *3*, 131-134.
- 12) Beese, L.S. & Steitz, T.A. Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia Coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.* **1991**, *10*, 25-33.

- 13) Grobler, J. A. et al. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: implication for metal binding in the active site of phosphotransferases enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6661-6666.
- 14) Marchand, C. et al, Metal-dependent inhibitor of HIV-1 integrase by β -diketo acids mutant (F185K/C280S) *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 600-609.
- 15) Chow, S.A. et al, Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science* **1992**, *255*, 723-726.
- 16) Chow, S.A. et al, Juxtaposition of two viral DNA ends in a bimolecular disintegration reaction mediated by multimers of human immunodeficiency virus type 1 or murine leukemia virus integrase. *J. Virol.* **1994**, *68*, 7869-7878.
- 17) Engelman, A. et al, Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J.* **1993**, *612*, 3269-3275.
- 18) Engelman, A. et al, Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J. Virol.* **1992**, *66*, 6362-6369.
- 19) Parril, A. L., HIV-1 integrase inhibition: binding site, structure activity relationships and future perspectives. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1811-1824.
- 20) Goldur, Y. et al, Structure of HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: a platform for antiviral drug design *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13040-13043.
- 21) Dayman, R. et al, Small-molecule HIV-1 integrase inhibitors: the 2001-2002 update. *Curr. Pharm. Design.* **2003**, *9*, 1789-1802.
- 22) Sotriffer, C.A. et al, Active site binding modes of HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4109-4117.

- 23) Tsurutani, N et al, Identification of critical aminoacid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and non dividing cells. *J. Virol.* **2000**, *74*, 4795-4806.
- 24) Zhu, K. et al, Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effects of cysteine mutations of integrase on its integrations with reverse transcriptase. *J. Virol.* **2004**, *78*, 5045-5055.
- 25) Brown, P.O. Retroviruses ed. Coffin **1998**, 161-203.
- 26) Turlure, F et al, Human cell proteins and human immunodeficiency virus DNA integration. *Front. Biosc.* **2004**, *9*, 3187-3208.
- 27) Kalpana, G. V. et al, protein-protein interactions of HIV-1 IN: *INI-1* (IN Interactor 1), a novel human gene with sequence similarity to yeast transcription factor SNF5. *J. Cell. Biochem.* **1994**, *18B*, 27.
- 28) Cherepanov, P. et al, HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J. Biol. Chem.* **2002**, *278*, 372-382.
- 29) Violot, S. et al, The human polycomb group EED protein interacts with the integrase of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **2001**, *75*, 11344-11353.
- 30) Parissi, V. et al, Functional interactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase with human and yeast HSP60. *J. Virol.* **2002**, *75*, 11344-11353.
- 31) Turelli, P. et al, Cytoplasmic recruitment of ini 1 and pml on incoming HIV preintegration complexes. Interference with early steps of viral replication. *Mol. Cell.* **2001**, *7*, 1245-1254.
- 32) Bukrinsky, M. et al, Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6580-6584.

- 33) Yoder, K. E. et al, Repair of gaps in retroviral integration intermediates. *J. Virol.* **2000**, *74*, 11191-11200.
- 34) Daniel, R. et al, Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the homologous end joining repair pathway. *J. Virol.* **2004**, *78*, 8573-8581.
- 35) Carteau, S. et al, Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are disfavored target. *J. Virol.* **1998**, *72*, 4005-4014.
- 36) Schoreder, A. R. et al, HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **2002**, *110*, 521-529.
- 37) Bor, Y. C. et al, Target-sequence preferences of HIV-1 integration complexes *in vitro*. *Virology* **1996**, *222*, 283-288.
- 38) Pryciak, P. M. et al, Nucleosomes DNA-binding proteins, and DNA sequences modulate retroviral integration target site selection. *Cell*, **1992**, *69*, 769-780.
- 39) Pommier, Y. et al, Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature Rew.* **2005**, *4*, 236-248.
- 40) Hazuda, D. et al, Integrase inhibitors and cellular immunity suppress retroviral replication in rhesus macaques. *Science* **2004**, *305*, 528-532.
- 41) Pommier, Y. et al, HIV-1 integrase as a target for antiviral drugs. *Ant. Chem. Chemoter.* **1997**, *8* (6), 463-482.
- 42) Neamati, N. et al, Design and discovery of HIV-1 integrase inhibitors. *DDT* **1997**, *2*, 487-498.
- 43) Neamati, N. et al, Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5661-5670.
- 44) Pannecocque, C. et al, New class of HIV-1 integrase inhibitors that block viral replication in cell culture. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1169-1177.

-
- 45) Di Santo R. et al, HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in infected cell. Planning Synthetic derivatives from natural products. *PAC* **2003**, 75, 195-206.
 - 46) Costi, R. et al, 2,6-Bis-(3,4,5-trihydroxybenzyldene) derivatives of cyclohexanone: novel potent HIV-1 integrase inhibitors that prevent HIV-1 multiplication in cell-based assays. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 199-215.
 - 47) Hwang, D. J. et al, Dicafeoyl- or digalloyl- pyrrolidine and furan derivatives as HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 1429-1437.
 - 48) Xu, Y. W. et al, Caffeoyl naphthalene sulfonamide derivatives as HIV integrase inhibitors. *Bioorg. Chem. Lett.* **2003**, 11, 3589-3593.
 - 49) Hazuda, D. et al, Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* **2000**, 287, 646-650.
 - 50) Espeseth, A. et al, HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define an unique strand transfer conformation for integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 11245-11249.
 - 51) Marchand, C. et al, Structural determinant for HIV-1 integrase inhibition by β -diketo acids. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 12596-12603.
 - 52) Pais, G. et al, Structure activity of 3-aryl-1,3-diketo containing compounds as HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 3184-3194.
 - 53) Billich, A. et al, S-1360 Shionogi-GlaxoSmithKline. *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2003**, 4(2), 206-209.
 - 54) Zhang, X. et al, Azido-containing aryl β -diketoacid HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 1215-1219.

- 55) Johnson, A. et al, HIV-1 integrase inhibitors: a decade of research and two drugs in clinical trial. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1059-1077.
- 56) Costi, R. et al, 6-Aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids, novel integrase inhibitors active against HIV-1 multiplication in cell-based assays. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1745-1749.
- 57) Di Santo, R. et al, Design, synthesis and biological evaluation of heteroaryl diketohexenoic and diketobutanoic acids as HIV-1 integrase inhibitors endowed with antiretroviral activity. *Il Farmaco* **2005**, *60*, 409-417.
- 58) Di Santo, R. et al, Novel Bifunctional Quinolonyl Diketo Acid Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors: Design, Synthesis, Biological Activities and Mechanism of Action. *J. Med. Chem.* in press.
- 59) Goldgur, Y. et al, Three new structure of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9150-9154.
- 60) Goldgur, Y. et al, Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13040-13043.
- 61) Lin, J.-H. et al, Computational drug design accommodating receptor flexibility: the relaxed complex scheme. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5632-5633.
- 62) Morris, G. M. et al, Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.
- 63) Greenwald, J. et al, The mobility of an HIV-1 integrase active site loop is correlated with catalytic activity. *Biochem.* **1999**, *38*, 8892-8898.
- 64) Lins, R. D. et al, Molecular dynamics studies on the HIV-1 inte-

- grase catalytic domain. *Biophys. J.* **1999**, 76, 2999-3011.
- 65) Podtelezhnikov, A. A. et al, Modeling HIV-1 integrase complexes based on their hydrodynamic properties. *Biopolymers* **2003**, 68, 110-120.
- 66) Van Gent, D. C. et al, Mutational analysis of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 20, 9598-9602.
- 67) Jenkins, T. M. et al, Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-based analysis and photo-crosslinking. *EMBO J.* **1997**, 16, 6849-6859.

ELENCO PUBBLICAZIONI
della Dott.^{ssa}
ALESSANDRA ROUX

ELENCO PUBBLICAZIONI

- 1) Costi, R.; Di Santo, R.; Artico, M.; Roux, A.; Ragno, R.; Massa, S.; Tramontano, E.; La Colla, M.; Loddo, R.; Marongiu, M. E.; Pani, A.; La Colla, P.; 6-Aryl-2,4-Dioxo-5-Hexenoic Acids, Novel Integrase Inhibitors Active Against HIV-1 Multiplication in Cells-Based Assays. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2004**, *14*, 1745-1749.
- 2) R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, M. Forte, M. Artico, A. La Vecchia, E. Novellino, L. Palmisano, M.C. Galluzzo, M. Andreotti, S. Vella, L. Nencioni, A.T. Palamara, C. Marchand, Y. Pommier; Docking Studies on Bifunctional Quinolonyl Diketo Acids as HIV-1 Integrase Inhibitors, *Proceedings of Joint Meeting on Medicinal Chemistry*, Vienna (Austria), June 20-23, 2005, pag. 87-90;
- 3) Di Santo, R.; Costi, R.; Roux, A.; Artico, M.; Lavecchia, A.; Marinelli, L.; Novellino, E.; Palmisano, L.; Andreotti, M.; Amici, R.; Galluzzo, C. M.; Nencioni, L.; Palamara, A. T.; Pommier, Y.; Marchand, C. Novel Bifunctional Quinolonyl Diketo Acid Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors: Design, Synthesis, Biological Activities and Mechanism of Action. *Journal of Medicinal Chemistry*, in press.

COMUNICAZIONI POSTER A CONGRESSO

- 1) R. Di Santo, R. Costi, M. Artico, A. Roux, R. Ragno, E. Tramontano, A. Pani, P. La Colla; Acidi 6-Aril-2,4-dioxo-5-ese-noici, Nuovi Inibitori dell'Integrasi che Bloccano la Replicazione dell'HIV-1 in Cellule Infettate; XXI Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana SCI 2003, Torino, 22-27 Giugno 2003. FA-CP-019.
- 2) R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, M. Artico, R. Ragno, G. Greco, E. Novellino, C. Marchand, Y. Pommier; Acidi Chinolinil-2,4-dioxobutanoici come analoghi conformazionalmente bloccati ristretti dei derivati arildichetoese-noici, dotati di potente attività anti-integrasi del virus HIV-1; XVII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della Società Chimica Italiana, Pisa, 6-10 Settembre 2004. P-67.
- 3) R. Di Santo, R. Costi, M. Artico, A. Roux, G. Maga, K. Tardif, A. Siddiqui; 6-Aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic Acids, Novel HCV NS5b Polymerase Inhibitors; COST D28 MC Action Natural Products as a Source for Discovery, Synthesis, and Application of New Pharmaceuticals. October 21-24, 2004, Siena, Certosa di Pontignano, Italy. P-29.
- 4) R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, M. Artico, R. Ragno, G. Greco, E. Novellino, C. Marchand, Y. Pommier; Quinolinyl 2,4-Dioxobutanoic Acids, Conformationally Restrained Analogues of Aryldioxohexenoic Acids as HIV-1 Integrase Inhibitors; COST D28 MC Action Natural Products as a Source for Discovery, Synthesis, and Application of New Pharmaceuticals. October 21-24, 2004, Siena, Certosa di Pontignano, Italy. P-30.
- 5) R. Di Santo, R. Costi, M. Artico, A. Roux, M. Forte, G. Miele, A.T. Palamara, Y. Pommier, C. Marchand, L. Palmisano, M. Andreotti, M.C. Galluzzo, L. Nencioni, E. Novellino; Sintesi,

Saggi Enzimatici e Attività Antivirale di Nuovi Inibitori dell'Integrasi di HIV; Quinto programma nazionale di ricerca sull'AIDS, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 2-6 Maggio 2005, pag 150.

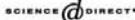
- 6) R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, M. Forte, M. Artico, A. La Vecchia, E. Novellino, L. Palmisano, M.C. Galluzzo, M. Andreotti, S. Vella, L. Nencioni, A.T. Palamara, C. Marchand, Y. Pommier; Docking Studies on Bifunctional Quinoliny Diketo Acids as HIV-1 Integrase Inhibitors, Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Vienna (Austria), June 20-23, 2005, *Scientia Pharmaceutica*, **2005**, 73, S 115.
- 7) R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, M. Forte, M. Artico, A. La Vecchia, E. Novellino, L. Palmisano, M.C. Galluzzo, M. Andreotti, S. Vella, L. Nencioni, A.T. Palamara, C. Marchand, Y. Pommier; SAR Studies on Quinoliny-2,4-Dioxobutanoic Acids, HIV-1 Integrase Inhibitors that Block HIV-1 Replication in Infected Cells; Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Vienna (Austria), June 20-23, 2005, *Scientia Pharmaceutica*, 2005, 73, S 116.
- 8) Roux. A.; 6-aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids: HIV-1 Integrase Inhibitors that Block HIV-1 Replication in Infected Cells; "European School of Medicinal Chemistry (XXV Advanced Course of Medicinal Chemistry and "E. Duranti" National Seminar for PhD Students); Urbino, July 3-7, P 45.
- 9) R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, M. Forte, M. Artico, A. La Vecchia, E. Novellino, L. Palmisano, M.C. Galluzzo, M. Andreotti, S. Vella, L. Nencioni, A.T. Palamara, C. Marchand, Y. Pommier; Quinoliny-2,4-Dioxobutanoic Acids as HIV-1 Integrase Inhibitors: SAR Studies and Binding Mode; Second Joint Italian-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry, September 12-16 2005, Modena-Italy, P119, pag. 195.

COMUNICAZIONI ORALI

- 1) R. Di Santo, R. Costi, A. Roux, M. Artico, L. Nencioni, A. T. Palamara; HIV-1 Integrase Inhibitors that block HIV-1 Replication in Infected Cells; Conferenza sulla Ricerca Scientifica Facoltà di Farmacia. *Dalle Molecole agli Organismi*. Roma, 9-10 dicembre 2004. O 1.



Available online at www.sciencedirect.com



Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14 (2004) 1745–1749

Bioorganic &
Medicinal
Chemistry
Letters

6-Aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids, novel integrase inhibitors active against HIV-1 multiplication in cell-based assays[☆]

Roberta Costi,^a Roberto Di Santo,^a Marino Artico,^{a,*} Alessandra Roux,^a Rino Ragno,^b Silvio Massa,^c Enzo Tramontano,^d Massimiliano La Colla,^d Roberta Loddo,^d M. Elena Marongiu,^d Alessandra Pani^d and Paolo La Colla^{d,*}

^aIstituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti, Dipartimento di Studi Farmaceutici, Università degli Studi di Roma 'La Sapienza', P. le A. Moro 5, I-00185 Rome, Italy

^bDipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, Università degli Studi di Siena, Via A. Moro 5, San Miniato, I-53100 Siena, Italy

^cDipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia delle Sostanze Biologicamente Attive, Università degli Studi di Roma 'La Sapienza', P. le A. Moro 5, I-00185 Rome, Italy

^dDipartimento di Biologia Sperimentale, Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Cagliari, Cittadella Universitaria, I-09042 Monserrato, Cagliari, Italy

Received 29 September 2003; revised 3 December 2003; accepted 16 January 2004

Abstract—A series of 6-aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids, were synthesized and tested against HIV-1 in cell-based assays and against recombinant HIV-1 integrase (rIN) in enzyme assays. Compound **8a** showed potent antiretroviral activity ($EC_{50}=1.5 \mu\text{M}$) and significant inhibition against rIN (strand transfer: $IC_{50}=7.9 \mu\text{M}$; 3'-processing: $IC_{50}=7.0 \mu\text{M}$). A preliminary molecular modeling study was carried out to compare the spatial conformation of **8a** with those of L-731,988 (**4**) and 5CITEP (**7**) in the IN core.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is the consequence of the infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Among retroviral targets useful for chemotherapeutic intervention, reverse transcriptase (RT) and protease (PR) play a fundamental role and many potent and selective inhibitors of these enzymes are actually used in the clinical practice. Drugs approved so far include nucleoside (NRTIs) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs),¹ such as AZT, ddI, d4T, nevirapine, delavirdine, efavirenz, and protease inhibitors (PRIs)² such as saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir, and lopinavir.

Due to failure of monotherapy with the above inhibitors, combination protocols were designed with both RTIs and PRIs in order to increase the clinical efficacy

and reduce the emergence of resistant variants. However, also the combination therapy has failed to provide long-term suppression of HIV-1 replication in infected individuals. Rapid development of drug resistance and toxicity problems make urgent the need to investigate new targets in the replicative cycle of HIV-1 to develop inhibitors different from RTIs and PRIs.^{3,4}

Besides RT and PR, another target useful for chemotherapeutic intervention is the HIV-1 integrase (IN), an enzyme which catalyzes the insertion of the viral DNA into the genome of the host cell through a multistep process. This includes: (i) assembly of integrase and viral DNA; (ii) endonucleolytic processing of viral DNA; (iii) covalent insertion of viral DNA into the host cell DNA.^{5–9}

Many different classes of compounds^{5–8} have been reported to inhibit the HIV-1 IN in enzyme assays. Among them, natural and synthetic polyhydroxylated molecules have emerged as potent IN inhibitors. However, only very few compounds of this class have been shown to possess specific anti-IN activity in enzyme

Keywords: Diketoacids; Aryldioxohexenoic acids; Pyrrole derivatives; Anti-HIV-1-IN agents; QSAR studies.

[☆]Supplementary data associated with this article can be found, in the online version at, doi:10.1016/j.bmcl.2004.01.037

*Corresponding authors. Tel.: +39-064462731; fax: +39-06499-13150 (M.A.); tel.: +39-070-6754147; fax: +39-070-6754210 (P.L.C.); e-mail: marino.artico@unroma1.it; placolla@unica.it

0960-894X/\$ - see front matter © 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bmcl.2004.01.037

assays and proved active in cell-based assays. Notable examples of natural products are L-chicoric acid (L-CCA) (**1**)¹⁰ and 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA) (**2**)¹¹ which, although capable of specific anti-IN activity in enzyme and PIC assays, have been proven to target the viral adsorption step.¹² Among the synthetic products, some properly substituted styrylquinolines (**3**)^{13,14} have been reported to possess specific anti-IN activity and to be active in cell-based assays in the low micromolar concentration range.

More recently, compounds containing a distinct dioxobutanoic acid moiety (**4–6**) have been identified as potent and specific inhibitors of HIV-1 multiplication targeting the integration process (Chart 1).^{7,15–17} The anti-IN activity was also retained when (i) the terminus carboxylic function was masked by a tetrazole ring (**7**) (Chart 2);⁸ (ii) the dioxobutanoic group was shortened into oxopropanoic moiety.¹⁸ On the contrary, to our knowledge, no attempts were found to lengthen the dioxobutanoic group.

Because of the rising interest in dioxobutanoic acids as potent integrase inhibitors they were pulsed to explore how elongation of the diketoacid chain would affect

anti-integrase activity. As a first attempt we designed some dioxohexenoic acids, whose acid side chain was conceived as the result of a partial superimposition between the cinnamoyl group of various natural and synthetic anti-IN substances (that is **1–3**) and the dioxobutanoic acid moiety of the recently reported inhibitors **4–6** (Chart 3).

Therefore, taking Merck derivative **4** as a lead compound we planned the synthesis of its vinylog 1-[[4-fluorophenylmethyl]-2-pyrrolyl]-1,4-dioxo-5-hexenoic acid **8c** and some related derivatives **8a,b,d-f** and **11a-f** (Scheme 1).

Our hypothesis that the insertion of a double bond between the phenylmethylpyrrol-1-yl and 2,4-dioxobutanoic acid moieties would afford compounds capable of retaining the anti-rIN activity of the lead compound **4**, was supported by a three-dimensional (3D) structure-based drug design (SBDD) and a molecular modeling (MM) investigation aimed at understanding the possible binding mode of the newly synthesized derivatives **8–11**

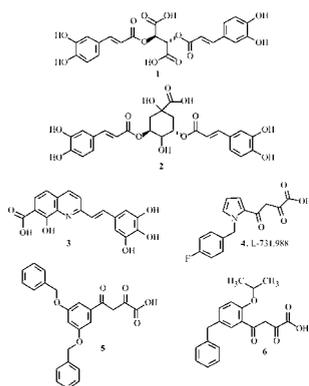


Chart 1. Anti-IN inhibitors and related derivatives.

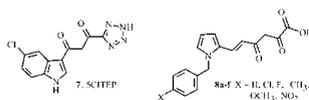


Chart 2. SCITEP and newly synthesized anti-IN derivatives.

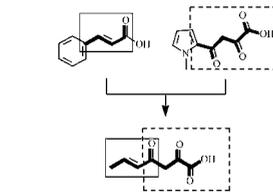
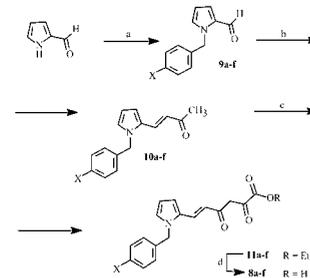


Chart 3. Design of dioxohexenoic acids.



X = H (a), Cl (b), F (c), Me (d), OMe (e), NO₂ (f)

Scheme 1. (a) Benzoylchloride (b,e,f) or bromide (a,c,d), K₂CO₃, DMF, 18 h, 90 °C; (b) 2-Propanone, 5N NaOH, 24 h, 25 °C; (c) Diethyl oxalate, NaOEt, 1 h 45 min, 25 °C; (d) 1N NaOH, 1.5 h, 25 °C.

in the HIV-1 IN enzymatic core. Compound **8a** was chosen as the prototype of the novel 2,4-dioxo-5-hexenoic acid class.

In the 1999, Goldgur et al.⁸ reported the structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with the reference structure **7**. In this structure the 5CITEP seems to mimic the DNA substrate/integrase interaction lying in the middle of the active site of enzyme subunit A between the three catalytic acidic residues, Asp-64, Asp-116 and Glu-152, without displacing the bound magnesium ion which remains complexed to the two aspartates. During further inspections of the 5CITEP binding mode, Sotriffer et al.⁹ pointed out that the 5CITEP bound conformation might be influenced by the crystal packing and that a more reliable binding mode could be represented by their docking calculations. More recently Barreca et al.¹⁰ reported a further different binding mode for the 5CITEP obtained by means of molecular dynamics studies.

Although we were aware of some discrepancies between the theoretical models and Goldgur studies, we believed that the experimental data, taken from Brookhaven Protein Data Bank^{20,21} (entry code 1qs4), could be more reliable for supporting our docking experiments.

Therefore, we used the 5CITEP structure (**7**), extracted from the corresponding HIV-1 soaked complex,⁹ as a template to model the 3D structure of **8a** and **11a**. For direct comparison purposes, the Merck compound **4** was modeled in the same way. Monte Carlo type conformational searches were carried out on isolated IN inhibitors (MCMM routine with continuum solvent simulation). Superimposition of the obtained global minima structures of **4**, **8a** and **11a** to the structure of 5CITEP (**7**) via atom by atom procedure displayed a good overlapping (not shown).²²

The above 3D resemblance suggested that these structures could share a common binding site for the dioxoacid and tetrazolyldioxopropane portions. In pursuing this hypothesis, the global minima structures of **4**, **8a** and **11a** were inserted in turn within the IN receptor site in place of **7**, with formation of three new complexes: IN/**4**, IN/**8a** and IN/**11a**. The latter were structurally refined by the aid of molecular mechanic geometry optimization software (MACROMODEL 6.5, AMBER all atom force field).²³ Relaxation of the 8 Å receptor core around the inhibitor was allowed during minimization. Again, good sterical agreement was observed among the three structures (Fig. 1).²⁴ Inspection of the minimized complexes reveals that the pharmacophoric features of **4**, **7**, **8a** and **11a** share a common ligand/receptor interaction pattern. Such a receptor-based structure alignment could be used: (i) as a rule in future 3D quantitative structure activity relationship (QSAR) studies;²⁵ (ii) to define the pharmacophore to be used in 3D data-base searches.²⁶

On the basis of the above preliminary MM study, both **8a** and **11a** were expected to show anti-rIN activity in enzyme assays.

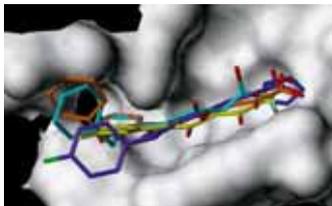


Figure 1. Superimposition **4** (purple), **7** (yellow), **8a** (orange) and **11a** (cyan) after their minimization in the IN catalytic core (white).

Scheme 1 depicts the chemical pathway employed in the synthesis of arylmethylpyrrolyldiketohexenoic acids **8a–f**. 1*H*-Pyrrole-2-carboxaldehyde was treated with 4-substituted phenylmethylhalides to afford 1-arylmethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxaldehydes **9a–f**, which were then reacted with 2-propanone to yield 4-(1-arylmethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-3-buten-2-ones **10a–f**. Claisen condensation of **10a–f** with diethyl oxalate in the presence of sodium ethoxide led to the formation of 6-(1-arylmethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-2,4-dioxo-5-hexenoic acid ethyl esters **11a–f**, which were hydrolyzed in alkaline medium to give title acids **8a–f**.

Title compounds were screened to provide informations on inhibition of the HIV-1 IN replication either in cell culture and in enzyme assays. The assays were made in parallel with those of **4** used as reference compound. Cytotoxicity of compounds, evaluated in parallel with their antiviral activity, was based on the viability of mock-infected cells, as monitored by the MTT method. Cell-based and enzyme assays were performed as previously described^{27–29} and the related experimental procedures are reported in the Supporting Information section.

The antiretroviral activity of the unsubstituted derivative **8a** and its ethyl ester **11a** against HIV-1 in MT-4 cells and the effects on activity produced by introduction of substituents on the phenyl rings (**8b–f** and **11b–f**, respectively) were examined to acquire preliminary SAR informations.

The results of assays are reported in Table 1. **8a** and its ethyl ester **11a** showed antiviral activities (EC_{50} = 1.5 μ M) comparable to that of L-731,988 (**4**) (EC_{50} = 1.5 μ M), one of the most promising integrase inhibitors described up to date in the literature. When tested in enzyme assays derivatives **8a** and **11a** were found the most potent inhibitors (3'-processing: 7.9 and 8.9 μ M; strand transfer: 7.0 and 7.5 μ M, respectively).

The remaining derivatives **8b–f** and **11b–f** inhibited integrase at higher concentrations.

An example of gel showing the inhibitory activities of **8a,b** and **11a** compared with those obtained for **4** in enzyme assays is reported in Figure 2.

1748

R. Costi et al. / Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 1745–1749

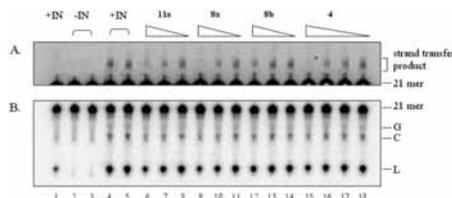


Figure 2. Inhibition of HIV-1 IN-catalyzed 3'-processing and strand-transfer reactions by **8a,b** and **11a** derivatives compared with **4**. The strand-transfer products migrate slower than the 21-mer substrate (Panel A, darker exposure) and the 3'-processing products glycerol-GT (G), cyclic-GT (C) and linear-GT (L) (Panel B, lighter exposure). Lane 1, DNA and IN without drugs incubated for 10 min at 37°C; lanes 2–3, DNA alone incubated for 1 h at 37°C; lanes 4–5, DNA and IN without drugs incubated for 1 h at 37°C; lanes 6–18 DNA, IN and a titration of: lanes 6–8, **11a** (100, 10, 1 µM); lanes 9–11, **8a** (100, 10, 1 µM); lanes 12–14, **8b** (100, 10, 1 µM); lanes 15–18 **4** (10, 1, 0.1, 0.01 µM). Samples of lanes 6–18 were incubated for 1 h at 37°C.

Table 1. Cytotoxicity and antiviral activities in enzyme (IN) and cell-based assays of derivatives **8a–f** and **11a–f**

Compd ^b	X	R	CC ₅₀ (µM)	EC ₅₀ (µM)	S.I. ^c	IC ₅₀ (µM) ^f	
						3'-Proc.	S.T.
8a	H	H	61	1.5	41	7.9	7.0
11a	H	Et	17	1.5	11	8.9	7.5
8b	Cl	H	95	>95		50	65
11b	Cl	Et	52	>52		85	90
8c	F	H	80	11	7.3	61	72
11c	F	Et	55	12	4.4	87	95
8d	Me	H	41	>41		56	67
11d	Me	Et	7	>7		73	88
8e	OMe	H	78	>78		22	41
11e	OMe	Et	27	>27		38	50
8f	NO ₂	H	33	>33		76	92
11f	NO ₂	Et	31	>31		57	45
4			54	1.5	36	2.0	0.3

^aData represent mean values for three independent determinations.

^bSee ref 30.

^cCytotoxicity: compound dose required to reduce the viability of mock-infected cells by 50% as determined by the MTT method.

^dCompound concentration required to reduce the exponential growth of MT-4/KB cells by 50%.

^eSelectivity index: CC₅₀/EC₅₀ ratio.

^fCompound concentration required to reduce rIN 3'-proc. and S.T. of 3'-end-labeled 40mer substrate by 50%.

From data of antiviral assays compounds **8a** and **11a** turned out to be the most potent and selective in cell-based assays. The introduction of a fluorine atom at the 4-position of the phenyl ring (**8c** and **11c**) did not lead to an improvement of antiviral activity but, contrary to expectations, it caused a seven-fold loss of potency. In addition, the introduction of chlorine (**8b** and **11b**), methyl (**8d** and **11d**), methoxy (**8e** and **11e**) or nitro (**8f** and **11f**) substituents led to totally inactive products.

When tested in enzyme assays against HIV-1 rIN in both strand transfer and 3'-processing reactions, only

compound **8a** and its ester **11a** showed inhibitory activity in the micromolar range (Table 1), whereas all 4-substituted phenylmethyl derivatives were active at concentrations ranging from 22 to 95 µM.

As a rule, acid derivatives (**8a–f**) were less cytotoxic than the corresponding esters (**11a–f**), whereas no difference in cell-based antiviral activities was observed by comparing the active acids (**8a** and **11a**) with the related esters (**8c** and **11c**).

The different steric and electronic arrangement of the phenylmethyl moieties of **8a** and **4** in the enzyme binding site (Fig. 1) could very likely account for: (i) the low inhibitory activity of **8a** compared with **4** in the strand transfer reaction; ii) the absence of selectivity between strand transfer and 3'-processing inhibitory activities of **8a** in enzyme assays. Furthermore, the steric hindrance along with differences in the electronic effects exerted by the substituents in the position 4 of the phenyl ring could be a determinant for the low activities of **8b–f**.

On the basis of the above results, we conclude that 6-aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids are novel inhibitors of the HIV-1 rIN which show anti-HIV-1 activity in cell-based assays. Because of its favorable selectivity index, **8a** is a promising lead for further studies. These will clarify whether the higher activity shown by this compound in cell-based assays compared to that in enzyme assays, is related to the possibility that **8a** targets additional viral enzymes.

Further studies, such as 3D QSAR and docking, are ongoing to get an insight into the design of new, more potent derivatives and to prioritize their synthesis.

Acknowledgements

Authors thank Italian Ministero della Sanità—Istituto Superiore di Sanità—IV Progetto AIDS 2001 (grants no 40D.08 and no 40D.46) and Italian MIUR (2000) for financial support.

References and notes

- De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2491.
- Vacca, J. P.; Condra, J. H. *Drugs Discovery Today* **1997**, *2*, 261.
- Brettler, R. P.; Wilson, A.; Povey, S.; Morris, S.; Morgan, R.; Leen, C. L.; Hutchinson, S.; Lewis, S.; Gore, S. *Int. J. STD AIDS* **1998**, *9*, 80.
- Microft, A.; Vella, S.; Benfield, T. L.; Chiesi, A.; Miller, V.; Gargalianos, P.; d'Arminio-Monforte, A.; Yust, I.; Bruun, J. N.; Philips, A. N.; Lundgren, J. D. *Lancet* **1998**, *352*, 1725.
- Neamati, N.; Sunder, S.; Pommier, Y. *Drugs Discovery Today* **1997**, *2*, 487.
- Stratiffier, C. A.; Ni, H.; McCammon, J. A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4109.
- Hazuda, D. J.; Felock, P.; Witmer, M.; Wolfe, A.; Stillmock, K.; Grobler, J. A.; Espeseth, A.; Gabryelski, L.; Schleif, W.; Blau, C.; Miller, M. D. *Science* **2000**, *287*, 646.
- Stanwell, C.; Ye, B.; Yuspa, S. H.; Burke, T. R., Jr. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 475.
- Goldgur, Y.; Craigie, R.; Cohen, G. H.; Fujiwara, T.; Yoshimaga, T.; Fujishita, T.; Sugimoto, H.; Endo, T.; Murai, H.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 13040.
- Lin, Z.; Neamati, N.; Zhao, H.; Kiryu, Y.; Turpin, J. A.; Aberham, C.; Strebel, K.; Kohn, K.; Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; Debyser, Z.; De Clercq, E.; Rice, W. G.; Pommier, Y.; Burke, T. R., Jr. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1401.
- McDougall, B.; King, P. J.; Wu, B. W.; Hostomsky, Z.; Reinecke, M. G.; Robinson, W. E., Jr. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 140.
- Pluymsers, W.; Neamati, N.; Pannecouque, C.; Fikkert, V.; Marchand, C.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y.; Schols, D.; De Clercq, E.; Debyser, Z.; Witvrouw, M. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 641.
- Mekouar, K.; Moussecardet, J.-F.; Desmaële, D.; Subra, F.; Leh, H.; Savouré, D.; Auclair, C.; d'Angelo, J. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2846.
- Zouhiri, F.; Moussecardet, J.-F.; Mekouar, K.; Desmaële, D.; Savouré, D.; Leh, H.; Subra, F.; Le Bret, M.; Auclair, C.; d'Angelo, J. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1533.
- Wai, J. S.; Egbertson, M. S.; Payne, L. S.; Fisher, T. E.; Embrey, M. W.; Tran, L. O.; Melamed, J. Y.; Langford, H. M.; Guare, J. P.; Zhuang, L.; Grey, V. E.; Vacca, J. P.; Holloway, M. K.; Naylor-Olsen, A. M.; Hazuda, D. J.; Felock, P. J.; Wolfe, A. L.; Stillmock, K. A.; Schleif, W. A.; Gabryelski, L. J.; Young, S. D. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4923.
- Marchand, C.; Zhang, X.; Pais, G. C. G.; Cowansage, K.; Neamati, N.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12596.
- Pais, G. C. G.; Zhang, X.; Marchand, C.; Neamati, N.; Cowansage, K.; Svarovskaia, E. S.; Pathak, V. K.; Tang, Y.; Nicklaus, M.; Pommier, Y.; Burke, T. R., Jr. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3184.
- Kawasuji, T.; Yoshinaga, T. Patent WO 01 17,968; *Chem. Abstr.* **2001**, *134*, 237486m.
- Barreca, M. L.; Lee, K. W.; Chimirri, A.; Briggs, J. M. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1450.
- Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J.; Meyer, E. E., Jr.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535.
- Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J.; Meyer, E. F., Jr.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *80*, 319.
- To check for methodology correctness the same conformational search was also carried out on 5CITEP (7). The global minimum found showed an atomic roots means square distance on all heavy atoms of only 0.36.
- Mohamadi, F.; Richards, N. G. J.; Guida, W. C.; Liskamp, R.; Lipton, M.; Caulfield, C.; Chang, G.; Hendrickson, T.; Still, W. C. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 440.
- The complex IN/5CITEP was also submitted to the same minimization procedure for direct comparisons.
- Oprea, T. I.; Waller, C. L.; Marshall, G. R. *Drug Des. Discovery* **1994**, *12*, 29.
- Carlson, H. A.; Masukawa, K. M.; Rubins, K.; Bushman, F. D.; Jorgensen, W. L.; Lins, R. D.; Briggs, J. M.; McCammon, J. A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2100.
- Pauwels, R.; Balzarini, J.; Baba, M.; Snoeck, R.; Schols, D.; Herdewijn, P.; Desmyster, J.; De Clercq, E. *J. Virol. Methods* **1988**, *20*, 309.
- Artico, M.; Di Santo, R.; Costi, R.; Novellino, E.; Greco, G.; Massa, S.; Tramontano, E.; Marongiu, M. E.; De Montis, A.; La Colla, P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3948.
- Tramontano, E.; La Colla, P.; Cheng, Y.-C. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7237.
- All new compounds exhibited satisfactory spectroscopic and analytical properties. Data for compound **8a**, including chemical and physical data, are reported: yield 68%, mp 146–148 °C (from toluene). IR (nujol): cm^{-1} 3400 (OH), 1700 (CO acid) and 1590 (CO); ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ 5.43 (s, 2H, CH₂), 6.30 (m, 1H, pyrrole C4-H), 6.45 (s, 1H, C3-H), 6.69 (d, 1H, $J_1 = 15.4$ Hz, C5-H), 7.01–7.40 (m, 7H, pyrrole C3-H and C5-H and benzene H), 7.65 (d, 1H, $J_1 = 15.4$ Hz, C6-H), 15.50 (bs, 2H, OH). Anal. calcd for C₁₇H₁₇NO₄ (297.31): C, 68.68; H, 5.09; N, 4.71. Found: 68.63; 5.18; 4.74. Data for compounds **8b-f** and **11a-f** are reported in the Supplementary Information section.

Docking Studies on Bifunctional Quinolonyl Diketo Acids as HIV-1 Integrase Inhibitors

R. Di Santo¹, R. Costi¹, A. Roux¹, M. Forte¹, M. Artico¹,
A. Lavecchia², E. Novellino², L. Palmisano³, M.C. Galluzzo³,
M. Andreotti³, S. Vella³, L. Nencioni⁴, A.T. Palamara⁴,
C. Marchand⁵ and Y. Pommier⁵

¹Istituto Pasteur - Fondazione Cenci Bolognetti, Dipartimento di Studi Farmaceutici, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italy, ²Dipartimento Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italy, ³Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, ⁴Istituto di Microbiologia, Università di Roma "La Sapienza", Roma, Italy, ⁵Laboratory of Molecular Pharmacology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute Building 37, Room 5068, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA

Summary

Novel bifunctional quinolonyl diketo acid derivatives were designed, synthesized and tested in their inhibitory ability against HIV-1 integrase. Derivative **8** was the most interesting compound. It was potent IN inhibitor in either ST or 3'-P reaction, and showed both high antiviral activity against HIV-1 infected cells and low cytotoxicity. The binding mode of compound **8** was proposed.

Introduction

Combination therapy using RT and PR inhibitors is nowadays the recommended clinical approach in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), caused by infection with the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). However, the emergence of resistant strains calls urgently for researches on inhibitors of further viral targets such as integrase (IN), the enzyme that catalyzes the integration of the proviral DNA into the host chromosomes *via* a multi-step sequence of reactions, including "3'-processing" (3'-P), and strand transfer (ST).¹

In the past several years, numerous compounds with diverse structural features have been reported as IN inhibitors, of which the most promising

are derivatives characterized by β -diketo acid moiety (DKAs). Several reported DKAs selectively inhibit the ST reaction of IN competing with substrate DNA in binding to the active site and exhibit potent antiviral effects against HIV-infected cells. More recently, some bifunctional DKAs (BDKAs) were reported, which are characterized by the presence of two diketo acid chains.² We observed that BDKAs reported so far were less potent than mono functional counterparts and endowed with low antiviral activities. Thus, being engaged in decennial studies on IN inhibitors,³ we designed novel bifunctional inhibitors based on the quinolonyl-2,4-dioxobutanoic acid skeleton that is easy to alkylate in 1-position with a benzyl group to obtain 1,3-disubstituted compounds. In such way, the angle between the two lines extended from the above groups is 120° , a geometric requirement for an optimal anti-IN activity (Fig. 1).

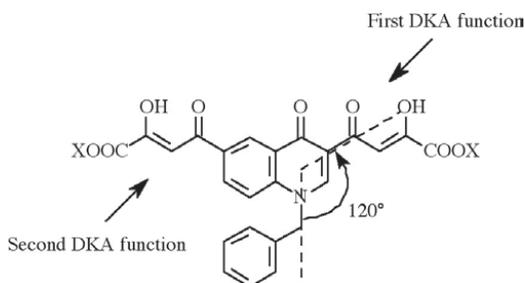


Figure 1. Structural features of the newly designed bifunctional quinolonyl diketo acid derivatives

Results

Synthesis of derivatives 5-8 was performed as follows: the key intermediate 3,6-diacetyl-4(1*H*)-quinolinone (9) was obtained by reaction of 4-acetylaniline with ethyl ethoxymethyleneacetoacetate, followed by thermic cyclization in diphenyl ether. 9 was then alkylated with 4-fluorobenzyl bromide in alkaline medium (K_2CO_3) to afford *N*-1 substituted quinolinone 10. Acetyl derivatives 9 and 10 underwent Claisen condensation with diethyl oxalate in presence of sodium ethoxide as a catalyst to afford the diketo esters 5 and 7, which were in turn hydrolyzed with NaOH 1N in the corresponding acid derivatives 6 and 8.

Derivatives 5-8 were tested both in enzyme or cell-based assays. Inhibitory values, measured in an extracellular integrase assay, and antiviral potencies in HIV-infected cells, are shown in Tab. 1.

Vienna, Austria, June 20-23, 2005

89

Table 1. Cytotoxicity, Antiviral and Anti-Integrase Activities of Derivatives 5-8

^aInhibitory concentration 50%. ^bCytotoxic concentration 50%. ^cEffective concentration 50%. ^dSelectivity index = CC_{50}/EC_{50} . ^eBz = CH₂-4-F-Ph. ^fLiterature data.

Cmpd	Anti-IN Activities				Antiviral Activities		
	R	X	IC ₅₀ (μM) ^a		CC ₅₀ (μM) ^b	EC ₅₀ (μM) ^c	SI ^d
			3'-P	ST			
5	H	C ₂ H ₅	>333	80		nd	-
6	H	H	>4.1	0.43		nd	-
7	Bz ^e	C ₂ H ₅	40	0.25	191		
8	Bz ^e	H	0.20	0.012	>200	4.29	>46.6
			2 ^f	7.8	1.83	ND	ND
			3 ^f	82	6.5	ND	ND
			4 ^f	1.8	0.2	81	17

Molecular Modeling

With the aim to elucidate the binding mode of compound **8** within the IN catalytic core domain (CCD), docking calculations were carried out using the program AutoDock 3.05. To take into account protein flexibility, **8** was docked to an ensemble of protein snapshots taken from a 1 ns molecular dynamics (MD) simulation, according to the Relaxed-Complex method. Figures 2a and 2b show the two predominant binding modes found by AutoDock. Although they differ in some details of ligand-enzyme interaction, it is worth noting that in both docking solutions, the ligand interacts with the same enzyme attachment points: i) the metal ion, ii) the K156 and

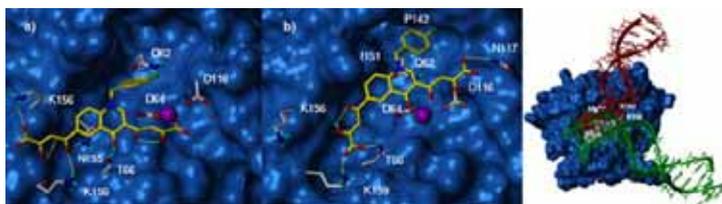


Figure 2. a) and b) the two predominant binding modes of **8** (yellow) to MD snapshots of IN core domain. Residues lining the ligand position are highlighted. The metal ion is represented as magenta sphere. c) Model of integrase CCD-DNA complex with **8** (rendered as CPK) bound to the active site. Donor DNA is in red and acceptor DNA is in green.

K159 residues, and iii) the hydrophobic pocket.

The reduced inhibitory potencies of diketo esters **5** and **7** compared to their respective acids **6** and **8** is due to the ability of both carboxylic functionalities to chelate the metal ion and to interact with the above mentioned lysine, whereas the diketo esters weakly bind to this two enzyme counterparts. On the other hand, the drop in activity of **6** compared to **8** in both ST and 3'-P (see Tab. 1) can be clearly attributed to the absence of the *p*-F-benzyl moiety, which in our model inserts into the hydrophobic pocket leading to a more efficient binding. According to previous findings,² **8** is effective on both ST and 3'-P processes catalyzed by HIV-1 IN and in this feature differs from the reported monofunctional DKAs, which are generally found selective toward the ST. In this respect, it was hypothesized that BDKAs can bind both DNA acceptor and donor site of HIV-1 IN being inhibitors of both ST and 3'-P processes, whereas the monofunctional DKAs selectively bind the acceptor site being effective on 3'-P. A visual inspection of **8** docked into the CCD-DNA complex (Fig. 2c) lead us to the following considerations: i) the diketo acid arm, which coordinates the Mg⁺⁺ metal ion, is clearly important in anchoring the ligand to the catalytic site; ii) the other diketo acid function, inserting between K156 and K159 residues, would interfere with the donor DNA recognition and binding. This could explain the ability of **8** to inhibit the IN catalyzed 3'-P reaction; iii) the *p*-F-benzyl group, which inserts in the hydrophobic pocket, would reduce the catalytic loop mobility and physically hamper the binding of the acceptor DNA.

This finding also makes sense with respect to the experimental observation that the benzyl group in DKAs ligands is the primary determinant of the ST inhibition.

In conclusion, experiments of automatic docking to the enzyme MD snapshots have helped to provide a framework for interpreting the inhibitory activity of our BDKAs. As more information will be available to better characterize the details of DNA-IN interaction, this issue will be resolved more definitively.

References

1. Pommier, Y.; Johnson, A. A.; Marchand, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat. Rev. Drug Discovery* **4**, 236-248, **2005**.
2. Marchand, C.; Zhang, X.; Pais, G. C. G.; Cowansage, K.; Neamati, N.; Burke, T. R., Jr.; Pommier Y. Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by b-diketo acids. *J. Biol. Chem.* **277**, 12596-12603, **2002**.
3. Costi, R.; Di Santo, R.; Artico, M.; Roux, A.; Ragno, R.; Massa, S.; Tramontano, E.; La Colla, M.; Loddo, R.; Marongiu, M. E.; Pani, A.; La Colla, P. 6-Aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids, novel integrase inhibitors active against HIV-1 multiplication in cell-based assays. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1745-1749, **2004** and references cited therein.

Novel Bifunctional Quinolonyl Diketo Acid Derivatives as HIV-1 Integrase Inhibitors: Design, Synthesis, Biological Activities, and Mechanism of Action

Roberto Di Santo,^{*†} Roberta Costi,[‡] Alessandra Roux,[‡] Marino Artico,[‡] Antonio Lavecchia,^{*,‡} Luciana Marinelli,[‡] Ettore Novellino,[‡] Lucia Palmisano,[‡] Mauro Andreotti,[‡] Roberta Amici,[‡] Clementina Maria Galluzzo,[‡] Lucia Nencioni,[‡] Anna Teresa Palamara,[‡] Yves Pommier,[‡] and Christophe Marchand[‡]

Istituto Pasteur—Fondazione Cenci Bolognietti, Dipartimento di Studi Farmaceutici, and Istituto di Microbiologia, Università di Roma "La Sapienza", P. Le A. Moro 5, I-00185 Roma, Italy, Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, I-00161 Roma, Italy, Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli "Federico II", via D. Montesano 49, I-80131 Napoli, Italy, and Laboratory of Molecular Pharmacology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute Building 37, Room 5068, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-4255

Received November 18, 2005

The virally encoded integrase protein is an essential enzyme in the life cycle of the HIV-1 virus and represents an attractive and validated target in the development of therapeutics against HIV infection. Drugs that selectively inhibit this enzyme, when used in combination with inhibitors of reverse transcriptase and protease, are believed to be highly effective in suppressing the viral replication. Among the HIV-1 integrase inhibitors, the β -diketo acids (DKAs) represent a major lead for anti-HIV-1 drug development. In this study, novel bifunctional quinolonyl diketo acid derivatives were designed, synthesized, and tested for their inhibitory ability against HIV-1 integrase. The compounds are potent inhibitors of integrase activity. Particularly, derivative **8** is a potent IN inhibitor for both steps of the reaction (3'-processing and strand transfer) and exhibits both high antiviral activity against HIV-1 infected cells and low cytotoxicity. Molecular modeling studies provide a plausible mechanism of action, which is consistent with ligand SARs and enzyme photo-cross-linking experiments.

Introduction

Three different classes of chemotherapeutic agents are actually used to inhibit the replication of HIV-1, the etiological agent of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): the nucleoside (NRTI) and non-nucleoside (NNRTI) reverse transcriptase inhibitors, the protease inhibitors (PRI), and the inhibitors of the fusion of the virus with the host cell (for review, see ref 1). The highly active anti-retroviral therapy (HAART), which is based on the use of a combination of the cited drugs, effectively inhibits the replication cycle of HIV-1. The advent of HAART has made possible the suppression of the HIV-1 replication to such an extent that the virus becomes undetectable in the blood of infected persons. As a consequence, a decline of both mortality and morbidity due to the HIV-1 was reported in the recent years. However, HAART fails to eradicate viral replication, which persists at a low level in cellular reservoirs, despite the chemotherapy.² The ability of HIV-1 to evolve drug resistance and the toxicity of HAART regimens make integrase (IN), which is the third virally encoded enzyme required for HIV-1 replication, a legitimate target for the development of new drugs. Moreover, IN has no cellular counterpart, and thus came into sight 10 years ago as a new therapeutic opportunity.³⁻⁶ Hopefully, integrase inhibitors will become a potential additive to HAART or a salvage therapy for patients resistant to currently available anti-HIV drugs.

IN catalyzes the insertion of viral DNA into the host genome derived from reverse transcription of HIV RNA. Integration occurs via a multistep sequence of reactions, including (i) cleavage of a dinucleotide pair from the 3'-end of the viral DNA (termed "3'-processing", 3'-P), (ii) insertion of the resulting shortened strands into the host-cell chromosome (termed "strand transfer", ST), and (iii) removal of the two unpaired nucleotides at the 5'-end of the viral DNA and gap-filling process (for review, see ref 6).

Numerous compounds with different structural features have been reported as IN inhibitors^{6,7} of which the most important class is typified by an aryl β -diketo acid motif (DKAs)⁸ (compound **1**, Figure 1). DKAs selectively inhibit the ST reaction of IN and exhibit antiviral activity against HIV-1-infected cells in a manner consistent with inhibition of integration.^{8,10} These compounds are also useful tools to explore the molecular mechanism of IN.^{8,11,12}

More recently, some bifunctional DKAs (BDKAs) were reported, which are characterized by the presence of two diketo acid chains in the skeleton of the IN inhibitor (compounds **2-4**, Figure 1).¹³⁻¹⁵ However, the BDKAs reported so far were less potent than mono functional counterparts and endowed with low antiviral activities. These properties could be ascribed to the lack of some important structural features in the reported BDKAs. In fact, structure-activity relationships on monofunctional aryl diketo acids led to the conclusion that the highest activity was obtained when the central aromatic ring is 1,3-disubstituted with the diketo acid chain and a benzyl moiety (see compound **1**, Figure 1). In such a way, the angle between the two lines extended from the above groups is around 120°.⁹

The aim of the present work was to obtain new BDKAs with improved activity against IN and HIV-1-infected cells. Thus, on the basis of our prior experience,¹⁶ we designed new

* To whom correspondence should be addressed. R.D.S.: phone and fax, +39-6-49913150; e-mail, roberto.dsanto@uniroma1.it. A.L.: phone and fax, +39-81-678613; e-mail, lavecchia@unina.it.

[‡] Dipartimento di Studi Farmaceutici, Istituto Superiore di Sanità.
[‡] Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli "Federico II".

[‡] Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità.
[‡] Istituto di Microbiologia, Università di Roma "La Sapienza".
[‡] Laboratory of Molecular Pharmacology, National Cancer Institute.

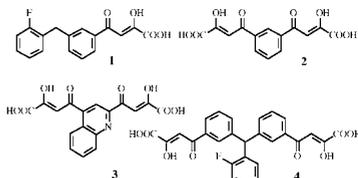


Figure 1. Structures of selected HIV-1 IN inhibitors belonging to the mono and bifunctional DKAs.

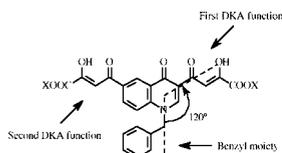


Figure 2. Structural features of the newly designed bifunctional quinolonyl diketo acid derivatives.

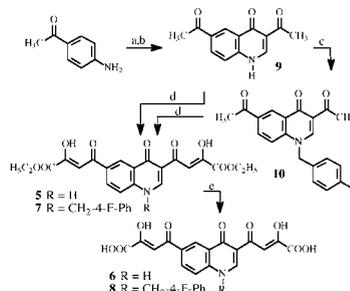
inhibitors **5–8** based on the 4-(4(*1H*)-quinolinon-3-yl)-2,4-dioxobutanoic acid skeleton (Figure 2). This scaffold was chosen because (i) it is easy to alkylate the 4(*1H*)-quinolinone at 1-position with a benzyl group to obtain a 1,3-disubstituted compound that well fits the geometric requirements for an optimal IN inhibitory activity and (ii) a second diketo acid function can readily be introduced at position 6 of the aromatic ring via an acetyl intermediate. Moreover, with the aim to characterize the mode of binding of the novel compounds within the IN, docking studies were performed and a molecular basis of enzyme inhibition is proposed.

Results and Discussion

Chemistry. The synthesis of derivatives **5–8** is outlined in Scheme 1. The key intermediate, 3,6-diacetyl-4(*1H*)-quinolinone (**9**), was obtained by reaction of 4-acetylaniline with ethyl ethoxymethyleneacetate, followed by thermic cyclization in diphenyl ether. **9** was then alkylated with 4-fluorobenzyl bromide in alkaline medium (K_2CO_3) to afford *N*-1 substituted quinolinone **10**. Acetyl derivatives **9** and **10** underwent Claisen condensation with diethyl oxalate in the presence of sodium ethoxide as a catalyst to afford the diketo esters **5** and **7**, which were in turn hydrolyzed with 6 N NaOH to the corresponding acid derivatives **6** and **8**. The chemical and physical data of compounds **5–10** are reported in the Experimental Section; the spectroscopic data of derivatives **5–8** are given in the Supporting Information.

Evaluation of Biological Activities. In Vitro Assays. Derivatives **5–8** were tested *in vitro* for ST inhibition in the presence of magnesium (Mg^{2+}) using a novel electrochemiluminescent assay to generate IC_{50} values from triplicate experiments (Table 1). Compounds **5–8** were also tested for ST and 3'-P using gel-based assays in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} (Figure 3). IC_{50} values were calculated using dose–response curves (Figure 3B,C) and are summarized in Table 1. The newly synthesized BDKAs exhibit potent inhibitory activity against IN for both ST and 3'-P steps. The acid derivatives (**6, 8**) are more potent than the corresponding esters (**5, 7**), and the 1-*p*-

Scheme 1^a



^a Reagents and conditions: (a) ethyl ethoxymethyleneacetate, neat, 120 °C 5 min, 73%; (b) PhO, reflux 50 min, 56%; (c) 4-fluorobenzyl bromide, K_2CO_3 , DMF, reflux 2 h, 88%; (d) diethyl oxalate, C_2H_5ONa , THF- C_2H_5OH , rt 2 h, **5** (100%), 45 min, **7** (88%); (e) 1 N NaOH, rt 1.5 h, **6** (52%), **8** (77%).

F-benzyl-substituted quinolinones (**7, 8**) are more active than the unsubstituted counterparts (**5, 6**). Derivative **8** is the most potent derivative with IC_{50} values for strand transfer around 15 nM (Figure 3 and Table 1). Compound **8** is selective for ST inhibition with IC_{50} values approximately 20-fold lower for ST than for 3'-P (Figure 3, compare panels B and C; Table 1). Compound **8** also inhibits integrase with similar potency in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} (Table 1). The activity in the presence of Mg^{2+} in addition to the selectivity for ST represents a trademark of the most potent DKAs.¹¹ Compound **8** is to our knowledge, the most potent bifunctional diketo acid derivative reported to date.

Cell-Based Assay. Antiviral activities are presented in Table 1. Compound **8** showed good antiviral efficacy in HIV-1-infected H9/HTLVIIIIB cells ($EC_{50} = 4.29 \mu M$, $EC_{90} = 40 \mu M$) and low cytotoxicity ($CC_{50} > 200 \mu M$, $SI > 46.6$). **6** and **7** were **8** and **5** times, respectively, less potent than the parent compound **8**, while **5** was inactive below 50 μM concentration. Note that the quinolonyl derivative **8** showed higher potency in inhibiting the replication cycle of HIV-1 in cell-based assays (EC_{50}) and better SI than the reference derivatives **3** and **4**.

These structure–activity relationships emphasize the relevance of the free carboxylic acid group and the *p*-F-benzyl moiety for both tight binding with IN and high antiviral potency.

Docking Studies. To elucidate the binding mode of the most active compound (**8**) within the IN catalytic core domain (CCD), docking calculations were carried out using the X-ray structure 1BIS (subunit B).¹⁷ A Mg^{2+} ion, was placed in the active site between the carboxylate oxygen atoms of residues D64 and D116, considering the geometry of the Mg^{2+} ion present in the PDB structure IQS4 (subunit A).¹⁸

To take into account protein flexibility, **8** was docked to an ensemble of protein snapshots taken from a 1-ns molecular dynamics (MD) simulation, according to the relaxed-complex method.¹⁹ The program AutoDock 3.0.5 was chosen because it utilizes a fully flexible ligand in its docking algorithm and because it has been shown to successfully reproduce many crystal structure complexes.²⁰ Details of the docking setup and the MD simulation protocol are provided as Supporting Information. The protein turned out to be very stable throughout the

Table 1. Cytotoxicity and Antiviral and Anti-Integrase Activities of Derivatives 5–8

compd	R	X	anti-IN activity: IC ₅₀ ^a					antiviral activity		
			ST			3'-P		CC ₅₀ ^d	EC ₅₀ ^e	SI ^f
			Mg ²⁺ ^b	Mg ²⁺ ^c	Mn ²⁺ ^c	Mg ²⁺ ^c	Mn ²⁺ ^c			
5	H	C ₂ H ₅	77 ± 13	39	80	28	>333	>200	>50	—
6	H	H	9.1 ± 1.2	2.9	0.43	22	>4.1	>200	36.3	5.5
7	Bz ^g	C ₂ H ₅	0.38 ± 0.01	0.29	0.25	21	40	191	20	9.6
8	Bz ^g	H	0.016 ± 0.004	0.017	0.012	0.44	0.20	>200	4.29 ^h	>47
2ⁱ					1.83		7.8	nr ^j	nr ^j	—
3^j					6.5		82	>25	61 ^k	—
4^j					0.2		1.8	81	17	4.8

^a Inhibitory concentration 50% (μM) determined from dose–response curves. ^b Experiments performed in triplicate using the BioVeris assay (ST assay in the presence of MgCl₂). ^c Experiments performed on gels in the presence of MnCl₂ or MgCl₂ (see Figure 3). ^d Cytotoxic concentration 50% (μM). ^e Effective concentration 50% (μM). ^f Selectivity index = CC₅₀/EC₅₀. ^g Bz = CH₂-4-F-Ph. ^h For this compound, EC₅₀ = 40 μM was determined. ⁱ Literature data; see refs 11–13. ^j nr: not reported. ^k Percentage of inhibition obtained at a concentration of 25 μM .

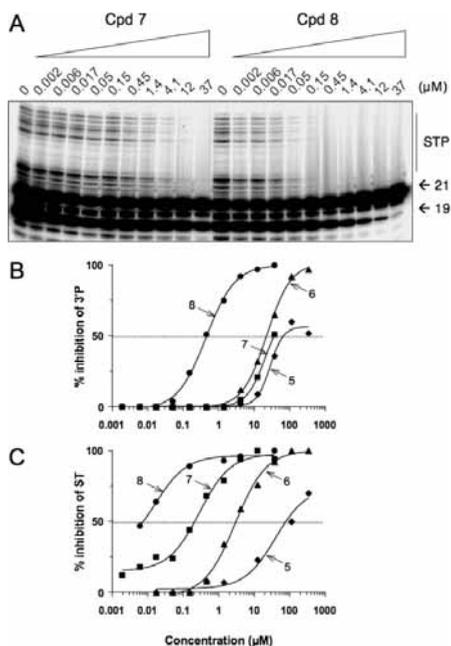


Figure 3. Comparison of HIV-1 integrase inhibition by compound 7 and 8 in the presence of Mg²⁺. (A) Phosphorimager image showing a representative experiment. 21, 19, and STP correspond to DNA substrate, 3'-processing product, and strand transfer products, respectively. (B) HIV-1 integrase inhibition curve (derived from densitometric analysis of typical experiments) for 3'-processing. (C) HIV-1 integrase inhibition curve for strand transfer.

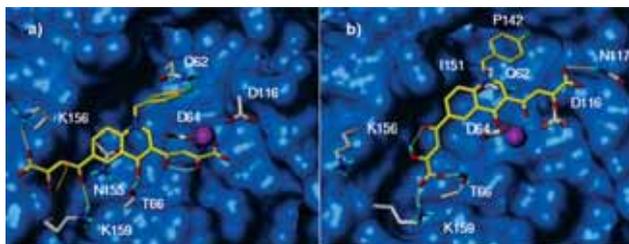


Figure 4. The two predominant binding modes of **8** (yellow) to MD snapshots of the IN core domain. Residues lining the ligand position are highlighted. The metal ion is represented as a magenta sphere.

MD simulation, with the exception of the three loop regions 139–147, 165–172, and 185–196. The former, which we refer to as “catalytic loop” is located close to the active site. Its importance for the catalytic activity together with the flexible nature are well-known.²¹ According to previous MD studies, the catalytic loop moves back and widens the active site region.²² The Mg^{2+} coordination by D64 and D116 residues was always conserved during the production run.

Docking of **8** to the MD snapshots, collected every 100 ps, revealed two predominant binding modes, which are shown in Figure 4. In the binding orientation shown in Figure 4a, the carboxylate group of one diketo acid chain of the ligand chelates the Mg^{2+} metal ion, whereas the other one inserts between residues K156 and K159, forming H-bonds with both side chains and with N155 CO backbone. The *p*-F-benzyl group points toward a hydrophobic pocket formed by the catalytic loop residues Y143, P142, I141, and G140 and by residues I60, Q62, V77, V79, H114, G149, V150, I151, E152, S153, and M154. Particularly, a favorable electrostatic interaction occurs between the fluorine atom on the benzyl ring and the amide group of Q62 residue. The quinoline ring of the molecule forms a stacked amide–aromatic interaction with the N155 side chain, while the quinoline carbonyl oxygen enables a hydrogen bond to the T66 side chain. In our model, T66, S153, and M154, whose mutations were found to confer resistance to DKAs, are all in close proximity of the ligand.⁸

A significant alternative to the described binding mode is given by a docking position in which the metal ion is chelated in a bidentate manner by the quinoline carbonyl oxygen and by one oxygen of the diketo acid function, while the hydroxyl and the carboxylate groups of the same branch contact the D116 and the N117 side chains, respectively (Figure 4b). On the opposite side of the molecule, the other diketo acid arm elongates toward the K156 and K159 residues contacting exclusively the latter amino acid. The *p*-F-benzyl group entirely inserts in the hydrophobic pocket, where it is stabilized by hydrophobic interactions with I151 and P142 side chains. Although the two binding modes differ in some details, it is worth noting that, in both docking solutions, the ligand interacts with the same enzyme attachment points: (i) the metal ion, (ii) the K156 and/or K159 residues, and (iii) the hydrophobic pocket.

The reduced inhibitory potencies of diketo esters **5** and **7** compared to their respective acids **6** and **8** is due to the ability of both carboxylic functionalities to chelate the metal ion and to interact with the above-mentioned lysine residues, whereas the diketo esters weakly bind to these portions of the enzyme.

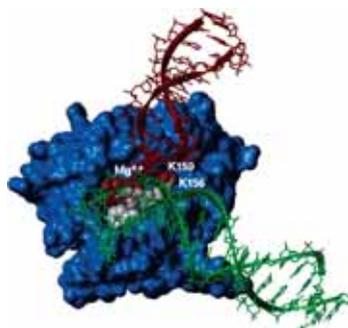


Figure 5. Model of IN CCD–DNA complex with **8** (rendered as CPK) bound to the active site. Donor DNA is in red and acceptor DNA is in green.

Thus, the free carboxylic functions are necessary for a strong interaction with the IN enzyme, particularly the metal ion. On the other hand, the drop in activity of **6** compared to **8** in both ST and 3'-P (see Table 1) can be clearly attributed to the absence of the *p*-F-benzyl moiety, which in our model inserts into the hydrophobic pocket, leading to a more efficient binding.

According to previous findings on BDKAs activity,¹³ **8** is effective on both ST and 3'-P processes catalyzed by HIV-1 IN and in this feature differs from the reported monofunctional DKAs, which are generally found to be selective toward the ST. In this respect, it was hypothesized that BDKAs can bind both DNA acceptor and donor site of HIV-1 IN, being inhibitors of both ST and 3'-P processes, whereas the monofunctional DKAs selectively bind the acceptor site, being effective on ST.¹³ Here, in an effort to gain more insight into the mechanism of action of the reported ligands, a re-evaluation of the above-described docking results was performed with the aid of the theoretical model of HIV-1 IN tetramer complexed with both donor and acceptor DNA developed by McCammon et al.²³ A visual inspection of **8** docked into the CCD–DNA complex (Figure 5) led us to the following considerations: (i) the diketo acid arm, which coordinates the Mg^{2+} metal ion, is clearly important in anchoring the ligand to the catalytic site. It is worth

noting that while this arm seems not to interfere with the donor DNA binding, it may physically hamper the acceptor DNA binding. In our model, either the acceptor DNA or the ligand contact the N117 residue (see Figure 4b). This amino acid plays a crucial role in the enzyme function as its mutation leads to an IN preferentially defective in the ST step of integration.²⁴ (ii) The other diketo acid function, inserting between K156 and K159 residues, would interfere with the donor DNA recognition and binding. This result is in accordance with photo-cross-linking data, which reveal that the above-mentioned lysines are critical for donor DNA binding.²⁵ This could explain the ability of **8** to inhibit the IN catalyzed 3'-P reaction. (iii) The *p*-F-benzyl group, which inserts in the hydrophobic pocket, would reduce the catalytic loop mobility and physically hamper the binding of the acceptor DNA. In the proposed model, both DNA molecules are in proximity of the loop; particularly, the acceptor DNA is in close contact with I151 and P142, which contribute to the ligand binding (Figure 4b). This finding also makes sense with respect to the experimental observation that the benzyl group in DKAs ligands is the primary determinant of the ST inhibition.¹³

Conclusions

We have designed, synthesized, and tested in both enzyme- and cell-based assays novel BDKAs as anti-HIV-1 agents targeted to IN. These compounds are potent inhibitors of both the ST and 3'-P steps and are endowed with antiviral activity. Docking experiments have helped to provide a framework for interpreting the inhibitory activity of our BDKAs. As more information becomes available to better characterize the details of DNA-IN interaction, this issue will be resolved more definitively. Moreover, studies on monofunctional derivatives related to **5-8** are in progress, with the aim to elucidate differences in the mechanisms of action.

Experimental Section

Chemistry. General. Melting points were determined with a Buchi 530 capillary apparatus and are uncorrected. Infrared (IR) spectra were recorded on a Spectrum-one spectrophotometer. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker AC 400 spectrometer. Merck silica gel 60 F₅₄ plates were used for analytical TLC. Column chromatographies were performed on silica gel Merck 70–230 mesh. Concentration of solutions after reactions and extractions involved the use of a rotary evaporator operating at a reduced pressure of approximately 20 Torr. Analytical results agreed to within ±0.40% of the theoretical values.

2-[[4-Acetylphenylamino]methylene]-3-oxobutanoic Acid Ethyl Ester. A mixture of 4-aminoacetophenone (2.0 g, 0.015 mol) and 2-(ethoxymethylene)-3-oxobutanoic acid ethyl ester²⁶ (2.8 g, 0.015 mol) was heated at 120 °C for 5 min. After cooling, the solid that formed was washed with *n*-hexane and with a small amount of cold CHCl₃ to obtain pure 2-[[4-acetylphenylamino]methylene]-3-oxobutanoic acid ethyl ester (3.0 g, 73%), mp 156–158 °C (benzene), which was used in the next reaction without further purification.

3,6-Diacetyl-4(1H)-quinolinone (9). 2-[[4-Acetylphenylamino]methylene]-3-oxobutanoic acid ethyl ester (5.0 g, 0.018 mol) was dissolved in boiling diphenyl ether (50 mL) and refluxed for 50 min. After cooling, the mixture was treated with *n*-hexane (100 mL) and the precipitate that formed was collected and filtered on a short silica gel column (ethyl acetate) and then chloroform/methanol 10:1 as eluent to afford **9** (2.3 g, 56%); mp >300 °C (DMF/water).

3,6-Diacetyl-1-(4-fluorophenylmethyl)-4(1H)-quinolinone (10). A solution of **9** (250 mg, 1.1 mmol) in dry DMF (10 mL) was treated with anhydrous K₂CO₃ (210 mg, 1.5 mmol) and 4-fluorophenylmethyl bromide (610 mg, 3.3 mmol) and the resulting

suspension was stirred for 2.5 h at 100 °C. After cooling, cold water (0–4 °C) was added (40 mL) and the precipitate was filtered, washed with water and light petroleum ether in turn and then dried under an IR lamp to provide **10** (330 mg, 89%); mp 213–214 °C (toluene).

General Procedure for the Synthesis of Diketo Esters 5 and 7. Sodium ethoxide (390 mg, 5.5 mmol) was added into a well-stirred mixture of **9** or **10** (2.7 mmol) and diethyl oxalate (790 mg, 5.4 mmol) in anhydrous THF (2.7 mL) under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred at room temperature (2 h for **5**, 45 min for **7**) and then was poured into *n*-hexane (50 mL). The collected precipitate was vigorously stirred for 30 min in 1 N HCl (50 mL). The yellow solid that formed was filtered, washed with water, and dried under an IR lamp. **5**: 100% yield; mp >300 °C (DMF/water). Anal. (C₂₁H₁₈NO₆) C, H, N, 7: 88% yield; mp 189–190 °C (toluene). Anal. (C₂₅H₂₂FNO₆) C, H, N, F.

General Procedure for the Synthesis of Diketo Acids 6 and 8. A mixture of 1 N NaOH (6.5 mL) and compound **5** or **7** (1.3 mmol) in THF/methanol 1:1 (12 mL) was stirred at room temperature for 18 h and then poured onto crushed ice. The aqueous layer was separated and treated with 1 N HCl until reaching pH 3, and the yellow solid that formed was collected by filtration and then washed with water, hot dry ethanol, and light petroleum ether. **6**: 52% yield; mp >300 °C (washed with hot acetone). Anal. (C₁₇H₁₁NO₆) C, H, N, 8: 77% yield; mp 178–180 °C (washed with hot dry ethanol). Anal. (C₂₅H₁₉FNO₆) C, H, N, F.

Biological Assays. Integrase Assays. Compounds **5-8** were tested for their ability to inhibit HIV-1 integrase *in vitro* using a gel-based assay in addition to a plate-based electrochemiluminescent assay.

In the gel assay, a 5'-end-labeled 21-mer double-stranded DNA oligonucleotide, corresponding to the last 21 bases of the US viral LTR, is used to follow both the 3'-processing and strand transfer steps of the integration reaction (for review, see ref 6). Briefly, a DNA-enzyme complex is preformed by mixing 500 nM of recombinant HIV-1 integrase and 20 nM of 5'-labeled double-stranded DNA template in a buffer containing 50 mM MOPS, pH 7.2, 7.5 mM MnCl₂ or MgCl₂, and 14.3 mM β-mercaptoethanol for 15 min on ice. The integration reaction is then initiated by addition of the drug and continued in a total volume of 10 μL for 60 min at 37 °C. The reaction samples are stopped by adding the same volume of electrophoresis denaturing dye and loaded on 20% 19/1 acrylamide denaturing gel. Gels were exposed overnight and analyzed using a Molecular Dynamics PhosphorImager (Sunnyvale, CA).

The plate-based electrochemiluminescent assay was performed using a BioVeris M-SERIES Analyzer (Gaithersburg, MD). DNA substrates were obtained from BioVeris and used according to the manufacturer's recommendations. Briefly, donor DNA is incubated for 30 min at 37 °C in the presence of 250 nM of recombinant HIV-1 integrase. After addition of the drug, the integration reaction is initiated by addition of target DNA. Reaction is carried out for 60 min at 37 °C and then read on the BioVeris M-SERIES Analyzer.

Anti-HIV Assays in Cultured Cell Lines. The anti-HIV drug testing was performed in 96-well plates with a defined, previously titrated inoculum of a laboratory strain (HTLV-IIIIB) to minimize the inoculum effect.

In brief, all compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide and diluted in cell culture medium at concentrations ranging from 0.1 to 50 μM. Exponentially growing human T lymphocytes (H9 cell line) were added at 5000 cell/well. After the infectivity of a virus stock (HTLV-IIIIB) was quantified, an aliquot containing 1 × 10⁵ 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) per 5000 H9 cells per well is used as inoculum in each set of *in vitro* infections of H9 cells. Uninfected cells with the compound served as a toxicity control, and infected and uninfected cells without the compound served as basic controls. Cultures were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 4 days. Supernatant fluid of infected wells (in the absence of drug and at each of a number of drug concentrations) was harvested. HIV p24 antigen was quantified and the 50%

inhibitory concentration (IC₅₀) of drug was determined using the median effect equation.

Cytotoxicity Assays. The cytotoxicity of test compounds was evaluated on human histiocytic lymphoma (U937) cell line obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Cells were plated in a 96 well-plate at a concentration of 5×10^4 mL in RPMI-1640 without phenol red, supplemented with 20% fetal calf serum and antibiotics. Two hours after plating, compounds were added at different concentrations ranging from 1 μ g/mL to 200 mg/mL, and cells were incubated at 37 °C for 24 h. Then, cells were incubated at 37 °C for 3 h with 1 mg/mL of MTT (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). After incubation, the remaining water-insoluble formazan was solubilized in absolute 2-propanol containing 0.1 N HCl. Absorbance of converted dye was measured in an ELISA plate reader at the wavelength of 570 nm. The cytotoxicity of the compounds was calculated as the percentage reduction of the viable cells compared with the drug-free control culture. The drug concentration required to reduce the cell viability by 50% is called IC₅₀.

Molecular Modeling, Molecular Dynamics (MD) Simulation. The catalytic core domain (CCD) structure of HIV-1 integrase (IN) was taken from PDB structure 1BIS.¹⁷ The chain B of the X-ray structure was chosen for our studies, and a Mg²⁺ ion was placed in the active site between the carboxylate oxygen atoms of amino acid residues D64 and D116 considering the geometry of the Mg²⁺ ion that was present in the subunit A of the PDB structure IQS4.¹⁸ To sample the conformational space of IN enzyme, a 1-ns MD simulation was carried out in explicit solvent. All the water molecules present in the X-ray structure of the enzyme were removed and all hydrogen atoms were added to the residues, considering residues Arg, Lys, Glu, and Asp in their charged form, while all His residues were considered neutral by default. To make the system electroneutral, a total of two neutralizing counterions (Cl⁻) were added with the aid of the program VEGA (v 1.5.0).²⁷ The enzyme was then soaked with a 10 Å water layer. The calculations were carried out with the DISCOVER module of the INSIGHT II program using the CVFF force field.²⁸ A multiple-step procedure was used. The complex was energetically minimized with 5000 steps of a steepest descent minimization, followed by 3000 steps of conjugate gradient minimization to adjust the water molecules and the counterions locally and to eliminate any residual geometrical strain, while the heavy atoms of the enzyme were kept fixed. The minimized solvated system was used as the initial structure for an equilibration stage (100 ps), followed by a production run (1 ns). In the equilibration stage, energy minimization of the protein side chains was achieved by employing 5000 steps of steepest descent and 3000 steps of conjugate gradient algorithm. The system was then heated gradually starting from 10 to 300 K in 5-ps steps and was equilibrated with temperature bath coupling (300 K). During the equilibration and the production run, the backbone of the enzyme secondary structures was kept fixed. A cutoff of 13 Å was used for nonbonded interactions. Coordinates and energies were saved every 10 ps, yielding 100 structures. For the purpose of automatic docking, a snapshot was taken each 100 ps.

Docking Simulations. Docking of **8** to IN CCD was carried out using the AutoDock program package version 3.0.5.²⁹ The LGA algorithm, as implemented in the AutoDock program, applied a protocol with a maximum number of 1.5×10^6 energy evaluations, a mutation rate of 0.01, a crossover rate of 0.80, and an elitism value of 1. For the local search, the pseudo-Solis and Wets algorithm was applied using a maximum of 300 interactions per local search. Fifty independent docking runs in different enzyme MD snapshots were carried out for **8**. Results differing by less than 1.5 Å in positional root-mean-square deviation were clustered together and represented by the result with the most favorable free energy of binding. The obtained complexes were energetically minimized using 3000 steps of steepest descent algorithm, while only the ligand and the side chain atoms of the protein within a radius of 5 Å around the ligand were permitted to relax. The

geometry optimization was carried out employing the DISCOVER program with the CVFF force field.

(1) Ligand Setup. The structure of **8** was generated from the standard fragment library of the SYBYL software version 7.0.²⁹ Geometry optimizations were achieved with the SYBYL/MAXI-MIN2 minimizer by applying the BFGS algorithm³⁰ with a convergence criterion of 0.001 kcal/mol and by employing the TRIPOS force field. Partial atomic charges were assigned using the Gasteiger and Marsilli formalism³¹ as implemented in the SYBYL package. **8** was modeled in its keto–enolic form with the negatively charged carboxylate groups. Six flexible torsions were specified: two around the quinoline ring, two about the benzyl group, and two allowing the hydroxyl groups to rotate.

(2) Protein Setup. The protein structure was set up for docking as follows: the unpolar hydrogens were removed and Kollman united-atom partial charges were assigned. Solvation parameters were added to the protein–DNA complex using the ADDSOL utility of the AutoDock program. The grid maps were calculated with AutoGrid. The grids were chosen to be large enough to include a significant part of the protein around the catalytic site. In all cases, we used grid maps with 6k 6k 6k 61 points with a grid-point spacing of 0.375 Å. The center of the grid was set to be coincident with the Mg²⁺ ion in the active site of catalytic domain.

Acknowledgment. The authors thank Prof. J. Andrew McCammon for the donation of the IN–DNA complex coordinates. We also thank Dr. M. Zancato (University of Padova, Italy) for performing elemental analyses. This project was supported by Ministero della Sanità, Istituto Superiore di Sanità, “Programma Nazionale di ricerca sull’AIDS” (Grant No. 30F.19), Italian MIUR (PRIN 2004), and in part by the Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health.

Supporting Information Available: Spectroscopic data for compounds **5–10**, elemental analyses for derivatives **5–8**, and details of the docking setup and the MD simulation protocol. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Hammer, S. M. Clinical practice. Management of newly diagnosed HIV infection. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1702–1710.
- Cohen, J. Therapies. Confronting the limits of success. *Science* **2002**, *296*, 2320–2324.
- Fesen, M. R.; Kohn, K. W.; Letourte, F.; Pommier, Y. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 2399–2403.
- Cushman, M.; Sherman, P. Inhibition of HIV-1 integration protein by aurintricarboxylic acid monomers, monomer analogs, and polymer fractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *185*, 85–90.
- Carteau, S.; Mouscadet, J.-F.; Goulaouic, H.; Subra, F.; Auclair, C. Inhibitory effect of the polyanionic drug suramin on the in vitro HIV DNA integration reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *305*, 606–610.
- Pommier, Y.; Johnson, A. A.; Marchand, C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 236–248.
- Johnson, A. A.; Marchand, C.; Pommier, Y. HIV-1 integrase inhibitors: A decade of research and two drugs in clinical trial. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 1059–1077.
- Hazuda, D. J.; Felock, P.; Witmer, M.; Wolfe, A.; Stillmock, K.; Grobler, J. A.; Espeseth, A.; Gabryelski, L.; Schleif, W.; Blau, C.; Miller, M. D. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* **2000**, *287*, 646–650.
- Wai, J. S.; Egbertson, M. S.; Payne, L. S.; Fisher, T. E.; Embrey, M. W.; Tran, L. O.; Melamed, J. Y.; Langford, H. M.; Guare, J. P., Jr.; Zhuang, L.; Grey, V. E.; Vacca, J. P.; Holloway, M. K.; Naylor-Olsen, A. M.; Hazuda, D.; Felock, P. J.; Wolfe, A. L.; Stillmock, K. A.; Schleif, W. A.; Gabryelski, L. J.; Young, S. D. 4-Aryl-2,4-dioxobutanoic acid inhibitors of HIV-1 integrase and viral replication in cells. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4923–4926.

- (10) Espeseth, A.; Felock, P.; Wolfe, A.; Witmer, M.; Grobler, J. A.; Anthony, N.; Egbertson, M.; Melamed, J. Y.; Young, S.; Hamill, T.; Cole, J. L.; Hazuda, D. J. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 11244–11249.
- (11) Grobler, J. A.; Stülmsöck, K.; Hu, B.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A. S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J. S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D. J. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 6661–6666.
- (12) Marchand, C.; Johnson, A. A.; Karki, R. G.; Pais, G. C.; Zhang, X.; Cowansage, K.; Patel, T. A.; Nicklaus, M. C.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y. Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase by beta-diketo acids and resistance of the soluble double-mutant (F185K/C200S). *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 600–609.
- (13) Marchand, C.; Zhang, X.; Pais, G. C. G.; Cowansage, K.; Neamati, N.; Burke, T. R., Jr.; Pommier, Y. Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by β -diketo acids. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12596–12603.
- (14) Pais, G. C. G.; Zhang, X.; Marchand, C.; Neamati, N.; Cowansage, K.; Svarovskaia, E. S.; Pathak, V. K.; Tang, Y.; Nicklaus, M.; Pommier, Y.; Burke, T. R., Jr. Structure activity of 3-aryl-1,3-diketo-containing compounds as HIV-1 integrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3184–3194.
- (15) Long, Y.-Q.; Jiang, X.-H.; Dayam, R.; Sanchez, T.; Shoemaker, R.; Sei, S.; Neamati, N. Rational design and synthesis of novel dimeric diketoacid-containing inhibitors of HIV-1 integrase: Implication for binding to two metal ions on the active site of integrase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2561–2573.
- (16) (a) Artico, M.; Di Santo, R.; Costi, R.; Novellino, E.; Greco, G.; Massa, S.; Tramontano, E.; Marongiu, M. E.; De Montis, A.; La Colla, P. Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl-compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3948–3960. (b) Di Santo, R.; Costi, R.; Artico, M.; Tramontano, E.; La Colla, P.; Pani, A. HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in infected cells. Planning synthetic derivatives from natural products. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 195–206. (c) Costi, R.; Di Santo, R.; Artico, M.; Massa, S.; Ragno, R.; Loddo, R.; La Colla, M.; Tramontano, E.; La Colla, P.; Pani, A. 2,6-Bis(3,4,5-trihydroxybenzylidene) derivatives of cyclohexanone: Novel potent HIV-1 integrase inhibitors that prevent HIV-1 multiplication in cell-based assays. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 199–215. (d) Costi, R.; Di Santo, R.; Artico, M.; Roux, A.; Ragno, R.; Massa, S.; Tramontano, E.; La Colla, M.; Loddo, R.; Marongiu, M. E.; Pani, A.; La Colla, P. 6-Aryl-2,4-dioxo-5-hexenoic acids, novel integrase inhibitors active against HIV-1 multiplication in cell-based assays. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1745–1749. (e) Di Santo, R.; Costi, R.; Artico, M.; Ragno, R.; Greco, G.; Novellino, E.; Marchand, C.; Pommier, Y. Design, synthesis and biological evaluation of heterosaryl diketohexenoic and diketobutanoic acids as HIV-1 integrase inhibitors endowed with antiretroviral activity. *II Farmaco* **2005**, *60*, 409–417.
- (17) Goldgur, Y.; Dyda, F.; Hickman, A. B.; Jenkins, T. M.; Cragie, R.; Davies, D. R. Three new structure of the core domain of HIV-1 integrase: An active site that binds magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 9150–9154.
- (18) Goldgur, Y.; Craigie, R.; Cohen, G. H.; Fujiwara, T.; Yoshinaga, T.; Fujishita, T.; Sugimoto, H.; Endo, T.; Murai, H.; Davies, D. R. Structure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 13040–13043.
- (19) Lin, J.-H.; Perryman, A. L.; Schames, J. R.; McCammon, J. A. Computational drug design accommodating receptor flexibility: The relaxed complex scheme. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5632–5633.
- (20) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (21) Greenwald, J.; Le, V.; Butler, S. L.; Bushman, F. D.; Choe, S. The mobility of an HIV-1 integrase active site loop is correlated with catalytic activity. *Biochemistry* **1999**, *38*, 8892–8898.
- (22) Lins, R. D.; Briggs, J. M.; Straatsma, T. P.; Carlson, H. A.; Greenwald, J.; Choe, S.; McCammon, J. A. Molecular dynamics studies on the HIV-1 integrase catalytic domain. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2999–3011.
- (23) Podtelezhnikov, A. A.; Gao, K.; Bushman, F. D.; McCammon, J. A. Modeling HIV-1 integrase complexes based on their hydrodynamic properties. *Biopolymers* **2003**, *68*, 110–120.
- (24) van Gent, D. C.; Groninger, A. A.; Ptasler, R. H. Mutational analysis of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, *20*, 9598–9602.
- (25) Jenkins, T. M.; Esposito, D.; Engelman, A.; Cragie, R. Critical contacts between HIV-1 integrase and viral DNA identified by structure-based analysis and photo-crosslinking. *EMBO J.* **1997**, *16*, 6849–6859.
- (26) Coates, R. M.; Hobbs, S. J. α -Alkoxyallylation of activated carbonyl compounds. A novel variant of the Michael reaction. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 140–152.
- (27) Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. VEGA: A versatile program to convert, handle, and visualize molecular structure on Windows based PCs. *J. Mol. Graph.* **2002**, *21*, 47–49.
- (28) Accelrys, 2001, San Diego, CA.
- (29) SYBYL Molecular Modeling System, TRIPOS Assoc., St. Louis, MO.
- (30) Head, J.; Zerner, M. C. A Broden-Fletcher-Goldfarb-Shanno optimization procedure for molecular geometries. *Chem. Phys. Lett.* **1985**, *122*, 264–274.
- (31) Gasteiger, J.; Marsili, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity—A rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219–3228.

JM0511583

