

Riassunto divulgativo: Leishmania, agente infettivo emergente in Emilia-Romagna: identificazione e sviluppo di nuovi farmaci

La leishmaniosi è una malattia infettiva causata da parassiti appartenenti al genere *Leishmania* e trasmessa all' uomo da piccoli insetti: i pappataci. Negli ultimi anni, probabilmente a causa del *global warming*, il numero dei casi di leishmaniosi è aumentato in Italia settentrionale, area in cui la presenza del parassita in passato era scarsa o nulla. Dal 2013 si è assistito ad una epidemia multi-annuale di leishmaniosi umana in Emilia-Romagna, ed in particolare in provincia di Bologna. Gli aspetti clinici di questa infezione sono molteplici: la leishmaniosi può infatti manifestarsi con lesioni cutanee o con una forma viscerale ad esito letale se non trattata tempestivamente. Tale infezione è più severa in pazienti immunocompromessi, ad esempio pazienti HIV-positivi, per i quali l'identificazione della leishmaniosi è anche più complessa. Trattandosi di una malattia ancora negletta, la leishmaniosi è curata con un numero molto limitato di farmaci, che spesso risultano tossici e di difficile somministrazione. Lo scopo del progetto che la prof.ssa Stefania Varani ha portato avanti insieme ad un team multidisciplinare composto da ricercatori di Microbiologia, Farmacia, Chimica e Malattie Infettive, è stato lo sviluppo di nuovi metodi molecolari per l'identificazione della leishmaniosi e la sintesi di nuovi composti chimici ad attività anti-leishmania. A questo proposito, sono state sintetizzate molecole ispirate a composti provenienti dal mondo vegetale con attività anti-leishmania nota e sono stati identificati composti dotati di una buona potenza inibitoria nei confronti della crescita del parassita. Di alcuni è stato studiato anche il meccanismo di azione, responsabile dell'attività anti-leishmania. Obiettivo a lungo termine del progetto è la realizzazione di nuovi farmaci ad alta efficacia, scarsa tossicità e di facile somministrazione come strumento terapeutico contro la leishmaniosi umana.

Relazione scientifica

Titolo divulgativo: **Leishmania, agente infettivo emergente in Emilia-Romagna: identificazione e sviluppo di nuovi farmaci**

Sottotitolo scientifico: **Leishmania, agente infettivo emergente in Emilia-Romagna: Implicazioni diagnostiche e sviluppo di nuovi farmaci**

Leishmania spp. è un protozoo trasmesso all'uomo da un insetto vettore (flebotomo o pappatacio) che causa infezione nell'uomo e nell'animale. La leishmaniosi umana può manifestarsi con lesioni cutanee o mucose, o con una forma viscerale ad esito letale se non trattata tempestivamente. Negli ultimi anni in Italia sono aumentati i foci di infezione in zone dell'Italia settentrionale precedentemente considerate a bassa endemia o non endemiche. Tra le concause va considerato il *global warming*: a causa del riscaldamento globale infatti questi parassiti e i loro insetti vettore si stanno spostando verso nord, in aree precedentemente considerate non endemiche, tra cui l'Europa centrale e occidentale.

Dal 2013, si è assistito ad un preoccupante aumento di casi di leishmaniosi umana in provincia di Bologna e, più in generale, in Emilia-Romagna, e nel 2017 si sono verificati due casi letali che hanno avuto un'importante eco mediatica. L'epidemia multi-annuale nella regione Emilia-Romagna non accenna ad arrestarsi: nel 2018 sono stati indentificati 42 casi di leishmaniosi viscerale e 36 casi di leishmaniosi cutanea.

Questo progetto si è riproposto di approfondire diversi aspetti legati alla leishmaniosi umana, in particolare sviluppando due obiettivi specifici:

1. Identificazione e monitoraggio dell'infezione da *Leishmania* in pazienti HIV positivi a rischio di sviluppare leishmaniosi severe;
2. Identificazione di nuovi composti *natural-like* che siano biologicamente attivi contro il parassita (*Leishmania*) e scarsamente tossici nei confronti dell'uomo.

Il progetto ha previsto un **team multidisciplinare**. Per lo sviluppo dell'obiettivo 1, la collaborazione si è svolta con le Unità Operative (UO) di Malattie Infettive di Bologna e Ravenna (prof. Calza, dott. Bassi) e con altre UO di Malattie Infettive di Aziende Ospedaliere regionali, mentre l'obiettivo 2 è stato portato avanti in collaborazione con il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie di UNIBO (dr.ssa Belluti) e con il Dipartimento di Chimica "G. Ciamician" di UNIBO (prof. Trombini, prof. Lombardo, dr.ssa Quintavalla). Nuove collaborazioni sono state inoltre create con l'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari, CNR, Roma (dott. Ilari, dott. Colotti).

1. Identificazione e monitoraggio dell'infezione da Leishmania in pazienti HIV-positivi

La diagnosi di leishmaniosi in pazienti immunocompromessi, quali pazienti HIV-positivi, è complicata dal fatto che i metodi sierologici hanno scarsa sensibilità e risultano spesso falsamente negativi. Inoltre, i pazienti HIV-positivi con leishmaniosi vanno spesso incontro a ricadute di questa infezione parassitaria. La ritardata diagnosi di infezione da *Leishmania* e un monitoraggio non adeguato in pazienti HIV-positivi può aggravare un quadro clinico già compromesso associandolo ad un alto tasso di mortalità.

Per questi pazienti è pertanto fondamentale introdurre metodi molecolari nelle fasi di identificazione e follow up dell'infezione da *Leishmania*. Nel corso di questo progetto abbiamo sviluppato metodi di diagnosi molecolare (real-time PCR), includendo un metodo di PCR quantitativa per monitorare la

parassitemia nel tempo. Tale metodo si è mostrato fondamentale nel monitoraggio di due pazienti HIV-positivi con leishmaniosi cronica attiva **(1)**.

2. **Identificazione di nuovi candidati farmaci per il trattamento di leishmaniosi.**

Le terapie attualmente disponibili per la leishmaniosi umana hanno costi elevati e sono associate a tossicità sistemica e a frequente insorgenza di reazioni avverse, particolarmente severe in pazienti immunocompromessi. Lo sviluppo di nuovi farmaci anti-leishmania è ostacolato dagli scarsi incentivi finanziari così come dallo scarso interesse da parte delle grandi industrie farmaceutiche. Per far fronte alle problematiche relative al trattamento di questa infezione, l'attenzione del mondo scientifico (accademico) si è largamente focalizzata sullo studio di composti di origine naturale e composti sintetici ispirati a questi ultimi (*natural-like*). Diversi studi hanno ampiamente comprovato che alcune categorie chimiche quali calconi (es. licocalcone) e endoperossidi (estratti da foglie di *Artemisia annua*, pianta da cui derivano i farmaci anti-malarici attualmente più efficaci), sono caratterizzati da una potente attività anti-leishmania.

Sulla base di queste informazioni fornite dalla letteratura, sono stati sintetizzati nuove serie composti *natural-like* (sia a struttura calconica che endoperossidica, **Figura 1**) caratterizzati da una determinata variabilità chimica, come potenziali agenti ad attività anti-leishmania. Successivamente, è stato valutato se tali composti fossero attivi nei confronti delle forme vitali del parassita mediante test di suscettibilità su forme extracellulari (promastigoti) di *Leishmania*. I composti in grado di inibire efficacemente la replicazione di promastigoti di *Leishmania* sono stati in seguito testati sulla forma intracellulare del parassita (amastigoti). Inoltre, sono stati eseguiti saggi di citossicità, su cellule Vero, al fine valutarne la tossicità su cellule di mammifero e di definirne l'indice di selettività (*selectivity index*, SI). Infine, il confronto tra alcune caratteristiche strutturali peculiari delle numerose molecole sintetizzate e le relative attività biologiche, ha permesso di formulare uno studio di relazione struttura-attività (*structure-activity relationship*, SAR) dal quale si possono ricavare importanti informazioni per sviluppare nuove molecole dotate di un profilo di attività ottimizzato.

In particolare, tra la serie di molecole testate, due calconi (composto 6 e composto 16, **Figura 1A**), hanno mostrato un'importante attività inibitoria della crescita di varie specie di *Leishmania*, tra cui *Leishmania (L.) donovani* (**Tabella 1**); la scarsa tossicità verso le cellule di mammifero traducibile in un indice di selettività ottimale, rende queste molecole potenziali candidati farmaci anti-leishmania **(2)**. Inoltre, per queste molecole è stato individuato il meccanismo d'azione alla base dell'attività ovvero la capacità di inibire efficacemente l'enzima tripanotione reduttasi (TR) specifico del parassita ed assente nell'uomo, risultante in una ridotta capacità del parassita di proteggersi dall'azione nociva di radicali liberi. Infine, la struttura cristallina di TR evidenzia la presenza, nel sito attivo dell'enzima, di due residui aminoacidici di cisteina (Cys52 e Cys57) situati in posizione cruciale per il legame dell'enzima al suo substrato (tripanotione); a supporto dei dati biologici, uno studio di docking ha mostrato come calcone 6 si leghi in maniera energeticamente favorevole al sito attivo dell'enzima, in tal modo confermando l'attività inibitoria (**Figura 2**).

Inoltre, 4 endoperossidi hanno mostrato una buona attività inibitoria su promastigoti ed amastigoti di *L. donovani* (**Figura 1B, Tabella 1**), dimostrando scarsa tossicità per le cellule di mammifero e un buon indice di selettività **(3)**. Lo studio della libreria di endoperossidi sintetizzati ha fornito utili indicazioni per tentare di correlare l'attività biologica delle molecole con la loro struttura molecolare (SAR). In particolare, 3 endoperossidi e i loro corrispondenti tetraidropirani (privi del legame perossidico) hanno inibito in misura simile la crescita di promastigoti e amastigoti di *L. donovani*, suggerendo che il legame perossidico non sia un requisito farmacoforico cruciale per l'attività leishmanicida degli endoperossidi **(4)**. Infine, sia gli endoperossidi che i tetraidropirani in esame hanno indotto un significativo stress ossidativo nei promastigoti di *L. donovani*, confermando l'ipotesi che la scissione del legame O-O non sia necessaria per la generazione di radicali liberi nei promastigoti trattati.

Abbiamo pertanto identificato alcuni composti *lead* a struttura *natural-like* potenzialmente sfruttabili in un'ottica di sviluppo di una terapia anti-leishmania. Tali molecole forniranno la struttura base da ottimizzare attraverso opportune modifiche chimiche, apportate sfruttando le informazioni SAR ottenute, e finalizzate all'identificazione di candidati farmaci. Si auspicano ricadute dei nostri risultati a livello di ricerca farmacologica nel campo dei farmaci anti-leishmania, campo che, vista la scarsità dei farmaci attualmente in uso, richiede un'urgente implementazione. Nello specifico, obiettivo a lungo termine del progetto è la creazione di nuovi candidati farmaci idonei alla somministrazione orale, per ottenere strumenti terapeutici efficaci e sicuri contro la leishmaniosi umana.

Figura 1. Struttura chimica dei composti natural-like in studio. A. Calconi 6 e 16; B. Endoperossidi 1-4.

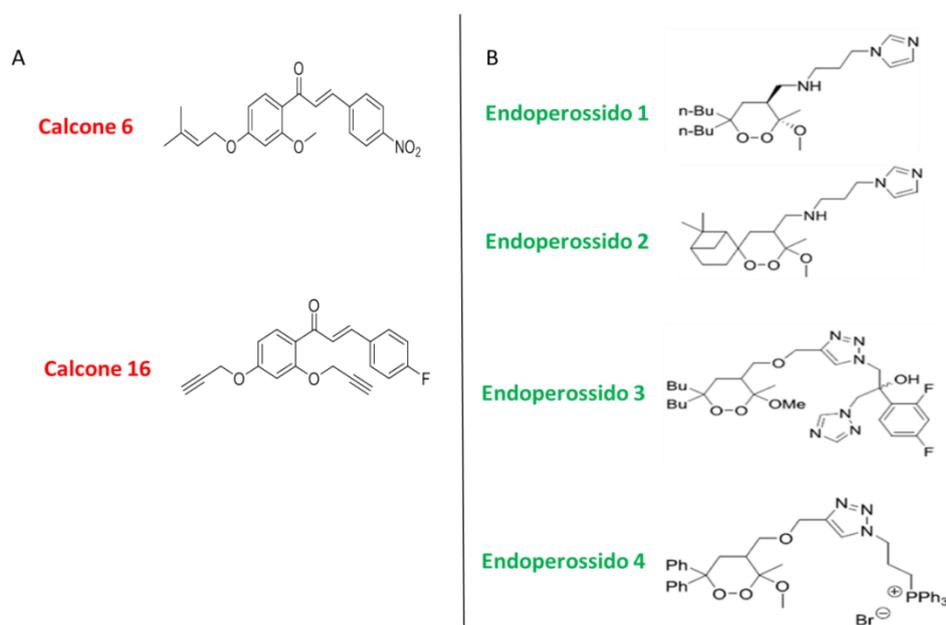


Tabella 1. Attività *in vitro* anti-leishmania dei prodotti *natural-like* in esame.

Composto	Attività anti-promastigoti (IC ₅₀)	Attività anti-amastigoti (IC ₅₀)
Calcone 6	3 μM	14 μM
Calcone 16	12.5 μM	4.5 μM
Endoperossido 1	4 μM	10.3 μM
Endoperossido 2	8 μM	9.7 μM
Endoperossido 3	16 μM	13 μM
Endoperossido 4	11.5 μM	15 μM

I composti in esame sono stati testati verso promastigoti (test di Alamar Blue®) ed amastigoti (studio della percentuale di infezione protozoaria di cellule THP-1) di *L. donovani*. IC₅₀ = concentrazione di composto necessaria ad inibire la crescita del parassita del 50%.

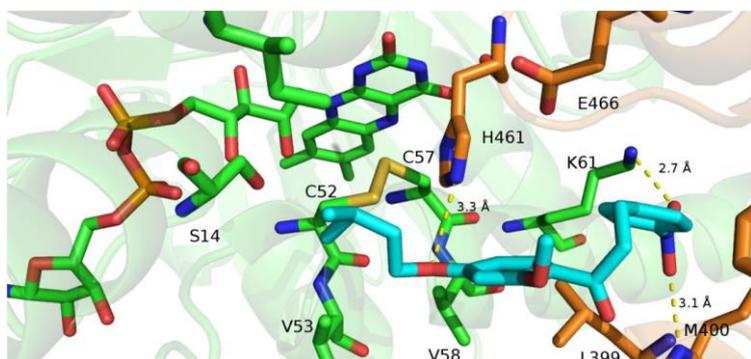


Figura 2. Studio di docking: ingrandimento del complesso calcone 6 (in turchese) e l'enzima TR (in colore verde e arancione). Fotografia ottenuta utilizzando PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.)

Bibliografia

1. Mastroianni A, Gaibani P, Rossini G, Vocale C, Re MC, Ravaglia G, Sambri V, Varani S. Two cases of relapsed HIV-associated visceral leishmaniasis successfully treated with combination therapy. *AIDS Res Ther.* 2018 20;15(1):27.
2. Ortalli M, Ilari A, Colotti G, De Ionna I, Battista T, Bisi A, Gobbi S, Rampa A, Di Martino RMC, Gentilomi GA, Varani S, Belluti F. Identification of Chalcone-based Antileishmanial Agents Targeting Trypanothione Reductase. *Eur J Med Chem* 2018, 152:527-541.
3. Ortalli M, Varani S, Rosso C, Quintavalla A, Lombardo M, Trombini C. Evaluation of synthetic substituted 1,2-dioxanes as novel agents against human leishmaniasis. *Eur J Med Chem* 2019;170:126-140.
4. Ortalli M, Varani S, Cimato G, Veronesi R, Quintavalla A, Lombardo M, Monari M, Trombini C. Is the peroxy group crucial for the anti-leishmanial activity of synthetic endoperoxides? Comparison between 1,2-dioxanes and tetrahydropyrans in *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes. *Manuscript submitted.*