



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA
CICLO XXVI

SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI NUOVI INIBITORI DIRETTI CONTRO LA POLIMERASI DEI VIRUS DELL'INFLUENZA DI TIPO A E B

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Riccardo Manganelli

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Arianna Loregian

Dottorando: Dott. Giulio Nannetti

Indice

Abbreviazioni	6
Sommario	10
Abstract	13
1. Introduzione	16
1.1 <i>Orthomyxoviridae</i> : caratteristiche generali	16
1.1.a Virus influenzali	16
1.2 Virus dell'influenza A	18
1.2.a Struttura ed organizzazione del virione	18
1.2.b Organizzazione del genoma.....	19
1.2.c Ciclo replicativo virale	25
1.3 Il complesso dell'RNA polimerasi virale	32
1.4 Meccanismi di evoluzione del virus dell'influenza.....	39
1.5 Determinanti di patogenicità legati al virus dell'influenza	42
1.6 Epidemiologia e patogenesi delle infezioni da virus dell'influenza.....	43
1.7 Prevenzione, profilassi e terapia delle infezioni da virus dell'influenza.....	44
1.8 Inibitori dell'RNA polimerasi dei virus dell'influenza	48
2. Scopo	54
3. Materiali e Metodi	57
3.1 Composti.....	57
3.2 Proteine e peptidi	57
3.3 Oligonucleotidi sintetici	58
3.4 Plasmidi	58
3.4.a Plasmide pcDNA3	58
3.4.b Plasmide pD15-GST.....	59
3.4.c Plasmide pET28a	59
3.4.d Plasmide pRL-SV40	60
3.5 Cellule.....	61
3.6 Virus	61

3.7 Ceppo batterico e terreni di coltura.....	62
3.8 Trasformazione batterica mediante elettroporazione.....	62
3.8.a Preparazione di batteri elettrocompetenti.....	62
3.8.b Trasformazione mediante elettroporazione.....	63
3.9 Tecniche di biologia molecolare.....	63
3.9.a Estrazione e purificazione di DNA plasmidico da E. coli.....	63
3.9.b Quantificazione degli acidi nucleici.....	64
3.9.c Taglio di DNA con enzimi di restrizione.....	64
3.9.d Mutagenesi sito-specifica.....	64
3.9.e Separazione dei frammenti di DNA con gel d'agarosio.....	65
3.9.f Sequenziamento.....	65
3.10 Espressione e purificazione di proteine di fusione.....	67
3.10.a Espressione e purificazione della proteina di fusione 6His-PA (239-716).....	67
3.10.b Espressione e purificazione della proteina di fusione GST-PB1(1-25).....	68
3.10.c Analisi elettroforetica di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE).....	69
3.10.d Determinazione della concentrazione proteica secondo il metodo di Bradford (BioRad protein assay).....	69
3.11 ELISA.....	70
3.12 Preparazione degli stocks virali.....	70
3.12.a Preparazione degli <i>stock</i> dei virus dell'influenza.....	70
3.12.b Preparazione degli stock di VSV.....	71
3.12.c Preparazione degli <i>stock</i> di HCMV.....	71
3.12.d Preparazione degli <i>stock</i> di AdV.....	72
3.13 Titolazione degli stocks virali.....	72
3.13.a Titolazione degli <i>stock</i> dei virus dell'influenza.....	72
3.13.b Titolazione degli <i>stock</i> di VSV.....	73
3.13.c Titolazione degli <i>stock</i> di HCMV.....	74
3.13.d Titolazione degli <i>stock</i> di AdV.....	74
3.14 Saggi di attività antivirale.....	75
3.14.a Saggi di riduzione delle placche con IAV, IBV.....	75
3.14.b Saggi di riduzione delle placche con VSV.....	76
3.14.c Saggi di riduzione delle placche con HCMV.....	76
3.14.d Saggi di riduzione delle placche con AdV.....	77

3.15 Saggi di riduzione della progenie virale di IAV	77
3.16 Saggi di citotossicità	78
3.17 Saggi <i>minireplicon</i>	78
4. Risultati e discussione.....	82
4.1 Sviluppo di inibitori delle interazioni proteina-proteina tra le subunità PA e PB1	82
4.1.a Background	82
4.2 Sviluppo di analoghi della Hit 10	84
4.2.a Disegno di analoghi della HIT 10	84
4.2.b Caratterizzazione biologica degli analoghi della Hit 10	85
4.2.c Studio dell'effetto di analoghi selezionati della Hit 10 sulla replicazione virale a diversi tempi post-infezione	94
4.2.d Studio dell'effetto di analoghi selezionati della Hit 10 sull'attività della polimerasi virale in saggi di <i>minireplicon</i>	95
4.2.e Effetto antivirale dei più promettenti analoghi della Hit 10 contro un pannello di ceppi di IAV	98
4.2.f Effetto antivirale dei più promettenti analoghi della Hit 10 contro IBV	99
4.3 Sviluppo di analoghi della Hit 5	101
4.3.a Disegno di analoghi della HIT 5	101
4.3.b Analoghi della Hit 5 ottenuti per SAR classica	102
4.3.c Analoghi della Hit 5 ottenuti per Virtual Screening	105
4.3.d Previsioni sulla modalità di legame della Hit 5 e del composto 34	107
4.3.e Disegno degli analoghi del composto 34	110
4.3.f Caratterizzazione biologica degli analoghi del composto 34	110
4.3.g Effetto antivirale dei più promettenti analoghi della Hit 5 contro un pannello di ceppi di IAV	112
4.3.h Effetto antivirale dei più promettenti analoghi della Hit 5 contro ceppi di IBV	114
4.3.i Effetto antivirale dei composti contro altri virus (VSV, AdV e HCMV)	114
4.3.j Ipotesi sulle modalità di legame della Hit 5 e degli analoghi 64 e 70	118
4.4 Sviluppo di analoghi della Hit 31	121
4.4.a Disegno di analoghi della HIT 31	121
4.4.b Caratterizzazione biologica degli analoghi della Hit 31	122

4.4.c Studio dell'effetto del derivato T21 sulla replicazione virale a diversi tempi post-infezione.....	125
4.4.d Studio dell'effetto del composto T21 sull'attività della polimerasi virale in saggi di <i>minireplicon</i>	126
4.4.e Effetto antivirale del composto T21 contro un pannello di ceppi di IAV.....	127
4.4.f Effetto antivirale del composto T21 contro IBV	128
5. Conclusioni	130
6. Bibliografia	135
7. Ringraziamenti.....	157

Abbreviazioni

aa: amminoacido (i)

A: adenina (base)

ADME: Assorbimento Distribuzione Metabolismo ed Escrezione

AdV: Adenovirus

BSA: *Bovine Serum Albumin*, albumina di siero bovino

bp: *base pair*, paio di basi

CC₅₀: *Citotoxicity Concentration 50%*, concentrazione di composto che causa citotossicità sul 50% delle cellule

CRM1: Regione Cromosomica di Mantenimento 1

DMSO: dimetilsolfossido

DNA: *Deoxyribonucleic acid*, acido deossiribonucleico

ddNTPs: *dideoxyriboNucleotide(s) TriPhosphate*, di-deossiribonucleotidi trifosfati (terminatori)

ds/ss RNA: *double/single stranded RNA*, RNA a doppio/singolo filamento

DTT: ditionitrotolo

EC₅₀: *Effective Concentration 50%*, concentrazione richiesta per ridurre del 50% la replicazione virale

EDTA: Acido Etilen-Diammino tetraacetico (disodico)

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

FBS: *Fetal Bovine Serum*, siero fetale bovino

FLAP: *Fingerprint for Ligand And Protein*

Flu: Influenza

G: guanosina (base)

GCV: Ganciclovir

GST: Glutatione-S-Transferasi

HA: emoagglutinina

HCMV: *human citomegalovirus*, Citomegalovirus umano

HCV: *Human C Virus*, Virus dell'epatite umana

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*, Virus dell'Immunodeficienza Umana

HPAI: *Highly Pathogenic Avian Influenza*, Virus dell'Influenza Aviaria Altamente Patogeno

HSV: Herpes simplex virus

IAV: *Influenza A Virus*, Virus dell'Influenza di tipo A

IBV: *Influenza B Virus*, Virus dell'Influenza di tipo B
ICV: *Influenza C Virus*, Virus dell'Influenza di tipo C
IC₅₀: *Inhibitory Concentration 50%*, concentrazione inibitoria del 50%
INF α/β : interferone α e β
IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalattopiranoside
kbp: kilobasi
kDa: kiloDalton
LB: Luria-Bertani
LPAI: *Low Pathogenic Avian Influenza*, Virus dell'Influenza Aviaria Poco Patogeno
MIF: *Molecular Interaction Fields*, Campi d'interazione molecolari
MOI: *Multiplicity Of Infection*, molteplicità di infezione
mRNA: RNA messaggero
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide
M: proteina di matrice
NA: neuraminidasi
NEP: *Nuclear Export Protein*, proteina di esportazione nucleare
NLS: *Nuclear Localization Signal*, segnale di localizzazione nucleare
NP: nucleoproteina
OD: *Optical Density*, densità ottica
O/N: *Overnight*
NEP: *Nuclear Export Protein*, proteina di esportazione nucleare
NS: proteina non strutturale
p.i.: *post infection*, dopo l'infezione
PA: Proteina Acida
PB: Proteina Basica
PBS: *Phosphate Buffer Saline*, tampone fosfato salino
PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reazione a catena della DNA polimerasi
PFU: *Plaque Forming Unit(s)*, unità formanti placca
Pol II: RNA polimerasi cellulare II
PPI: *protein-protein inhibitors*, inibitori dell'interazione proteina-proteina
PRA: *Plaque Reduction Assay*, saggio di riduzione delle placche
P/S: Penicillina/Streptomicina
RBS: *Ribosome Binding Site*, sito di legame ribosomiale
RBV: Ribavirina

RE: Reticolo Endoplasmatico
RdRP: *RNA-dependent RNA polymerase*, RNA Polimersi RNA-dipendente
RNA: *Ribonucleic acid*, acido ribonucleico
RNP: *ribonucleoprotein particle*, particelle ribonucleoproteiche
rpm: *rounds per minute*, giri al minuto
RLU: *Relative Light Units*, Unità relative di luce
RSV: *Respiratory syncytial virus*, virus respiratorio sinciziale
SAR: *Structure-Activity Relationship*
SDS: Sodio Dodecil Solfato
siRNA: *small interference RNA*
snRNA: *small nuclear RNA*, piccolo RNA nucleare
S-OIV: *Swine-Originated Influenza Virus*, Virus dell'influenza originato in suini
T: timidina (base); oppure Temperatura
TAE: Tris-acetato-EDTA
TBHQ: tert-butil idrochinone
TE: Tris-EDTA
TMB: 3,3',5,5' tetrametilbenzidina
Tris: Tris (idrossimetil) amminometano
TP: tri-fosfato
U: Unità
U_L: *Unique long*, (regione) unica lunga
UV: ultravioletto
vRNA: *viral Ribonucleic acid*, acido ribonucleico virale
VSV: *Vesicular Stomatitis Virus*, Virus della Stomatite Vescicolare
wt: *wild-type*, selvatico

Sommario

L'influenza è un'infezione respiratoria, di origine virale, caratterizzata da elevata morbilità e mortalità soprattutto in soggetti ad alto rischio (bambini, anziani, pazienti con malattie croniche/debilitanti, ecc.). I virus influenzali di tipo A (IAV) e di tipo B (IBV), caratterizzata da notevole instabilità genetica e variabilità antigenica, sono la causa di epidemie annuali che colpiscono ogni anno il 15-20% della popolazione mondiale. Inoltre IAV è in grado di infettare una grande varietà di uccelli e mammiferi e come accaduto con il recente caso di influenza suina H1N1, un riassortimento genico tra i segmenti genomici virali di differenti specie può verificarsi e causare anche pandemie. Nel secolo scorso, la pandemia di influenza spagnola (1918), l'influenza asiatica (1957) e l'influenza di Hong Kong (1968), hanno causato effetti devastanti, determinando diverse decine di milioni di morti in tutto il mondo. Per questi motivi IAV e IBV rappresentano una grave minaccia per la salute pubblica ed è assolutamente necessario disporre di agenti terapeutici efficaci contro questi virus.

Le opzioni terapeutiche attualmente disponibili contro l'influenza includono la vaccinazione e due distinte classi di farmaci rappresentati dagli inibitori di neuraminidasi (NA) e dai bloccanti del canale ionico M2. Tuttavia i vaccini devono essere riformulati ogni anno a causa della variabilità genetica del virus e non sono sempre protettivi. Inoltre, la produzione di un nuovo vaccino richiede vari mesi, quindi è del tutto improbabile che la vaccinazione possa essere efficace nell'impedire la diffusione di una pandemia influenzale rapidamente emergente. Oseltamivir (tamiflu) e zanamivir (relenza) fanno parte degli inibitori di neuraminidasi ed agiscono bloccando il rilascio delle particelle virali dalle cellule infettate. Amantadina (symadine, symmetrel) e rimantadina (flumadine) invece vanno a bloccare il canale ionico della proteina M2, prevenendo la transcapsidazione del virus e quindi il rilascio dei segmenti genomici nel citoplasma. Questi farmaci tuttavia presentano numerosi svantaggi, tra cui considerevoli effetti collaterali, efficacia ridotta, notevoli limitazioni nella somministrazione e soprattutto sono associati ad una rapida emergenza di ceppi virali farmaco-resistenti. Di fatto, non esiste ancora una terapia efficace contro l'influenza e questo rende necessario lo sviluppo di nuovi farmaci, possibilmente dotati di un innovativo meccanismo d'azione.

Un interessante bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali è rappresentato dall'RNA polimerasi virale, in quanto è un elemento conservato fra i diversi ceppi virali e non è soggetto a riassortimento genico. L'RNA polimerasi virale è un complesso eterotrimerico, costituito da tre proteine (la proteina acida della polimerasi [PA], la proteina basica 1 della

polimerasi [PB1] e la proteina basica 2 della polimerasi [PB2]). Queste tre subunità interagiscono fisicamente tra di loro e, in particolare, la subunità PB1 interagisce sia con PB2 che con PA, mentre al momento esistono evidenze di un'interazione tra PB2 e PA. E' stato dimostrato che l'interazione PA/PB1 è essenziale per la replicazione del virus: infatti l'inibizione di questa interazione causa l'inibizione della polimerasi virale. Il fatto che l'interfaccia di interazione PA-PB1 sia molto conservata tra differenti ceppi di IAV e IBV e che questo legame sia essenziale per la replicazione virale fa sì che esso rappresenti un potenziale bersaglio per lo sviluppo di nuovi composti anti-influenzali ad ampio spettro. Grazie ad uno *screening in silico* di una libreria di strutture di *small molecules*, condotto dal nostro gruppo di ricerca, sono stati identificati alcuni composti in grado di dissociare l'interazione tra le subunità PB1 e PA della RNA polimerasi del virus dell'influenza *in vitro*, a concentrazioni micromolari (Muratore *et al.*, 2012a). Gli stessi composti non mostravano citotossicità in linee cellulari, ma allo stesso tempo esibivano solo modeste attività antivirali contro IAV. Lo scopo di questo progetto è stato valutare le modalità di interazione di questi composti con il bersaglio e sulla base di queste informazioni disegnare degli analoghi strutturali per aumentarne l'attività antivirale, preservando allo stesso tempo l'assenza di citotossicità ed il peculiare meccanismo d'azione. Una volta sintetizzati, questi analoghi sono stati saggiati in vari esperimenti al fine di valutarne appunto la loro capacità di inibire la replicazione virale di IAV mediante saggi di riduzione delle placche (*plaque reduction assays*, PRA), ma anche determinare il loro effetto inibitorio sull'interazione PA-PB1 in saggi ELISA ed indagare sulla loro eventuale citotossicità su linee cellulare in saggi MTT. In questi saggi, alcuni analoghi si sono messi in luce mostrando delle promettenti attività inibitorie e sono stati selezionati per essere ulteriormente caratterizzati. L'attività dei composti più interessanti è stata confermata mediante *minireplicon assay*, un saggio cellulare che permette di determinare l'effetto delle molecole sull'attività polimerasica di IAV. Tra questi, i composti 70, T22 e T40 hanno mostrato un effetto inibitorio sull'attività polimerasica virale con valori di EC₅₀ comparabili o addirittura minori a quello ottenuto con la ribavirina (RBV), utilizzata come farmaco di riferimento. E' stata poi valutata anche l'attività antivirale di questi analoghi nel tempo; quello che è emerso è che tutti i composti mostravano un massimo di attività alle 12 ore post-infezione (p.i.), senza tuttavia perdere l'effetto antivirale neanche a 48 ore p.i. Inoltre gli analoghi più promettenti erano capaci di inibire la replicazione di un pannello di diversi ceppi di IAV e di IBV, incluso un isolato clinico oseltamivir-resistente, dimostrando così di avere un'attività anti-influenzale ad ampio spettro. Al contrario, gli stessi composti non hanno evidenziato alcun effetto inibitorio sulla replicazione di altri virus a DNA e RNA,

confermando di possedere uno specifico meccanismo d'azione. Infine per alcuni analoghi promettenti sono stati eseguite delle previsioni e delle simulazioni virtuali di interazione con la cavità di PA ed anche studi in cui è stata valutata l'eventuale variazione o meno di attività inibitoria nei confronti del bersaglio di PA mutato in alcuni residui chiave rispetto a quello *wild-type* (*wt*). Questo ci ha permesso di delineare delle relazioni struttura-attività (*structure-activity relationships*, SAR) e di ottenere preziose informazioni riguardo al modo in cui questi inibitori interagiscono con PA, ricavando di conseguenza utili suggerimenti per il disegno di nuovi analoghi caratterizzati da un miglior adattamento alla tasca di legame e da un'attività ancor più potente.

In conclusione, questo studio dimostra le potenzialità di questi composti come inibitori dell'RNA polimerasi dei virus influenzali e nel prossimo futuro saranno saggiati in combinazione con i farmaci anti-influenzali attualmente in commercio per valutare possibili effetti sinergici. Inoltre questo lavoro ha permesso di identificare nuovi *scaffold* dotati di attività antivirale che saranno ulteriormente studiati per sviluppare una nuova generazione di agenti terapeutici capaci di combattere l'infezione da IAV e IBV.

Abstract

Influenza (flu) is an airborne highly-infectious disease, characterized by high morbidity and significant mortality, especially in at-risk population (young children, elderly people, patients with chronic disease). Influenza type A (IAV) and type B (IBV) viruses, characterized by remarkable genetic instability and antigenic variability, are responsible for seasonal epidemics, which affect every year 15-20% of the world population. In addition, IAV is able to infect a wide variety of birds and mammals and as happened with the recent case of H1N1 swine flu, a genetic reassortment between viral genomic segments of different species may occur and cause pandemics. During the past century, the pandemics of Spanish flu (1918), Asian flu (1957) and Hong Kong flu (1968) caused millions of deaths worldwide. For these reasons IAV and IBV pose a large threat to public health and it is absolutely necessary have therapeutic agents effective against these viruses.

The therapeutic options currently available for influenza include vaccination and two distinct classes of anti-influenza drugs represented by the NA inhibitors and the M2 ion channel blockers. However, vaccines need to be reformulated each year due to the genetic variability of the virus and are not always protective. In addition, the production of a new vaccine takes several months, so it is highly unlikely that vaccination may be effective in preventing the spread of a rapidly emerging influenza pandemic. Oseltamivir (tamiflu) and zanamivir (relenza) are NA inhibitors and act by blocking the release of the viral particle from infected cells. Amantadine (symadine, symmetrel) and rimantadine (Flumadine) block the ion channel of the M2 protein, preventing viral uncoating and thus the release of genomic segments in the cytoplasm. These drugs, however, have several drawbacks, including considerable side effects, limited efficacy, significant limitations of administration and above all they are associated with a rapid emergence of drug-resistant viral strains. In fact, there no an effective antiviral therapy against influenza and thus there is a strong need for the development of new anti-influenza compounds, possibly endowed with an innovative mechanism of action.

An interesting target for the development of novel anti-influenza strategies is represented by the viral RNA polymerase; in fact, the influenza virus polymerase is a conserved element among different viral strains, as it is not subjected to genetic variability.

The influenza virus RNA polymerase is a heterocomplex which consists of three proteins (polymerase acid protein [PA], polymerase basic protein 1 [PB1] and polymerase basic protein 1 [PB2]). The three polymerase subunits interact each other, in particular PB1 interacts with PB2 and PA, while at the moment there is little evidence of an interaction

between PB2 and PA. It has been shown that the PA/PB1 interaction is crucial for influenza virus replication: in fact, the inhibition of this interaction result in the inhibition of viral polymerase activity. The fact that the interface of PA-PB1 interaction is highly conserved among different IAV and IBV strains and that this interaction is essential for viral replication makes it a potential target for the development of novel anti-influenza compounds with broad-spectrum activity. Thanks to an *in silico* screening of a virtual library of small molecules, performed by our research group, we have identified a few compounds able to dissociate the interaction between PA and PB1 *in vitro*, at micromolar concentrations (Muratore *et al.*, 2012a). The same compounds showed no cytotoxicity in cell lines, but at the same time exhibited only modest antiviral activities against IAV. The purpose of this project was to evaluate the binding modes of these compounds with the target and based on this information to design structural analogues, in order to increase the antiviral activity, preserving the absence of cytotoxicity and their peculiar mechanism of action. Once synthesized, these analogues have been tested in various experiments, in order to assess their ability to inhibit viral replication of IAV in plaque reduction assays (PRA), but also to determine their inhibitory effect on PA-PB1 interaction in ELISA and to investigate their possible cytotoxicity on cell lines in MTT assays. Among these, the compounds 70, T22 and T40 showed inhibitory effects on viral polymerase activity, with EC₅₀ values comparable or even lower than that obtained with ribavirin (RBV), used as reference drug. Then, we also evaluated the antiviral activity of these analogues over the time; what emerged is that all compounds show a maximum of activity at 12 h post-infection (p.i.), but they still maintain the antiviral effects at 48 h pi. Moreover, the most promising analogues were able to inhibit the replication of a panel of several strains of IAV and IBV, including an oseltamivir-resistant clinical isolate, thus demonstrating to have anti-influenza broad-spectrum activity. In contrast, the same compounds showed no inhibitory effect on the replication of other DNA and RNA viruses, confirming to possess a specific mechanism of action. Finally, for some promising analogues, we made predictions and simulations of virtual interaction with the cavity of PA as well as studies to assess the possible variation of inhibitory activity against mutated PA targets in some key residues as compared to the wild-type (wt) PA. This has allowed us to delineate the structure-activity relationships (SAR) and to understand the binding modes of these inhibitors, obtaining useful suggestions for the design of new analogues characterized by a better fit into the PA cavity and thus a more potent antiviral activity. In conclusion, this study demonstrates the potential of these compounds as inhibitors of influenza virus RNA polymerase, which will be tested in next future in combinations with

current anti-Flu drugs in order to evaluate possible synergistic effects. In addition, this work has led to the identification of a series of new scaffolds endowed with antiviral activity that will be further studied to develop a new generation of therapeutic agents capable to fight the infection by IAV and IBV.

1. Introduzione

1.1 *Orthomyxoviridae*: caratteristiche generali

La famiglia *Orthomyxoviridae* sono virus dotati di *envelope* e di un genoma segmentato ad RNA a singolo filamento (*single stranded RNA*, ssRNA) a polarità negativa (Palese, 2007). Il termine *Orthomyxoviridae* deriva dal greco *orthos* che significa dritto e *myxa* che significa muco. Gli orthomyxovirus comprendono cinque virus patogeni sia per l'uomo che per molti animali.

Appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae* i seguenti virus:

- Virus dell'influenza A
- Virus dell'influenza B
- Virus dell'influenza C
- Thogotovirus
- Isavirus

I primi tre generi rappresentano i virus che provocano l'influenza nei vertebrati (uomo ed altri mammiferi). Gli isovirus infettano i salmoni e i thogotovirus infettano i vertebrati ed alcuni invertebrati come le zanzare e i Copepodi.

1.1.a Virus influenzali

Per quanto riguarda i virus dell'influenza esistono tre generi di virus influenzali: Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C (ICV). Ciascun genere include solo una specie: virus dell'influenza A, virus dell'influenza B e virus dell'influenza C (**Tabella 1**). Questi tre generi sono suddivisi sulla base delle differenze antigeniche nella nucleoproteina (NP) e nella proteina di matrice (M1). A loro volta i virus dell'influenza A sono ulteriormente classificati in sottotipi e sulla base dell'antigenicità delle proteine superficiali emoagglutinina (HA) e NA sono stati identificate 17 diverse HA e 10 NA (Fouchier *et al.*, 2005) che possono presentarsi in diverse combinazioni (**Tabella 1**).

I virus A e C infettano diverse specie (tra cui uomo, suino e uccelli), mentre il virus B infetta quasi esclusivamente l'uomo (**Tabella 1**). I serbatoi naturali dei diversi sottotipi di influenza A sono gli uccelli acquatici migratori dai quali poi l'infezione può essere trasmessa ad uccelli domestici o ad altri animali fino ad arrivare all'uomo. Negli uccelli acquatici sono stati identificati tutti i sottotipi possibili di influenza, nell'uomo, invece, solo alcuni di questi (H1N1, H2N2, H3N2). IAV causa epidemie annuali e pandemie occasionali che si diffondono a livello mondiale causando gravi danni per la salute dell'uomo. IAV verrà trattato nei paragrafi successivi.

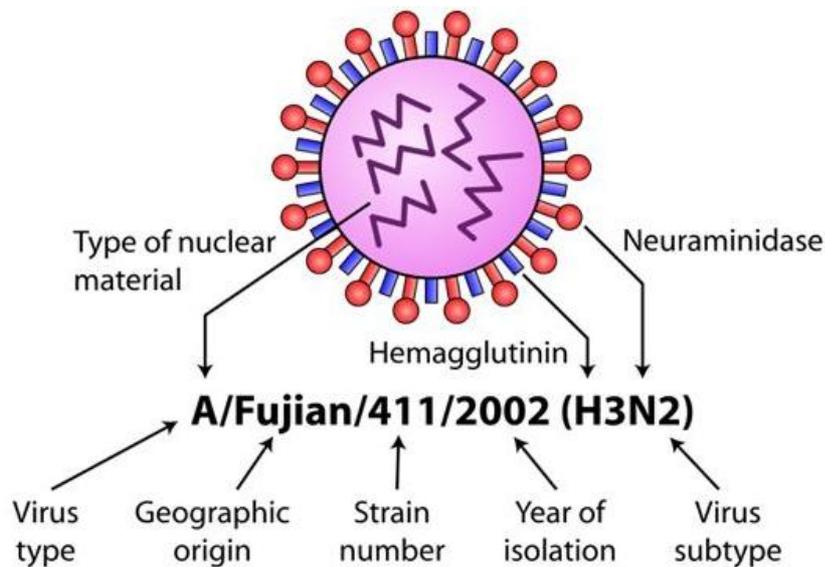
Tabella 1. Classificazione dei virus influenzali.

Genere	Specie	Sottotipo	Ospite
Influenzavirus A	Influenza A virus	H 1-17; N 1-10 (H1N1, H1N2, etc.)	Uomo, suino, volatili, cavallo
Influenzavirus B	Influenza B virus		Uomo, foche
Influenzavirus C	Influenza C virus		Uomo, suino, cani

IBV è quasi esclusivamente un patogeno umano ed è meno comune dell'Influenza A. L'unico animale conosciuto, oltre all'uomo, ad essere colpito dall'influenza B sono le foche. Questo tipo di influenza muta ad un tasso da 2 a 3 volte inferiore rispetto al tipo A e questo causa una diversità genetica inferiore, infatti esiste un solo sottotipo di influenza B. Come risultato di questa scarsa diversità antigenica ogni individuo normalmente acquisisce un certo grado di immunità contro l'influenza B, anche se il virus muta in modo tale da impedire un'immunità permanente. Questo ridotto tasso di cambiamento negli antigeni virali, combinato con la scarsa gamma di ospiti, previene la comparsa di pandemie di IBV (Osterhaus *et al.*, 2000). ICV è capace di infettare l'uomo, i suini ed i cani (Wright & Webster, 2001). Studi epidemiologici hanno dimostrato come il virus dell'influenza C sia distribuito in maniera globale (Wright & Webster, 2001). L'infezione da ICV è esclusivamente asintomatica.

I ceppi influenzali che vengono isolati sono identificati tramite una nomenclatura in cui viene indicato nel seguente ordine: il tipo di virus, la locazione geografica dove è stato isolato per la prima volta, il numero sequenziale di isolamento, l'anno di isolamento e i sottotipi HA e NA per il virus dell'influenza di tipo A. Un esempio di questa nomenclatura è riportato nella **Figura 1**.

Figura 1. Esempio di nomenclatura del virus d'influenza di tipo A.



Nel caso di virus influenzali di tipo B e C, visto che non sono stati identificati sottotipi, la denominazione si limita alla designazione dell'isolato, come di seguito:

B/Malaysia/2506/4

C/Paris/1/67

1.2 Virus dell'influenza A

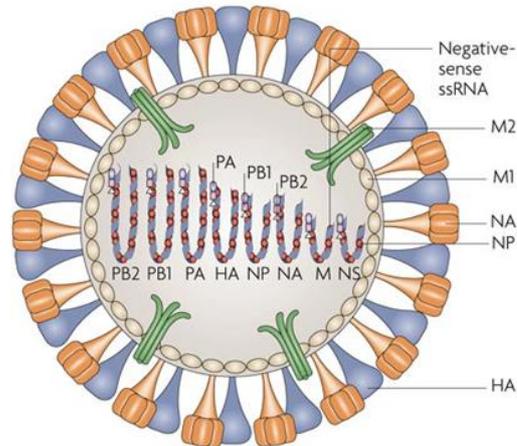
1.2.a Struttura ed organizzazione del virione

La seguente struttura è relativa ai virus dell'influenza A, anche se le altre specie di virus dell'influenza hanno strutture molto simili.

I virioni rilasciati dalle cellule infettate sono generalmente particelle sferiche di diametro 80-120 nm, dalla forma pleomorfa e possono essere allungate o filamentose con diametro di 20 nm e da 200 a 300 nm di lunghezza (Harris *et al.*, 2006). Il virione di IAV, rappresentato in **Figura 2** è costituito da un pericapside lipidico, formato da un doppio foglietto lipidico, che il virus acquisisce durante il processo di gemmazione virale. Sul pericapside sono inserite le due glicoproteine HA e NA, che costituiscono delle protuberanze che sporgono dalla membrana virale, e la proteina M2, una proteina periferica di membrana che costituisce un canale ionico e collega il pericapside con l'interno del virione. Il genoma del virus, che sarà descritto più

avanti (**Paragrafo 1.2.b**), è racchiuso all'interno del capsid virale, caratterizzato dalla tipica forma elicoidale.

Figura 2. Rappresentazione schematica della struttura del virus dell'influenza A (da Nelson & Holmes, 2007).



1.2.b Organizzazione del genoma

I virus dell'influenza A e B hanno un genoma a ssRNA a polarità negativa e costituito da 8 segmenti di diverse dimensioni (13,5 migliaia di basi in totale), mentre quello del virus dell'influenza C è costituito da 7 segmenti di ssRNA.

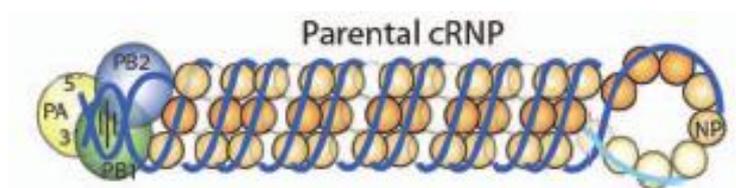
Gli 8 segmenti di RNA del genoma del virus dell'influenza A sono numerati in ordine decrescente in relazione alla lunghezza, che variano tra le 2341 (segmento 1) e le 890 (segmento 8) paia di basi (bp) nel caso del virus dell'influenza A.

Ogni segmento di RNA virale (vRNA) è associato a complessi ribonucleoproteici (RNP). I complessi RNP sono costituiti da RNA virale associato alle NP e al complesso eterotrimerico dell'RNA polimerasi RNA-dipendente che si lega alle estremità conservate 3' e 5' di ogni vRNA. L'RNA polimerasi del virus dell'influenza è responsabile sia della replicazione che della trascrizione virale e utilizza ogni vRNP come template indipendente. Gli RNP, quindi, non l'RNA genomico da solo, sono trascrizionalmente attivi.

Tutti gli 8 segmenti di RNA virale presentano un'organizzazione comune: una lunga regione codificante centrale in antisenso, fiancheggiata da corte sequenze alle estremità 3' e 5' non codificanti conservate che sono parzialmente complementari le une con le altre (Robertson, 1979): i 12 nt al 3' presentano solo una base diversa in metà degli 8 segmenti e i 13 nt al 5' sono completamente conservati. Le estremità complementari hanno un ruolo essenziale nella

regolazione della sintesi del vRNA (Fodor *et al.*, 1995): esse si appaiano in una struttura detta *panhandle* che crea un solco maggiore ed un solco minore proprio come avviene nella doppia elica di DNA (Fodor, 2013). Questo appaiamento permette l'esposizione delle basi dell'RNA rendendole accessibili alla polimerasi (Cheong *et al.*, 1996, Neumann *et al.*, 2004). La polimerasi si associa alle estremità 3' e 5' del vRNA e catalizza la reazione (Klumpp *et al.*, 1997). Ad ogni segmento di vRNA si associano separatamente molecole di NP formando una struttura a bastone (**Figura 3**). Ogni molecola di NP si associa a 20-25 nt di vRNA attraverso il suo scheletro fosfato-zucchero (Compans *et al.*, 1972). La NP possiede un'abilità intrinseca di formare la struttura caratteristica degli RNP anche in assenza del vRNA (Ruigrok & Baudin, 1995) suggerendo che la NP sia il determinante maggiore per la formazione della struttura degli RNP e che l'vRNA si associa a uno *scaffold* di NP. Inoltre, da immagini di microscopia elettronica di RNP isolati è stato dimostrato come una singola molecola di RNA polimerasi sia localizzata all'estremità di ogni RNP (Murti *et al.*, 1988; **Figura 3**), dove si associa con le estremità complementari del vRNA.

Figura 3. Rappresentazione schematica di un RNP. (da Resa-Infante *et al.*, 2011)



Gli otto segmenti che costituiscono il genoma virale dell'influenza A codificano almeno 16 proteine (HA, NA, NP, M1, M2, M42, NS1, NS2, PA, PA-X, PA-N155, PA-N182, PB1, PB1-F2, PB1-N40, PB2). Di questi otto segmenti, quattro codificano un solo polipeptide, il segmento 3 codifica 4 polipeptidi diversi, i segmenti 2 e 7 codificano tre polipeptidi ed il segmento 8 codifica entrambi due polipeptidi. Il segmento 3 codifica PA, PA-X, PA-N155 e PA-N182 (Jagger *et al.*, 2012; Muramoto *et al.*, 2013). Il segmento 2 invece codifica: PB1, la proteina chiamata PB1-F2 (Chen *et al.*, 2001) e PB1-N40 (Wise *et al.*, 2009). Il segmento 7 codifica le due proteine di matrice M1 e M2 ed anche M42 (Wise *et al.*, 2012), mentre il segmento 8 codifica la proteina non-strutturale 1 (NS1) e la proteina di esportazione nucleare (*nuclear export protein*, NEP) detta anche proteina non-strutturale 2 (NS2).

I tre segmenti più grandi (1, 2, 3) codificano le tre subunità (rispettivamente PB2, PB1 e PA) che costituiscono la polimerasi, responsabile della trascrizione e replicazione dell'RNA virale

(vedi **Paragrafo 1.3**). Il segmento 1 codifica la proteina PB2 che è una *cap-binding protein* con attività endonucleasica. Il segmento 2 codifica le proteine PB1 (basic protein 1), PB1-F2 e PB1-N40 e la loro espressione è interdipendente (Wise *et al.*, 2009). La proteina PB1 è il cuore della RNA polimerasi RNA-dipendente. Molti ceppi di influenza A, inoltre, esprimono un piccolo polipeptide, di circa 90 aa, denominato PB1-F2 (Chen *et al.*, 2001) generato da un *reading frame* alternativo (+1) rispetto a quello di PB1 (Chen *et al.*, 2001).

PB1-F2 è una proteina non strutturale, localizzata nei mitocondri e induce apoptosi in alcuni tipi cellulari (Chen *et al.*, 2001; Gibbs *et al.*, 2003). Oltre ad un effetto pro-apoptotico, l'espressione di PB1-F2 è correlata ad un aumento della patogenicità virale e della letalità in modelli animali (Alymova *et al.*, 2011; Zamarin *et al.*, 2006), probabilmente associato alla sua abilità di indurre apoptosi in macrofagi alveolari (Coleman, 2007). Infatti, il knockout di PB1-F2 in IAV comporta una riduzione nella patogenicità e letalità in topi, sebbene non comporti alcuna variazione di effetto sulla replicazione virale in saggi cellulari (Zamarin *et al.*, 2006). Un ulteriore effetto osservato nello stesso studio è quello che i virus con knockout di PB1-F2 erano eliminati più rapidamente dai polmoni e inducevano una risposta immunitaria all'infezione precocemente rispetto ad un virus *wt*, suggerendo così un possibile ruolo di PB1-F2 nella soppressione della risposta immunitaria nell'eliminazione virale (Zamarin *et al.*, 2006).

Il terzo polipeptide derivante dal segmento 2 è PB1-N40, una variante tronca all'N-terminale di PB1, costituita da 39 amminoacidi (aa) ed è generata da una traduzione dell'RNA messaggero di PB1 che parte dal quinto codone AUG (numero 40 dell'RNA messaggero di PB1) ed è *in frame* con il codone di partenza di PB1. L'espressione di questa proteina è stata identificata in diversi ceppi di influenza A, inclusi quelli umani, equini e aviari, con un livello di espressione pari a circa il 5-10% di PB1 (Wise *et al.*, 2009). La mancata espressione di PB1-N40 è stata associata ad una cinetica di replicazione virale più lenta, anche se la funzione di questa proteina è tuttora sconosciuta.

Il segmento 3 codifica la proteina PA, una delle proteine che costituiscono l'eterotrimerico della RNA polimerasi virale (vedi **Paragrafo 1.3**) ed altre tre proteine tronche di PA, quali PA-X, PA-N155 e PA-N182. PA-X è una proteina di 252 amminoacidi, caratterizzata da una porzione C-terminale più corta, originata da un *reading frame* alternativo (+1) rispetto a quello di PA (Jagger *et al.*, 2012). PA-X sembra coinvolta nella regolazione della risposta immunitaria e nella virulenza. Infatti, è stato osservato che PA-X comporta una down-regolazione nell'espressione di geni cellulari mediata dall'RNA polimerasi di tipo II, implicati in vari meccanismi tra cui infiammazione e apoptosi in sistemi cellulari, e riduce la

patogenicità in modelli murini di infezioni con virus influenzali (Jagger *et al.*, 2012). Recentemente sono state identificate anche PA-N155 e PA-N182, che sono entrambe forme tronche N-terminalmente di PA, originate rispettivamente dalla traduzione dell'undicesimo e tredicesimo codone di AUG *in-frame* dell'mRNA di PA (Muramoto *et al.*, 2013). Queste proteine tronche N-terminalmente di PA non mostrano alcuna attività polimerasica quando espresse insieme a PB1 e PB2. Tuttavia è stato osservato che virus mutanti privi di PA-N155 e PA-N182 esibivano una ridotta *fitness* virale e patogenicità rispetto a virus wt in modelli murini (Muramoto *et al.*, 2013). Anche se il loro meccanismo d'azione non è chiaro, entrambe queste proteine sembrano coinvolte in importanti funzioni all'interno del ciclo di replicazione del virus d'influenza.

Il segmento 4 codifica la glicoproteina di superficie emoagglutinina, coinvolta nell'adsorbimento del virus alla cellula da infettare e nella conseguente fusione tra *envelope* virale e membrana cellulare. HA è una glicoproteina di membrana di tipo I costituita da un'ancora transmembrana idrofobica e da una coda citoplasmatica (Russel *et al.*, 2008). HA è la glicoproteina più espressa, infatti, costituisce l'80% delle proteine dell'*envelope* e trimerizza assumendo forma di spicola (diversa nei 16 tipi di HA). Questa proteina viene modificata post-trascrizionalmente: viene aggiunta una catena acilica nelle tre cisteine della coda citoplasmatica e N-glicosilata nelle sette asparagine del dominio extracellulare. HA è costituita da due subunità: una porzione globulare HA1 (328 aa) e una transmembrana HA2 (221 aa), definita anche stelo, legate da un legame disolfuro (**Figura 4**). Le due subunità svolgono ruoli diversi nel processo di entrata del virus nella cellula: HA1 facilita il legame al recettore sulla cellula ospite, l'acido sialico presente terminalmente sulla porzione saccaridica delle glicoproteine o glicolipidi di membrana, mentre HA2 guida la fusione tra il pericapside e la membrana plasmatica della cellula bersaglio. Grazie al riconoscimento da parte della porzione HA1 dell'acido sialico, il virus penetra nella cellula ospite passando per l'endosoma. Il pH acido dell'endosoma induce un cambiamento conformazionale in HA2 che permette al peptide fusogeno di inserirsi nella membrana cellulare (Skehel *et al.*, 1982). Successivamente la porzione C-terminale di HA2 forma una struttura in cui il peptide e l'ancora di membrana di HA si trovano vicine. Questo cambiamento conformazionale permette la fusione tra *envelope* e membrana cellulare (Skehel & Wiley, 2000).

La proteina HA viene inizialmente sintetizzata sotto forma di precursore HA0 (Skehel & Wiley, 2000) incapace di mediare la fusione tra membrane. Il taglio proteolitico del precursore è essenziale per l'infettività virale (Steinhauer, 1999). Questo taglio è un importante fattore di virulenza per il virus ed avviene nella maggior parte dei virus da proteasi

extracellulari in un singolo residuo di arginina (329 di HA) presente all'interno di una regione che collega la subunità HA1 a HA2 (**Figura 5**), mentre in virus avari altamente patogeni, il taglio avviene da proteasi simil-furine intracellulari in residui basici multipli (Gamblin & Skehel, 2010). In quest'ultimo caso, il taglio sarà più efficiente e questo comporta una maggiore virulenza virale (Gamblin & Skehel, 2010). In entrambi i casi, questo taglio è associato ad un cambiamento conformazionale di HA che permette al peptide fusogeno, in seguito alla stimolazione da pH acido, di inserirsi in una cavità conservata formata da residui di HA1 e HA2 (Chen *et al.*, 1998).

Il segmento 5 codifica una proteina basica chiamata NP, costituita da 498 aa nei ceppi di influenza A e da 560 aa nei ceppi di influenza B (Londo *et al.*, 1983). Nonostante questa differenza di residui amminoacidici, la proteina è altamente conservata in virus d'influenza A e B. NP assume una forma di mezzaluna, formata da un dominio testa e un dominio corpo, da cui fuoriesce una coda a *loop* (Das *et al.*, 2010). Tra i due domini c'è una tasca profonda arricchita da diversi residui amminoacidici basici, che svolge la funzione di legare le molecole di RNA in maniera asequenza (Scholtissek & Becht, 1971; Digard *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2013). Infatti, è stato mostrato che la mutazione di diverse arginine nei due *loops* flessibili provocava la drammatica riduzione dell'affinità dell'RNA a NP (Ng *et al.*, 2008). In particolare una NP lega approssimativamente 20-25 nt dell'RNA virale (Compans *et al.*, 1972). Le NP sono coinvolte in diversi legami sia con proteine cellulari, che virali e per questo motivo assumono diversi ruoli nella replicazione virale. La principale funzione di NP è quella di rivestire i vRNA e facilitare la sua corretta architettura all'interno. Per far ciò forma dei complessi oligomerici, ottenuti grazie all'inserimento della coda a *loop* di ciascun monomero sulla NP vicina (Das *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2006). NP è anche coinvolta nella trascrizione e replicazione virale (Beaton & Krug, 1986) ed ancora nel trasporto nucleare dei vRNP e nel traffico citoplasmatico. Il legame con le proteine PB1 e PB2 della polimerasi virale (Biswas *et al.*, 1998) conferisce alle NP la funzione di fattore di processività per la polimerasi (Honda *et al.*, 1988) e può essere mono-ubiquitinata, regolando il processo di replicazione (Liao *et al.*, 2010). Le NP, inoltre, interagiscono con la proteina M1 (Zvonarjev & Ghendon, 1980) durante il processo di esportazione nucleare dei vRNP. Per quanto riguarda invece l'interazione con le proteine cellulari, NP lega l'importina α (O'Neill & Palese, 1995), in quanto contiene un segnale di localizzazione nucleare (NLS; Neumann *et al.*, 1997); l'actina F (Digard *et al.*, 1999); la regione cromosomica di mantenimento 1 (CRM1) (Elton *et al.*, 2001), per l'esportazione dal nucleo dei vRNP di nuova sintesi, e UAP56, un

fattore di *splicing* coinvolto nella formazione dello spliceosoma e nell'esporto nucleare dell'RNA messaggero (mRNA; Momose *et al.*, 2001).

Il segmento 6 codifica la NA, una glicoproteina inserita nel pericapside virale sotto forma di omotetramero ed al centro di ogni subunità è presente il sito attivo dell'enzima. Ogni monomero è composto da una coda citoplasmatica corrispondente alla regione N-terminale, un dominio trans-membrana, una regione stelo e una testa globulare (Gamblin & Skehel, 2010). NA è in grado di tagliare l'acido sialico terminale delle glicoproteine virali e dei recettori cellulari. In questo modo permette il distacco del virus dalle cellule infettate e l'eliminazione dell'acido sialico dalle proteine virioniche ne previene l'agglutinazione, favorendone la diffusione (Gamblin & Skehel, 2010). Un'altra funzione di NA è quella di permettere la penetrazione del virus attraverso secrezioni mucosali, degradando il muco e consentendo al virus di accedere alla cellula bersaglio (Matrosovich *et al.*, 2004).

Il segmento 7 codifica le proteine di matrice M1 e M2 ed anche M42 che rappresenta una variante di M2 da poco identificata (Wise *et al.*, 2012). La proteina M1 è la proteina più abbondante nella particella virale, è una proteina interna al virione che ricopre la superficie interna dell'*envelope* ed è implicata nell'assemblaggio dei virioni di nuova sintesi. M1 forma dimeri e multimeri (Zhao *et al.*, 1998); l'interazione M1-M1 è importante nel *budding* virale. M1 media il legame con vRNP durante il trasporto di questi all'interno della cellula. La proteina M2 è una proteina transmembrana di tipo III che tetramerizza. Il dominio transmembrana di M2 forma un canale che agisce come canale ionico selettivo (Pinto *et al.*, 1992). M2 è attivato in risposta al pH acido dell'endosoma e crea un flusso di protoni dall'endosoma al core virale. Questa funzione di M2 è importante nelle prime fasi dell'infezione in quanto provoca l'abbassamento di pH che permette il cambiamento conformazionale di HA, promuovendone il processo di fusione (Pinto *et al.*, 1992); inoltre M2 è implicata nel rilascio dei nuovi virioni.

Recentemente Wise *et al.*, hanno dimostrato l'espressione in IAV di una nuova variante di M2 con un alternativo ectodominio, la proteina M42 (Wise *et al.*, 2012). Questo ectodominio alterato di M42 comporta una diversa localizzazione intracellulare rispetto a M2. Infatti, a differenza di M2 che solitamente è localizzata sulla membrana plasmatica, M42 è associata in prevalenza al Golgi (Wise *et al.*, 2012). Malgrado una diversa localizzazione intracellulare, M42 può funzionalmente sostituire M2 e permette lo stesso un'efficiente replicazione virale in colture cellulari e in topi (Wise *et al.*, 2012).

Il segmento 8 codifica due proteine: la proteina NS1 e la proteina NEP (Lamb *et al.*, 1980). La proteina NS1 è una proteina multifunzionale, composta da due domini: N-terminale

(residui 1-70) e C-terminale (residui 86-230/237). Il dominio N-terminale esiste in forma omodimerica ed in questo modo è in grado di legare il doppio filamento di RNA (*double-strand* RNA, dsRNA) in maniera aspecifica. In questo modo previene il dsRNA dal riconoscimento da parte di molecole sentinella dell'infezione virale ed impedisce la conseguente sintesi dell'interferone α e β (INF α/β ; Das *et al.*, 2010). Il dominio C-terminale, conosciuto anche come dominio effetore, lega diverse proteine cellulari, svolgendo anch'esso un importante ruolo nel blocco della risposta cellulare al virus (Das *et al.*, 2010). Infatti, è in grado di legare la proteina CPSF30, impedendogli di svolgere il normale processamento dei pre-mRN cellulari (Das *et al.*, 2010). Inoltre è in grado di bloccare diverse *pathway* cellulari, causando l'inibizione della sintesi proteica cellulare, potenziando la replicazione virale (Bergmann *et al.*, 2000).

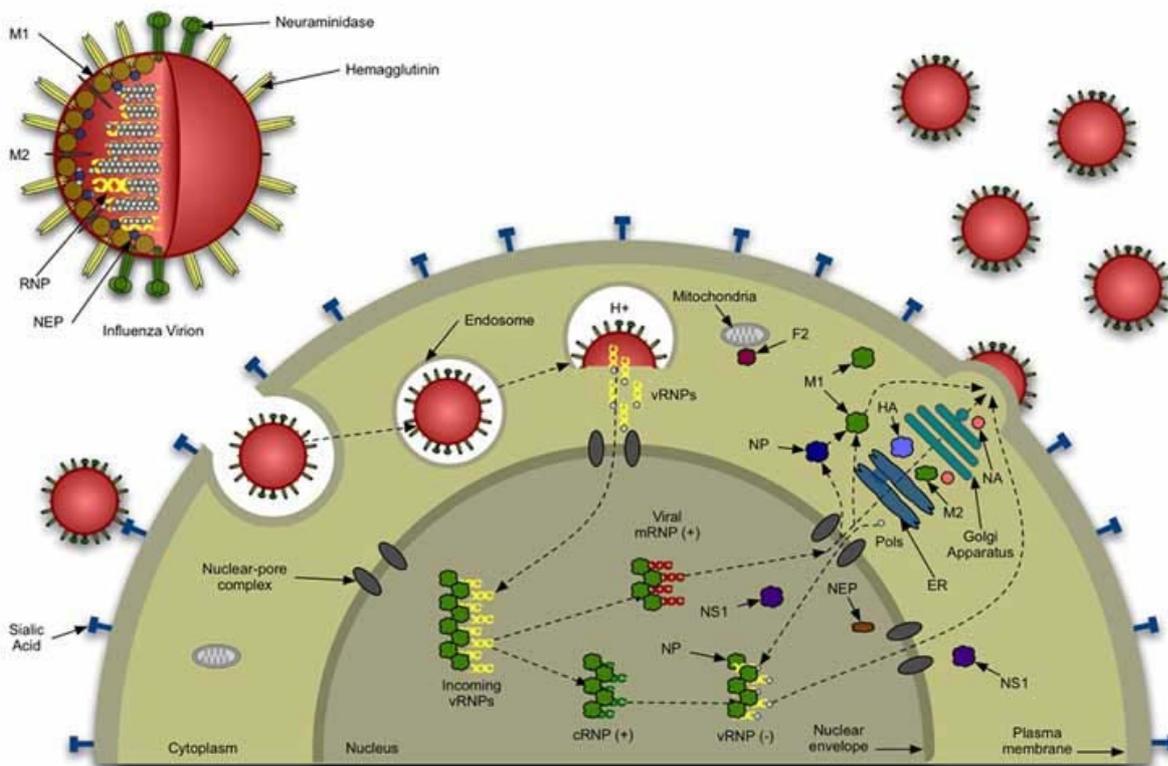
NS2 è un proteina di 121 amminoacidi che può essere suddivisa in un dominio N-terminale (residui 1-53) proteasi sensibile e un dominio C-terminale (residui 54-121) proteasi resistente, di cui è stata risolta la struttura cristallografica. Nonostante non ci siano ancora informazioni disponibili del dominio N-Terminale ci sono forti evidenze che contenga al suo interno la sequenza di esporto nucleare (nuclear export sequence; NES; Paterson & Fodor, 2012). NS2 è anche conosciuta di NEP ed è implicata nel mediare l'esportazione di vRNPs dal nucleo, garantendo che i segmenti genomici virali siano disponibili per essere incorporati all'interno della progenie virale (Boulo *et al.*, 2007). Oltre a questo NEP sembra svolgere altre importanti funzioni durante la replicazione del virus. Infatti, è stato dimostrato che contribuisce al processo di gemmazione virale, interagendo e modulando l'attività di una ATPasi cellulare (Paterson & Fodor, 2012). Inoltre NS2 sembra aumentare la produzione di vRNPs genomico (Paterson & Fodor, 2012).

1.2.c Ciclo replicativo virale

L'entrata del virus nella cellula ospite è mediata dalla glicoproteina di superficie HA che si lega al suo recettore, l'acido sialico presente sulla superficie della membrana cellulare (Skehel & Wiley, 2000; **Figura 4**). L'acido sialico può essere legato al galattosio in conformazione α (2-3) o α (2-6). Questi legami sono estremamente importanti nel determinare la specie-specificità di legame di un particolare ceppo di influenza. I virus che infettano l'uomo riconoscono, infatti, l'acido sialico con legame α (2-6), mentre quelli che infettano gli uccelli identificano l'acido sialico con legame α (2-3). I virus in grado di infettare i maiali riconoscono entrambi i tipi di acido sialico (Skehel & Wiley, 2000). In seguito al legame HA-

acido sialico, il virus entra nella cellula ospite per endocitosi mediata da recettore e viene internalizzato in vescicole endosomiali rivestite di clatrina. Dopo l'internalizzazione, il rivestimento di clatrina viene rimosso e le vescicole si fondono con gli endosomi primari, per poi proseguire con quelli tardivi. Il pH acido dell'endosoma tardivo (pH 5/6) permette la fusione tra membrana virale ed endosoma, in quanto induce il cambiamento conformazionale di HA, che espone il peptide di fusione. Questo peptide si inserisce nella membrana endosomiale facendo in modo che membrana virale e endosomiale siano in contatto tra di loro. L'ambiente acido dell'endosoma, inoltre, fa sì che si aprano i canali ionici M2. L'apertura del canale ionico M2 permette ai protoni di entrare acidificando il core virale. Il pH acido permette alla proteina M1 di cambiare conformazione, causando la rottura dell'interazione tra M1-vRNP e quindi il rilascio dei vRNP da M1. I vRNP sono così rilasciati nel citoplasma cellulare e trasportati nel nucleo (Sidorenko & Reichi, 2003). Non è chiaro se i vRNP sono trasportati tutti allo stesso momento oppure uno per uno. Tuttavia in questo importo nucleare importante il ruolo del complesso polimerasico, poiché tutte le tre subunità (PA, PB1 e PB2) e NP contengono delle NLS.

Figura 4. Rappresentazione schematica del ciclo di replicazione virale.



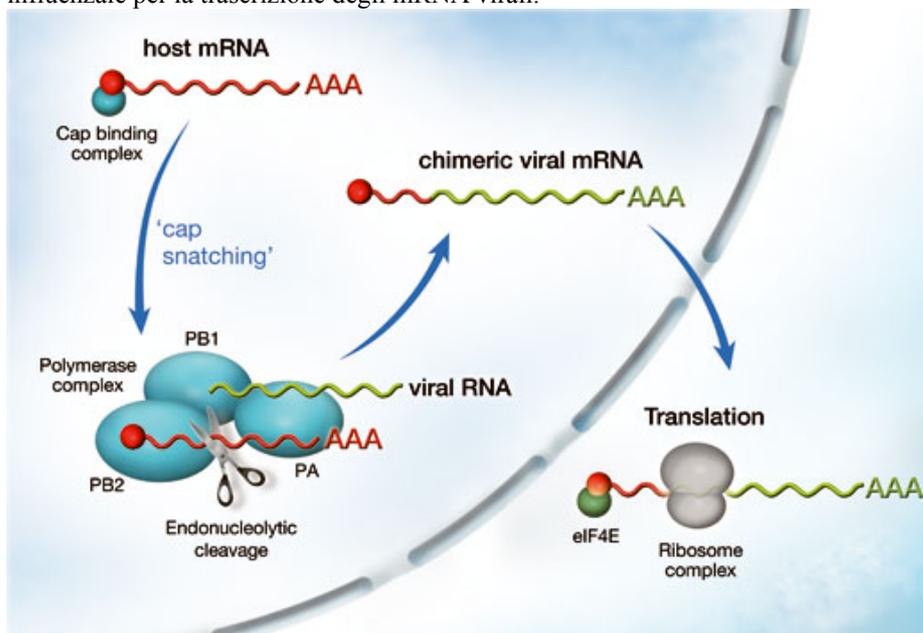
L'importo al nucleo avviene grazie alla via cellulare proteina-dipendente della CRM1 attraverso legame con le importine α e β coinvolte nell'importo nucleare. In particolare, le

proteine PA e PB1 interagiscono formando un complesso nel citoplasma e successivamente traslocano nel nucleo dove si associano a PB2 (Nieto *et al.*, 1994).

Una volta nel nucleo avviene il processo di replicazione e trascrizione virale del vRNA e sono sintetizzati tre diversi tipi di RNA: l'mRNA a polarità positiva, l'RNA complementare (cRNA) a polarità positiva e l'RNA virale (vRNA) a polarità negativa (Jackson *et al.*, 1982).

La sintesi dell'mRNA è diretta dalla polimerasi virale e ha luogo durante le fasi iniziali dell'infezione. La trascrizione è *primer*-dipendente. L'innescio per la sintesi dell'mRNA è costituito dal cap 5' 7-metil-guanosina (m⁷G) del pre-mRNA cellulare. Gli mRNA cellulari infatti sono dotati di cap metilato al 5' e coda di poly (A) al 3', mentre il genoma virale è privo del cap al 5' (Plotch *et al.*, 1978). Il riconoscimento e il legame di questa struttura cellulare avviene nel citoplasma ad opera della subunità PB2, prima del suo importo nel nucleo. Il taglio del cap dal pre-mRNA cellulare viene effettuato invece dall'endonucleasi PA che genera frammenti di 10-15 ribonucleotidi. Questi oligomeri vengono quindi utilizzati come inneschi per la trascrizione degli mRNA virali (Krug *et al.*, 1979). Tale meccanismo è chiamato *cap-snatching* ed è caratteristico dei virus a polarità negativa appartenenti alle famiglie *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* e *Arenaviridae* (Guilligay *et al.*, 2014; Hopkins & Cherry, 2013; **Figura 5**).

Figura 5. Rappresentazione del meccanismo di cap-snatching svolto dal complesso dell'RNA polimerasi influenzale per la trascrizione degli mRNA virali.



Anche se non è noto il momento esatto in cui avviene questo meccanismo, quello che si sa è che la polimerasi predilige il legame con l'RNA polimerasi cellulare II (Pol II) fosforilata in

posizione 5'. Questa fosforilazione avviene durante l'inizio della trascrizione, nel momento in cui si attiva la sintesi del complesso del cap cellulare (Engelhardt *et al.*, 2005).

Anche la terminazione della trascrizione avviene ad opera della polimerasi virale, la quale rimane legata al 5' del template a causa della formazione della struttura *panhandle* assunta dal vRNA stesso (Fodor *et al.*, 1994) e aggiunge un segnale di poli-adenilazione (poly-A) al 3' grazie ad un segnale oligo-U (da 5 a 7 U) che si trova 16 nucleotidi a valle del 5' terminale (Robertson *et al.*, 1981). Il meccanismo di trascrizione del virus dell'influenza differisce da quello dei virus a RNA a polarità negativa non segmentati sia nel processo che riguarda il cap al 5' che nella poli-adenilazione al 3' (Moeller *et al.*, 2012).

Il virus dell'influenza sfrutta il macchinario di *splicing* dell'ospite per generare le proteine M2 e NS2, che vengono prodotte in quantità minori rispetto alle proteine che non necessitano di *splicing* M1 e NS1 (Amorim & Digard, 2006). Per poter utilizzare il macchinario di *splicing* della cellula ospite, il virus è in grado di inibire lo *splicing* dell'mRNA cellulare (Engelhardt & Fodor, 2006): la proteina NS1 lega U6, un piccolo RNA nucleare (*small nuclear RNA*, snRNA; Lu *et al.*, 1994), e altri componenti del macchinario di *splicing* causandone la rilocalizzazione nel nucleo della cellula infettata (Fortes *et al.*, 1995). La proteina NP, invece, interagisce con UAP56, un fattore di *splicing* coinvolto nella formazione dello spliceosoma e nell'esporto nucleare dell'mRNA (Momose *et al.*, 2001). L'mRNA viene successivamente esportato dal nucleo al citoplasma passando attraverso i pori nucleari.

Lo *switch* tra trascrizione e replicazione è diretto dalle NP, in quanto esse sono in grado di promuovere l'inizio della trascrizione e bloccare la sintesi del mRNA virale, nonché sono fondamentali per il processo di replicazione (Newcomb *et al.*, 2008). La replicazione del genoma virale avviene in fasi successive alla trascrizione ed è *primer*-indipendente. Le estremità 5' e 3' del genoma sono complementari e invertite e quindi in grado di interagire tra di loro formando una struttura detta *panhandle* (Luo *et al.*, 1991). La replicazione del genoma virale (cRNA e vRNA) richiede la formazione del complesso *panhandle* (Luo *et al.*, 1991) e la presenza delle subunità PB1 e PA della polimerasi che legano l'estremità 5' del vRNA o cRNA (Poon *et al.*, 1998). La proteina PA aumenta l'affinità di PB1 per il 5' vRNA agendo da fattore di elongazione (Fodor *et al.*, 2003). La sintesi *de novo* del vRNA richiede che venga prima sintetizzato l'RNA complementare (cRNA) che funge da template *full-length* per la produzione della progenie del vRNA (Lee *et al.*, 2002). Di recente è stato dimostrato che la replicazione del genoma virale coinvolge più di un complesso della polimerasi in grado di agire *in trans* (Jorba *et al.*, 2009). A differenza del vRNA, il cRNA non ha il poly(A) al 3' né il cap al 5'.

La sintesi delle proteine virali avviene nel citoplasma cellulare grazie ai ribosomi (polisomi). Il virus sfrutta il macchinario traduzionale dell'ospite, infatti, la velocità di produzione delle proteine cellulari diminuisce nel momento in cui ha inizio l'infezione virale. La polimerasi, le proteine di matrice e le proteine non strutturali di nuova sintesi sono trasportate al nucleo dove avvengono trascrizione e replicazione ad opera della polimerasi e *splicing* delle proteine M e NS. Varie teorie sono state proposte su come le singole subunità dell'RNA polimerasi venissero importate nel nucleo ed assemblarsi per formare il complesso trimerico (riviste in Hutchinson & Fodor, 2012). Tuttavia molti studi sono concordi nell'affermare che PA e PB1 formano un complesso dimerico nel citoplasma, per essere poi importate nel nucleo grazie all'associazione di PB1 con Ran binding protein 5 (RanBP5), un membro della famiglia dell'importina β (Deng *et al.*, 2006; Hutchinson *et al.*, 2011). Al contrario, PB2 è importato separatamente attraverso la *pathway* classica delle importine α/β per unirsi al dimero PA-PB1 solo nel nucleo (Fodor, 2013). Le proteine dell'*envelope* (M2, HA e NA) vengono sintetizzate nei ribosomi del RE, inserite nella membrana del RE, glicosilate e trasportate al Golgi. La proteina M2 forma un canale protonico che previene l'acidificazione del Golgi e di altre vescicole impedendo il cambiamento conformazionale e l'inattivazione di HA. Successivamente vengono trasportate alla membrana della cellula ospite (Sidorenko & Reich, 2003).

Le nuove particelle ribonucleoproteiche vengono quindi sintetizzate nel nucleo cellulare e successivamente esportate nel citoplasma passando attraverso i pori nucleari grazie alla via Crm1-dipendente (Elton *et al.*, 2001), alle proteine virali M1 (Bui *et al.*, 1996; Bui *et al.*, 2000), a NS2 (Paterson & Fodor, 2012) e alle NP. La proteina M1 lega, infatti, i vRNP attraverso la porzione C-terminale, formando il complesso M1-vRNP (Baudin *et al.*, 2001), e ne catalizza l'esporto dal nucleo al citoplasma diretto dalla proteina NS2 e dalle NP contenenti un segnale NES. La porzione N-terminale di M1 contiene un NLS. Per l'esportazione dal nucleo, M1 lega la NS2 attraverso l'N-terminale mascherando l'NLS, e NEP media il legame Ran GTP-dipendente con la proteina cellulare CRM1 permettendo l'esporto dei vRNP (Boulo *et al.*, 2007). Recentemente è stato osservato anche un'associazione tra NEP e l'RNA polimerasi e pare che questo complesso potenzi il meccanismo dell'esporto nucleare dei vRNP (Manz *et al.*, 2012), anche se non è escluso che NEP possa agire indipendentemente dal complesso polimerasico (Elton *et al.*, 2001). È stato proposto che ci siano due diverse classi di vRNP: una coinvolta attivamente nella trascrizione e replicazione, che non viene esportata dal nucleo, e una che rimane trascrizionalmente inattiva e che viene esportata dal

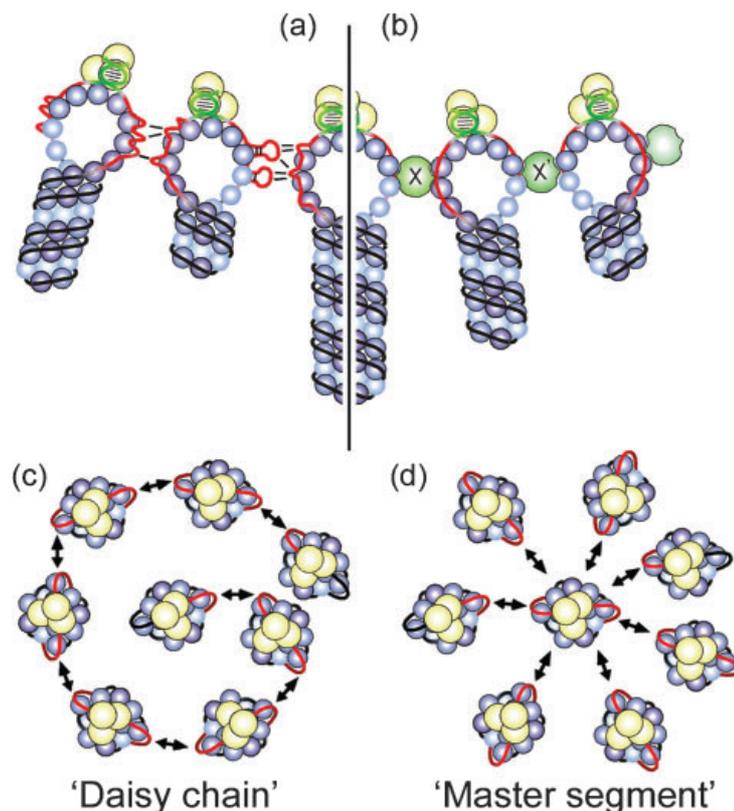
nucleo per essere incorporata nei nuovi virioni. Probabilmente è il legame di M1 con i vRNP che li rende trascrizionalmente inattivi (Hankins *et al.*, 1990).

La proteina M1, inoltre, inibisce il reimporto al nucleo dei vRNP. Il complesso vRNP-M1 viene trasportato al sito di gemmazione intracellularmente grazie all'interazione con le componenti citoscheletriche, in particolare i microfilamenti, mentre le proteine transmembrana HA, NA e M2 vengono trasportate sulla membrana plasmatica apicale mediante la via standard di esocitosi cellulare (Wandinger-Ness *et al.*, 1990). La posizione di M1 nella struttura virale implica che M1 formi un ponte tra *envelope* e vRNP e che interagisca con le proteine virali M2, HA e NA poste sulla membrana plasmatica permettendo l'impacchettamento delle particelle virali (McCown & Pekosz, 2005). Le glicoproteine virali quindi determinano il sito di assemblaggio e di *budding* del virus dato che esse contengono segnali apicali o basolaterali e sono dirette verso uno specifico sito dove il virus si assembla e gemma in cellule epiteliali polarizzate. Infatti, le glicoproteine HA e NA, insieme ad altre proteine cellulari responsabili della formazione della vescicola, vanno a posizionarsi in specifici domini della membrana cellulare che sono considerati i siti da cui inizia il processo di gemmazione (Takeda *et al.*, 2010). Questi domini sono chiamati *lipid rafts* e sono microdomini dinamici della membrana cellulare caratterizzati da un'elevata percentuale di colesterolo, sfingolipidi e fosfolipidi, contenenti acidi grassi saturi. Questa composizione rende questi siti estremamente flessibili (Takeda *et al.*, 2010). La gemmazione richiede la presenza di proteine cellulari che sono richiamate da M1. L'elica 6 (H6) di M1, infatti, possiede un dominio L implicato nel richiamo di queste proteine, anche se non è ancora noto quali proteine interagiscano con il dominio L (Hui *et al.*, 2006).

La segmentazione del genoma del virus aumenta la complessità del processo di assemblaggio del virione. Il modo in cui avviene l'impacchettamento del genoma virale è ancora motivo di discussione. Esistono due modelli maggiormente accreditati chiamati *random model* e *specific packaging model*. Il *random model* prevede un meccanismo che distingue genoma virale da RNA cellulare e RNA virale non-genomico in modo che solo il genoma virale venga incorporato nei virioni. Questo processo però non permette di distinguere i diversi segmenti virali, per cui potrà verificarsi che in uno stesso virione siano presenti due segmenti uguali (Compans *et al.*, 1970). Il secondo modello, *specific packaging model*, invece, è un meccanismo che assicura che sia presente una sola copia di ciascun segmento per virione in quanto durante l'assemblaggio ogni segmento viene selezionato in maniera specifica (Kingsbury, 1970). Le sequenze UTR conservate di ciascun segmento contengono un segnale di *packaging* generale bipartito; questo segnale potrebbe essere importante per entrambi i

modelli: nel primo in quanto permetterebbe di distinguere l'RNA genomico virale dal non-genomico o da quello cellulare; nel secondo di distinguere i diversi segmenti di RNA virale. Anche come avvenga l'interazione degli RNP è oggetto di speculazione. I diversi RNP potrebbero interagire tra di loro attraverso interazione diretta RNA-RNA (**Figura 6a**; Fujii *et al.*, 2003) o attraverso proteine non identificate che fungono da ponte tra i due (**Figura 6b**; Brodersen *et al.*, 2002). Inoltre gli 8 RNP interagiscono tra di loro utilizzando il minor numero di interazioni possibili prima di essere impacchettati nel virione; questa interazione potrebbe avvenire in due modi diversi. Il primo modo, chiamato *daisy chain*, prevede l'interazione di un RNP con due diversi RNP (**Figura 6c**); il secondo, detto *master segment*, invece, prevede che un RNP interagisca con tutti gli altri (**Figura 6d**); i segmenti più accreditati per costituire il *master segment* sono i segmenti 1 e 7.

Figura 6. Modello delle possibili interazioni tra RNP nel processo di impacchettamento delle particelle virali: **a**) interazione diretta RNA-RNA tra sequenze di impacchettamento; **b**) interazione mediata da proteine non identificate; **c, d**) possibile organizzazione del complesso genomico (da Hutchinson *et al.*, 2010).



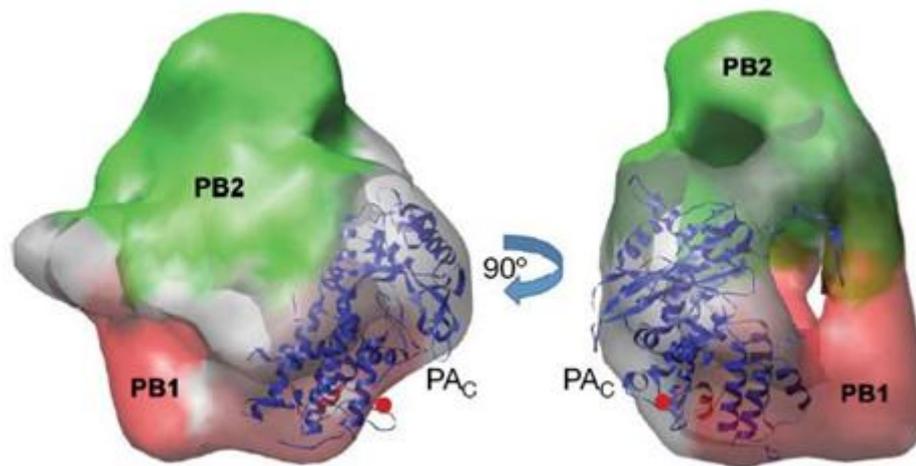
Una volta che tutte le componenti virali sono assemblate in virioni, essi possono gemmare dalla membrana plasmatica. Questo processo determina la grandezza e la forma della particella virale. Anche se non è stato ancora ben chiarito come questo avvenga, sembra che fattori virali e cellulari ne siano coinvolti. Il rilascio delle particelle virali richiede la presenza

di NA (Palese & Compans, 1976) che rimuove l'acido sialico da glicolipidi e glicoproteine delle particelle virali e delle cellule infettate prevenendo l'aggregazione tra particelle virali e il loro riattacco a cellule già infettate.

1.3 Il complesso dell'RNA polimerasi virale

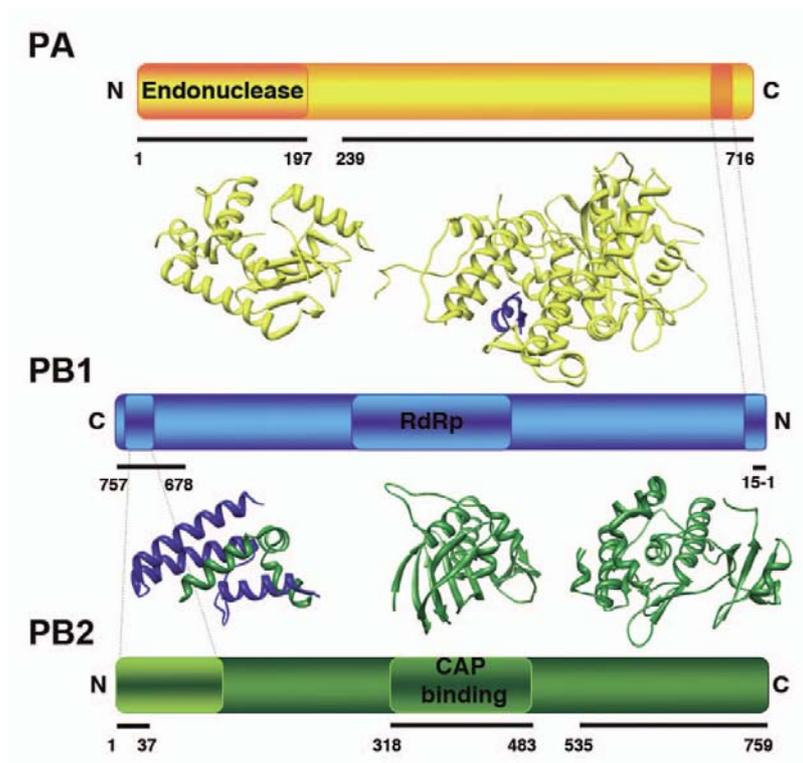
L'RNA polimerasi RNA-dipendente del virus dell'influenza ha un ruolo cruciale nel ciclo di replicazione virale.

Figura 7. Modello della struttura del complesso della RNA polimerasi (da He *et al.*, 2008).



Il complesso della polimerasi (250 kiloDalton [kDa]) è un eterotrimerico costituito da tre diverse subunità PA, PB2, PB1 che interagiscono tra di loro (**Figura 7**). In particolare, la porzione C-terminale della subunità PA interagisce con la parte N-terminale di PB1, invece la porzione C-terminale di PB1 interagisce con l'N-terminale di PB2, suggerendo un arrangiamento dall'N-terminale al C-terminale lineare tra le subunità PA-PB1-PB2 (**Figura 8**), senza un'apparente diretta interazione tra PA e PB2. Tuttavia, recenti studi indicano che l'RNA polimerasi forma un complesso globulare compatto e ciò suggerisce interazioni più profonde tra le tre subunità (Arranz *et al.*, 2012). Infatti, uno studio basato su esperimenti di *bimolecular fluorescence complementation* ha riportato una diretta interazione tra PA e PB2 (Hemerka *et al.*, 2009), anche se tutto ciò deve essere confermato.

Figura 8. Rappresentazione delle interazioni tra le subunità del complesso polimerasico (da Resa-Infante *et al.*, 2011).

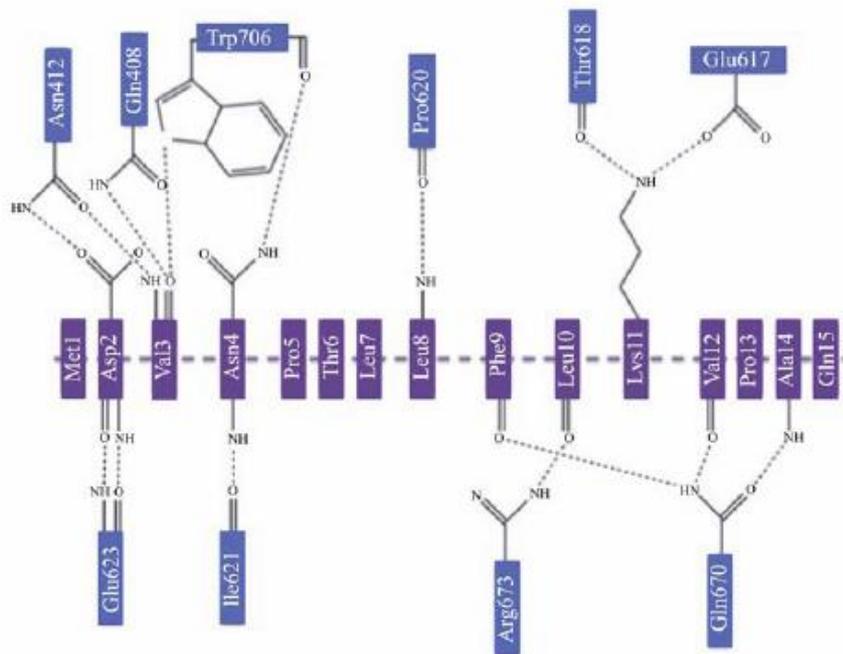


Queste tre proteine insieme alle NP sono essenziali affinché avvengano replicazione ed espressione virale (Huang *et al.*, 1990).

Il frammento di PB1, che è completamente conservato tra i ceppi di influenza umana e aviaria, si inserisce in una cavità idrofobica formata dalla porzione C-terminale di PA, anch'essa conservata tra i diversi ceppi di influenza. Il frammento di PB1 interagisce con PA attraverso legami idrogeno e idrofobici (**Figura 9**). Dalla struttura cristallografica, inoltre, è stato possibile identificare i residui di PB1 e PA implicati nel legame (**Figura 9**); in particolare gli aa PTLFL di PB1, corrispondenti ai residui 5-10, sono cruciali per l'interazione con residui non sequenziali di PA.

La subunità PB1 (83 kDa) è il cuore della RNA polimerasi virale, in quanto catalizza la sequenziale addizione di nucleotidi durante l'elongazione della catena di RNA (Biswas & Nayak, 1994). Questa subunità contiene domini conservati A-D comuni a tutte le RNA polimerasi RNA-dipendenti e alle DNA polimerasi RNA-dipendenti (Poch *et al.*, 1989). Ad oggi non sono state risolte strutture cristallografiche di RNA polimerasi RNA-dipendenti con RNA a polarità negativa, sebbene siano note strutture di RNA polimerasi RNA-dipendenti con RNA a polarità positiva. Adiacenti a queste regioni conservate si trovano due siti di legame per i nucleotidi coinvolte in un meccanismo di aggiunta per i nucleotidi (Asano & Ishihama, 1997).

Figura 9. Rappresentazione schematica delle interazioni tra PA (in blu) e PB1 (in viola). Le linee tratteggiate rappresentano i legami a idrogeno.

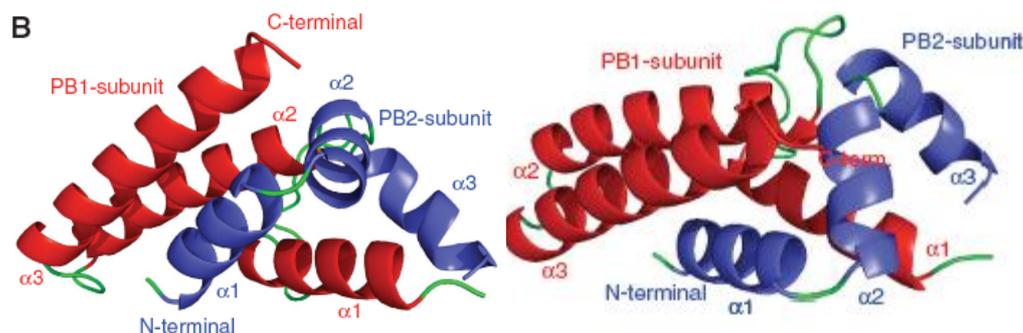


PB1 inoltre è coinvolto nel legame alle sequenze terminale al 5' e 3' del vRNA e (Gonzales & Ortin, 1999). La porzione C-terminale di PB1 è coinvolta nel legame al promotore del RNA virale, in quanto mutazioni in alcuni residui nella porzione C-terminale di PB1 (aa 668-674) inibiscono il processo di sintesi dell'mRNA a causa di una riduzione nel legame al promotore del vRNA e al cap dell'RNA (Kerry *et al.*, 2008). Ciò suggerisce che questa regione sia coinvolta nella regolazione della trascrizione dell'mRNA virale.

La subunità PB1, inoltre, funge da congiunzione tra le subunità PB2 e PA, infatti, interagisce attraverso l'estremità N- e C-terminale rispettivamente con PA e PB2. Analisi mutazionali hanno dimostrato che la porzione C-terminale di PB1 (residui 712-746) interagisce con la porzione N-terminale di PB2 (Gonzales *et al.*, 1996; Poole *et al.*, 2007; Toyoda *et al.*, 1996, Perales *et al.*, 1996). Entrambe le regioni di interazione di PB1 sono state risolte a livello cristallografico: i residui 1-25 di PB1 complessati con la subunità C-terminale di PA (Obayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008; vedi **Figura 12**) e i residui 678-757 di PB1 complessati con la regione N-terminale di PB2 (Sugiyama *et al.*, 2009; **Figura 10**).

Sia il frammento C-terminale di PB1 che quello N-terminale di PB2 sono costituiti da tre α eliche. I frammenti di PB2 e PB1 interagiscono tra loro attraverso legami idrogeno, contatti apolari e ponti salini.

Figura 10. Struttura cristallografica del dominio C-terminale di PB1 (in rosso) legato al frammento N-terminale di PB2 (in blu), osservata da due angolazioni (da Sugiyama *et al.*, 2009).



Il legame PA/PB1 è principalmente di carattere idrofobico; quello PB1/PB2, invece, è costituito da interazioni polari. La maggior parte dell'energia di interazione tra PB1 e PB2 è data dall'elica 1 di PB2 e dai legami apolari tra le due subunità. Dalla struttura cristallografica è stato possibile identificare i residui di PB1 e PB2 implicati nel legame.

Le interfacce di interazione della subunità sono essenziali per la funzione polimerasica e mutazioni in questi residui causano inibizione nella replicazione e nella trascrizione virale dimostrando un ruolo fondamentale per l'interazione PB1/PB2. Nessuna struttura cristallografica è invece disponibile per il sito attivo di PB1 tuttavia, allineamento di sequenze e analisi mutazionali mostrano che questa proteina contiene nella regione centrale un motivo S-D-D che risulta conservato delle polimerasi RNA-dipendenti, lasciando presagire che costituisca il sito attivo (Biswas & Nayak, 1994).

La subunità PB2 (83 kDa) è implicata nell'inizializzazione della trascrizione dell'RNA virale, attraverso il riconoscimento ed il legame all'cap in 5' (m^7GTP) del pre-mRNA cellulare (Gastamiza *et al.*, 2003). Il cap cellulare viene successivamente tagliato in un sito specifico dalla subunità endonucleasica PA generando 10-13-meri utilizzati come *primers* per la trascrizione del mRNA virale. PB2 quindi viene definita *cap-binding protein*, infatti la sua struttura cristallografica ha dimostrato come questa proteina assuma la stessa conformazione di proteine che legano il cap come la proteina cellulare eIF4E (Marcotrigiano *et al.*, 1997) e la proteina di vaccinia virus VP39 (Hodel *et al.*, 1998).

La proteina PB2, inoltre, lega NP in due siti distinti (Poole *et al.*, 2004).

Sono stati cristallizzati 4 diversi domini di PB2. Il primo comprende la porzione di PB2 responsabile dell'interazione con PB1 (vedi sopra; Sugiyama *et al.*, 2009). Il secondo dominio comprende i residui 678-759 della porzione C-terminale di PB2, definita dominio NLS in quanto contiene sequenze bipartite di localizzazione nucleare (736-RXR₁₂KRIR-755):

mutazioni in questo dominio bloccano il trasporto al nucleo di PB2 (Tarendeau *et al.*, 2007). La struttura di questo dominio complessata con l'importina umana $\alpha 5$ è stata determinata mediante NMR (Tarendeau *et al.*, 2007).

Il terzo dominio comprende i residui 320-483 ed è un dominio in grado di assumere la propria conformazione indipendentemente dal resto della proteina. Questo dominio comprende il sito di legame per il cap in 5' del pre-mRNA ed è stato cristallizzato complessato con il m⁷GTP (Guilligay *et al.*, 2008). Dalla struttura cristallografica sono stati identificati due amminoacidi aromatici conservati tra i ceppi di influenza A, H357 e F404, che riconoscono ed avvolgono la guanina mutilata in un modo simile a quello descritto per altre proteine che legano il cap (*cap-binding protein*; Guilligay *et al.*, 2008).

L'ultimo dominio comprende i residui 538-678, che includono il residuo 627 importante nella specificità dell'ospite (Tarendeau *et al.*, 2008). Questo residuo corrisponde ad una lisina nell'uomo (tranne nel ceppo pandemico H1N1 del 2009) e ad un acido glutammico negli uccelli. La mutazione E627K causa un aumento dell'attività polimerasica e quindi un aumento della replicazione virale.

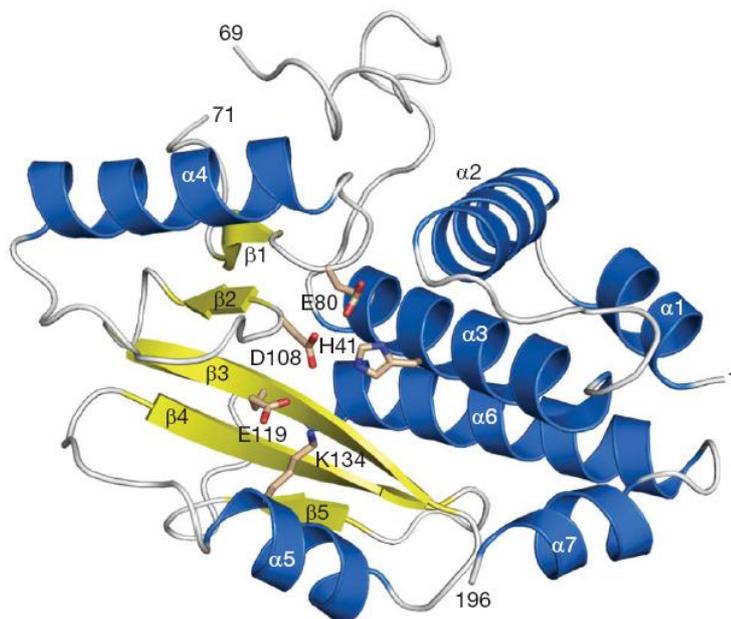
La subunità PA (78 kDa) come la subunità PB2 è anch'essa implicata nell'inizializzazione della trascrizione dell'RNA virale. Infatti grazie al suo dominio endonucleasico è responsabile del taglio cap in 5' dal pre-mRNA, che come già accennato è riconosciuto da PB2. Dal punto di vista biochimico, PA è costituita da due domini, identificati mediante digestione con tripsina: un dominio N-terminale di 25 kDa e uno C-terminale di 55 kDa (Hara *et al.*, 2006) separati da un *linker* peptidico di 20 aa che gioca un ruolo importante nella stabilità dell'interazione con PB1 (Guu *et al.*, 2008) La presenza di un *linker* di connessione tra il dominio N- e C-terminale determina una flessibilità conformazionale della subunità PA, cosa che risulta necessaria per un'interazione costante con PB1 ed anche per la regolazione delle funzioni svolte dalla polimerasi (Kawaguchi *et al.*, 2005).

Sono state cristallizzate di recente sia la porzione C-terminale che N-terminale di PA.

La porzione N-terminale di PA (residui 1-196/197) è stata risolta in parallelo da due diversi gruppi di ricerca, entrambi hanno identificato un'architettura α/β : 5 foglietti β e 7 α eliche (Dias *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009).

La porzione centrale di questo dominio possiede una struttura simile a quella di una endonucleasi di restrizione di tipo II e più generalmente alla famiglia (P)DX_N(D/E)XK delle endonucleasi, sebbene ne differisca nella porzione periferica.

Figura 11. Struttura cristallografica del dominio N-terminale di PA con α eliche (in rosso) e foglietti β (in giallo; da Dias *et al.*, 2009)



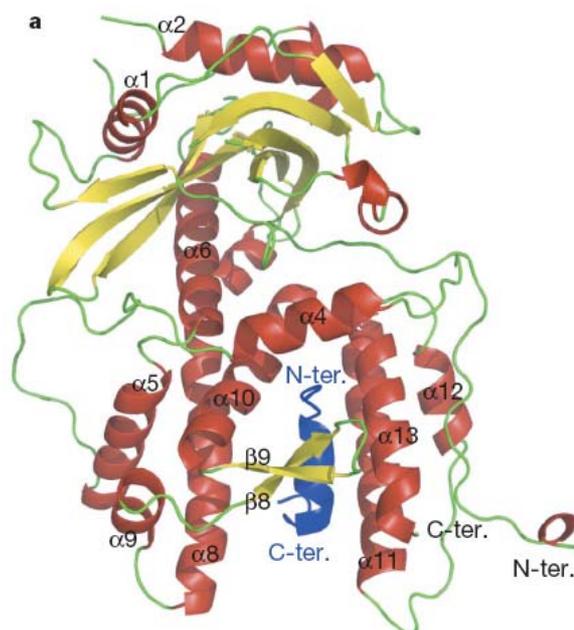
Il gruppo di Yuan *et al.* ha cristallizzato il dominio in presenza di ioni Mg^{2+} e identificato uno ione legato al residuo acido conservato situato nella cavità carica negativamente (**Figura 11**). Sono stati identificati 6 aa responsabili della coordinazione dello ione Mg^{2+} che sono conservati tra i virus dell'influenza A, B e C ad eccezione di uno solo di questi. Attraverso analisi di tipo funzionale, essi hanno dimostrato che mutazioni nei residui che coordinano lo ione Mg^{2+} causano la perdita di attività di *cap-snatching* pur mantenendo l'attività replicativa del virus (Yuan *et al.*, 2009). Il gruppo di Dias *et al.*, invece, ha cristallizzato il dominio in presenza di ioni Mn^{2+} e localizzato due ioni Mn^{2+} nella cavità acida (Dias *et al.*, 2009). Uno di questi due ioni si trova nella posizione dello ione Mg^{2+} della struttura del gruppo di Dias e l'altro in un secondo sito localizzato a una distanza di 4 Å, caratteristico di un meccanismo catalitico a due metalli. Dias *et al.* hanno dimostrato, inoltre, che questo dominio possiede un'attività endonucleasica nei confronti sia dell'RNA che del DNA a singolo filamento che dipende dalla presenza di ioni Mn^{2+} , Co^{2+} o Mg^{2+} . Sulla base di queste osservazioni, entrambi i gruppi hanno localizzato l'attività endonucleasica di *cap-snatching* nel dominio N-terminale di PA, contrariamente a quanto riportato in precedenza (Li *et al.*, 2001).

La porzione N-terminale di PA contiene un NLS che dirige il trasporto di PB1 dal citoplasma al nucleo (Nieto *et al.*, 1994). Inoltre è stato dimostrato che la sovra-espressione di PA induce degradazione di NP e PB2, suggerendo che PA abbia funzione proteolitica (Sanz-Ezquerro *et al.*, 1996). Infatti, Hara *et al.* hanno definito PA come serin-proteasi con il sito attivo localizzato in posizione 624 (Hara *et al.*, 2001). Mutazioni puntiformi nella regione N-

terminale di PA interferiscono con il legame al promotore nel cRNA, suggerendo che questa regione di PA possa avere un ruolo nella regolazione del legame al promotore (Lee *et al.*, 2002); inoltre questa subunità è in grado di aumentare l'attività della polimerasi virale aumentandone il legame al promotore (Kashiwagi *et al.*, 2009). Infine PA può essere fosforilata (Sanz-Ezquerro *et al.*, 1998), ma non è stato dimostrato se queste sue modifiche post-traduzionali giochino un ruolo nell'attività proteasica o nella sintesi dell'RNA.

Il dominio C-terminale di PA, invece, è responsabile dell'interazione con la subunità PB1. In particolare i 25 residui N-terminali di PB1 interagiscono con la porzione C-terminale di PA (Gonzales *et al.*, 1996; Ohtsu *et al.*, 2001; Perez e Donis *et al.*, 1995; Toyoda *et al.*, 1996; Zurcher *et al.*, 1996). Questo è stato dimostrato di recente utilizzando un peptide corrispondente ai 25 aa N-terminali di PB1 in grado di inibire l'attività polimerasica e la replicazione virale (Ghanem *et al.*, 2007; Wunderlich *et al.*, 2009). Sulla base di queste informazioni, due gruppi di ricerca hanno determinato la struttura cristallografica della porzione C-terminale di PA complessata con il frammento N-terminale di PB1 (Obayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008). Dalla struttura cristallografica è emerso che il dominio C-terminale di PA è costituito da 13 α eliche e 9 foglietti β (**Figura 12**).

Figura 12. Struttura cristallografica del dominio C-terminale di PA (in rosso) legato al frammento N-terminale di PB1 (in blu; da Obayashi *et al.*, 2008).



1.4 Meccanismi di evoluzione del virus dell'influenza

L'RNA polimerasi virale trascrive e replica l'RNA genomico, ma non possiede attività di correttore di bozze. Questo comporta un'elevata capacità di inserire mutazioni nel genoma pari a circa un errore per ogni ciclo replicativo (Drake, 1993); conseguentemente quasi ogni nuova particella virale contiene una mutazione nel suo genoma. Questo fenomeno prende il nome di *antigenic drift* (Moya *et al.*, 2004) e riguarda in particolare le glicoproteine. Questa caratteristica è importante nella strategia evolutiva del virus, infatti, la continua sostituzione amminoacidica nelle regioni antigeniche delle due glicoproteine di superficie, l'HA e NA, può permettere al virus di evadere l'immunità pre-esistente, portando così ad un vantaggio selettivo. Inoltre un altro vantaggio evolutivo deriva dal fatto che il genoma del virus è segmentato permettendo il mescolamento o il riassortimento dei geni quando segmenti di diversi virus umani e animali che coinfectano la stessa cellula ospite sono impacchettati in una nuova particella virale antigenicamente diversa da quelle di partenza (Webster *et al.*, 1992). Questo processo di riassortimento dei segmenti di RNA genomico viene chiamato *antigenic shift*. La generazione di virus riassortanti contenenti geni provenienti da virus aviari e umani può avvenire nei suini in quanto contengono acido sialico sia con legame α (2-3) che α (2-6) e che quindi possono essere infettati da entrambi i virus. Questi virus riassortiti possono essere in grado di infettare efficientemente le cellule umane (Van Hoeven *et al.*, 2009) ed occasionalmente il virus può acquisire la capacità di trasmettersi da persona a persona e così diffondersi rapidamente in tutta la popolazione mondiale, immunologicamente non protetta, sfociando in pandemie. Questo fenomeno di *antigenic shift* avviene solamente in IAV, poiché IBV è in grado di infettare quasi solamente gli uomini. Nell'ultimo secolo si sono verificate quattro pandemie che hanno avuto delle conseguenze drammatiche sulla salute dell'uomo.

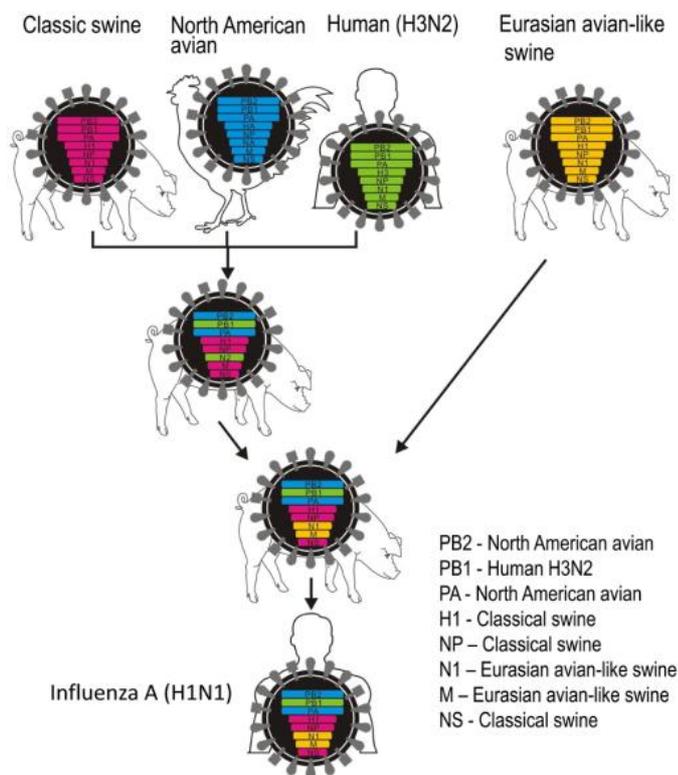
I sottotipi del virus dell'influenza A che sono stati identificati come altamente patogeni per l'uomo sono riportati in **Tabella 2** e rappresentano i ceppi che hanno causato pandemie nel passato. La pandemia più devastante fu quella del 1918 scatenata dal ceppo H1N1 che infettò il 30% della popolazione causando circa 40-50 milioni di morti in tutto il mondo (Reid *et al.*, 2001).

Tabella 2. Pandemie causate dal virus dell'influenza A.

Nome della Pandemia	Data	Decessi	Sottotipo coinvolto
Influenza spagnola	1918-20	40 -50 milioni	H1N1
Influenza asiatica	1957-58	1-1,5 milioni	H2N2
Influenza di Hong Kong	1968-69	0,75-1 milioni	H3N2
Influenza suina	2009-10	Alcune migliaia	H1N1

La precisa origine di questo virus non è ancora chiara, anche se sembra non ci sia stata un processo di ricombinazione, ma più probabilmente una trasmissione diretta di un virus di origine aviaria all'uomo. Altre pandemie furono quelle del 1957 (H2N2) e 1968 (H3N2), causate entrambi da eventi di riassortimento genico. Le conseguenze furono meno devastanti rispetto all'influenza spagnola, ma caratterizzate sempre da un elevato tasso di mortalità. La pandemia più recente è stata quella suina, che si è originata nel 2009 in Messico grazie ad un triplo riassortimento genico tra virus suini, aviari ed umani, verificatosi in maiali e raffigurato in **Figura 13** (Neumann *et al.*, 2009). Da qui, il virus si è diffuso in breve tempo a più di 80 Paesi. Sebbene questo virus sia caratterizzato da un'elevata contagiosità, il tasso di mortalità è risultato comparabile a quello dell'influenza stagionale, infatti si è dimostrata letale soprattutto nella popolazione a rischio (Wilson & Barker, 2009). I casi accertati di influenza suina sono stati circa 500.000 di cui quasi 7000 morti. Recentemente sono stati identificati diversi casi di severe influenze in uomo, causate da ceppi influenzali altamente patogenici, distinti da quelli circolanti.

Figura 13. Meccanismo del triplo riassortimento genico che ha originato la pandemia suina nel 2009 (da Neumann *et al.*, 2009).



Infatti, si sono verificate delle epidemie dovute a trasmissione diretta da animale ad uomo, di virus aviari H5N1 e H7N9. Il virus H5N1 fu trasmesso dai polli all'uomo nel 1997 ad Hong Kong, uccidendo 6 su 18 persone infettate (Subbarao *et al.*, 1998). Da allora il virus ha continuato a circolare in varie specie aviarie, causando rari, ma continui episodi di epidemie nell'uomo, associate ad un tasso di mortalità compreso tra il 50 e 60% (Peiris *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). Il virus H7N9 è stato identificato per la prima volta nel febbraio del 2013 a Twain, in seguito ad epizoonosi nei polli. Questo episodio è stato seguito da epidemie diffuse in altre regioni della Cina e di Taiwan (Gao *et al.*, 2013; Wiwanitkit, 2013). Fino ad adesso, sono stati confermati 131 casi di infezione da virus H7N9, che hanno causato il decesso di ben 28 pazienti (Qi *et al.*, 2014). Entrambi i casi sono esempi di zoonosi, caratterizzate da elevato tasso di mortalità, ma con un numero di casi limitato (Zhang *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2014). Tuttavia, l'eventuale acquisizione della capacità di trasmettersi da uomo a uomo permetterebbe ad entrambi i virus di evolvere in virus pandemici e diffondersi rapidamente, costituendo una serie minaccia per la salute pubblica mondiale. Questa riflessione sottolinea l'importanza di un monitoraggio e controllo intensivo delle zoonosi per scongiurare il pericolo di un'evoluzione ad estese pandemie.

1.5 Determinanti di patogenicità legati al virus dell'influenza

I virus dell'influenza aviaria si classificano in virus ad alta patogenicità (HPAI: *highly pathogenic avian influenza*) che presentano un alto tasso di mortalità nei casi infettati ed in virus a bassa patogenicità (LPAI: *low pathogenic avian influenza*) che invece sono associati a malattie più modeste.

I fattori che causano patogenicità sono molteplici e riguardano le proteine HA, PB2, PB1-F2 e NS1.

La proteina HA è un fattore importante di patogenicità per due motivi. In primo luogo perché HA può legarsi a glicani sialilati α (2-3), oppure glicani sialilati α (2-3). I ceppi HPAI riconoscono principalmente acido sialico legato α (2-3), che nell'uomo è presente nelle basse vie aeree e nei polmoni. Infatti, le infezioni di ceppi HPAI, a differenza di quelli LPAI, sono maggiormente associate a severe polmoniti (Korteweg & Gu, 2008). In secondo luogo, come detto in precedenza, HA è costituita dalle due subunità HA1 e HA2 legate da un *linker* che viene tagliato da proteasi cellulari per generare HA matura. Nei ceppi LPAI il *linker* contiene un solo residuo di arginina che può essere tagliato da determinate proteasi extracellulari del tratto respiratorio e gastrointestinale, nei ceppi HPAI invece il *linker* è costituito da multipli residui basici che rende il taglio proteolitico, da parte di proteasi intracellulari, più efficiente (Bosch *et al.*, 1981; Webster, 1987).

Alcuni residui della subunità PB2 della polimerasi virale sono importanti fattori che determinano la patogenicità del virus. Il residuo 627, ad esempio, è particolarmente importante. Questo residuo è un acido glutammico nei virus aviari e una lisina nei virus che infettano i mammiferi. Mutazioni E627K aumentano l'attività polimerasica del virus. Inoltre è stato dimostrato che anche mutazioni T271A aumentano l'attività polimerasica: in particolare questa mutazione non aumenta la patogenicità virale, ma il titolo del virus (Bussey *et al.*, 2010). Il ceppo pandemico del 2009 (H1N1 suino) presenta questa mutazione. Anche il residuo 701 di PB2 è un determinante patogenetico virale; questo residuo generalmente è un aspartato, ma mutazioni D701N influenzano la dinamica dell'*import* nucleare di PB2 modulandone l'interazione con l'*importina* α (Gabriel *et al.*, 2008).

Inoltre anche la proteina pro-apoptotica PB1-F2 è associata a virulenza. È stato visto che i ceppi HPAI, quali il ceppo pandemico H1N1 responsabile dell'influenza spagnola e il virus aviario H5N1, sono associati alla sostituzione amminoacidica N665S in PB1-F2. Questa mutazione serve al virus per aumentare il titolo virale nei polmoni e anche la secrezione di citochine pro-infiammatorie, come il TNF- α (Conenello *et al.*, 2007).

Infine anche NS1, per la sua attività antagonista contro INF α/β , è implicata nella virulenza di IAV.

1.6 Epidemiologia e patogenesi delle infezioni da virus dell'influenza

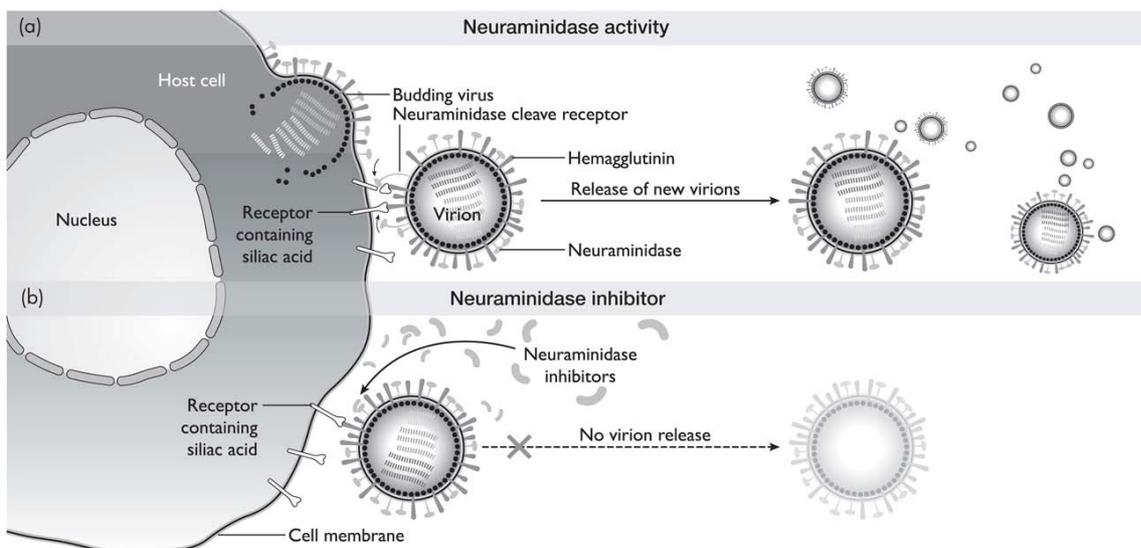
Il virus dell'influenza A causa infezioni nella maggior parte dei casi alle vie aeree superiori che portano ad una malattia respiratoria acuta ed altamente contagiosa. In una minoranza dei casi può comportare un'infezione alle basse vie respiratorie, con interessamento dei polmoni portando a malattie più severe, su tutte polmoniti primarie. In generale, le infezioni dovute a virus influenzali sono potenzialmente pericolose soprattutto nella popolazione ad alto rischio, quali persone immunocompromesse e trapiantati, ma anche bambini e anziani. Il virus viene trasmesso da mammiferi infetti per via aerea, principalmente attraverso l'inalazione di secrezioni respiratorie infette, dovute a colpi di tosse e starnuti che creano goccioline o aerosol contenenti il virus, che possono inalate direttamente o veicolate dalle mani che sono state a contatto con oggetti contaminati. L'influenza può essere trasmessa anche attraverso campioni biologici di soggetti infetti quali, saliva, secrezioni nasali, feci, sangue ma anche da volatili infetti attraverso escrementi. Dopo un'incubazione che varia da 1 a 4 giorni, l'influenza si manifesta in individui immunocompetenti con febbre, malessere generalizzato, dolore muscolare, congestione nasale, sintomi del tratto respiratorio superiore. In generale, casi modesti di infezione si risolvono in pochi giorni senza terapia specifica, grazie ad un effetto combinato della risposta immunitaria adattiva e di quella innata. Il periodo di decorso è piuttosto breve e dipende dalla virulenza del virus, ma anche dalle caratteristiche individuali del soggetto infettato. Nei bambini, negli anziani o in persone immunodeficienti con malattie cardiopolmonari o croniche, il virus dell'influenza può dare origine ad una malattia severa con complicanze serie e potenzialmente fatali, come ad esempio polmoniti secondarie, encefalopatie, Sindrome di Reye, pericarditi, miocardite, ecc. Ogni anno si verificano circa 36 mila morti e più di un milione di ospedalizzazioni a causa del virus dell'influenza. Il virus dell'influenza A, ma non il virus dell'influenza B, è responsabile di epidemie periodiche o pandemie con elevata mortalità (Wright & Webster, 2001). Più del 20% della popolazione viene colpita dalle epidemie stagionali che si verificano ogni anno. Inoltre, ad intervalli irregolari, si sviluppano ceppi di influenza A antigenicamente nuovi in grado di infettare e trasmettersi efficientemente tra la popolazione generando ceppi pandemici che si trasmettono molto velocemente e sono caratterizzate da alta morbilità e mortalità.

1.7 Prevenzione, profilassi e terapia delle infezioni da virus dell'influenza

Le infezioni causate dal virus dell'influenza possono essere controllate mediante vaccinazione e farmaci antivirali. Il vaccino è il modo principale di ridurre l'impatto di una nuova pandemia influenzale (Monto, 2006); esso, tuttavia, previene l'infezione nel 70-90% degli adulti sani, ma solo nel 30-40% degli individui immunocompromessi. La formulazione del vaccino deve essere riformulata ogni anno a causa dell'instabilità genetica del virus ed inoltre è richiesto un tempo notevole per la produzione di un vaccino, che non permette di contrastare la diffusione di un nuovo ceppo pandemico e rapidamente emergente. Oltre al vaccino, sono disponibili pure degli antivirali attivi contro il virus dell'influenza, alcuni dei quali già disponibili in commercio ed altri ancora in fase di sviluppo.

I farmaci attualmente già approvati per la terapia anti-influenzale appartengono a due classi, ovvero: gli inibitori di neuraminidasi degli inibitori del canale ionico M2. Gli inibitori della neuraminidasi inibiscono il rilascio delle particelle virali inibendone lo *spread* e fanno parte di questa classe i farmaci oseltamivir e zanamivir (De Clercq, 2004; Moscona, 2005; **Figura 14**). Tra gli inibitori della neuraminidasi, il farmaco maggiormente utilizzato in terapia è l'oseltamivir (Tamiflu). Si tratta di un profarmaco somministrato oralmente, in quanto possiede un'elevata biodisponibilità (circa 80%), che viene rapidamente convertito alla sua forma attiva, l'oseltamivir carbossilato.

Figura 14. Meccanismo d'azione degli inibitori della neuraminidasi.



© Hodder Arnold / Use of Antibiotics 6E

Il pannello (a) mostra l'azione della neuraminidasi nel ciclo di replicazione virale dell'influenza. Nel pannello (b) è evidenziato il meccanismo d'azione degli inibitori di neuraminidasi, che agiscono prevenendo il rilascio di progenie virali dalle cellule infettate (Moscona, 2005).

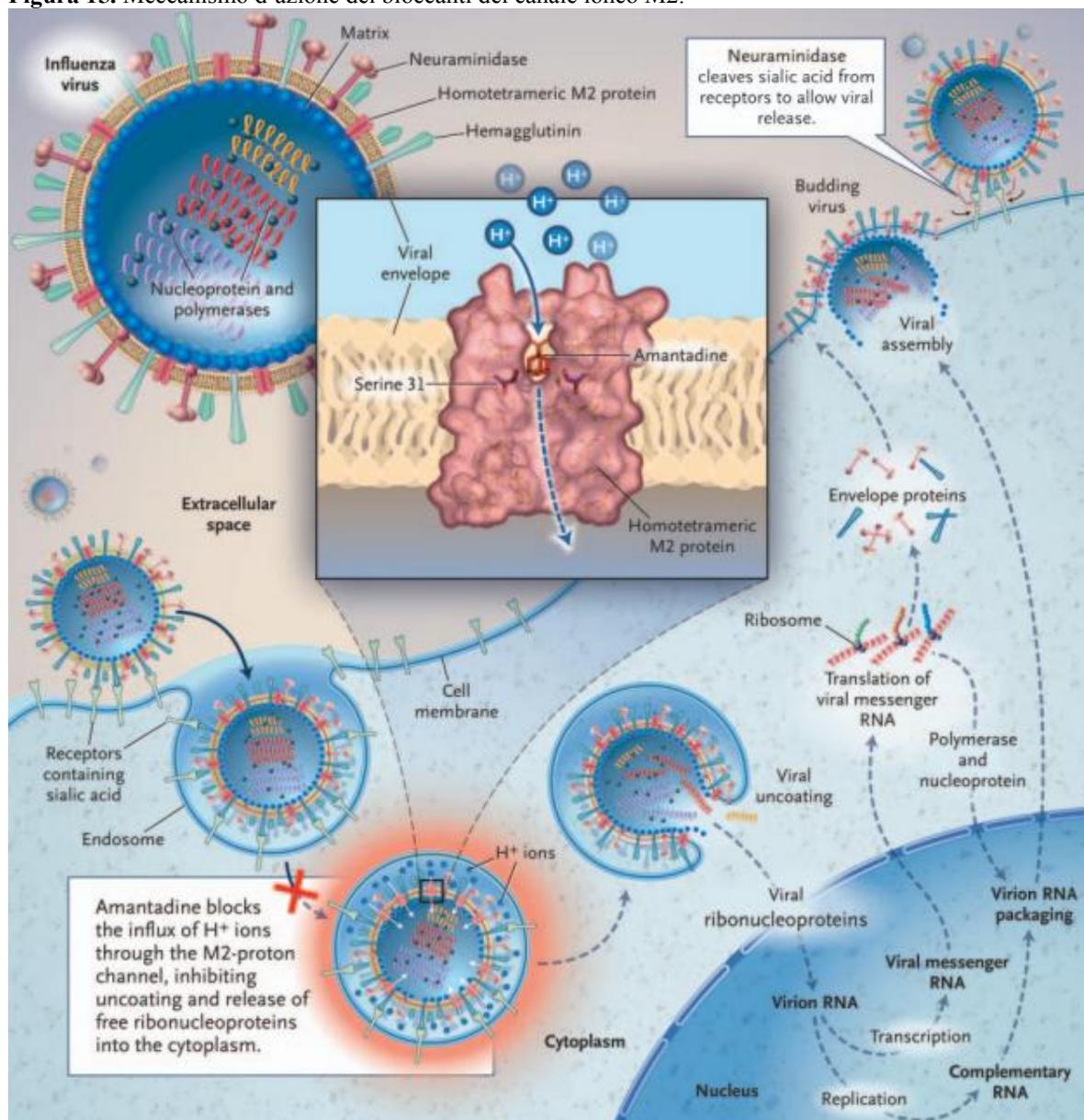
Oseltamivir può essere somministrato a pazienti con età pari o maggiore di un anno, ma per essere efficace deve essere assunto entro 48 ore dalla comparsa dei sintomi influenzali (Davies, 2010). In alternativa può essere considerata come opzione terapeutica la somministrazione endovena dell'oseltamivir, in particolare in pazienti gravemente malati. Un altro inibitore della neuraminidasi attualmente disponibile in commercio è zanamivir (Relenza). Questo farmaco è somministrato a pazienti con età maggiore dei 7 anni per via inalatoria, per la sua bassa biodisponibilità orale (minore del 20%) (Cass *et al.*, 1999). Nonostante zanamivir sia ben tollerato e sia associato solamente a rare reazioni avverse, la via di somministrazione di questo farmaco rappresenta un inconveniente per bambini o anziani con problemi respiratori ed inalatori (Tsang *et al.*, 2005). Per ovviare a tale problema, è stata studiata una formulazione intravenosa di Zanamivir ed attualmente è sottoposta alla fase III degli studi clinici per il trattamento di soggetti con infezioni influenzali severe.

Più recentemente sono stati sviluppati altri inibitori della neuraminidasi, peramivir (BCX-1812, RWJ-270201) e laninamivir (CS-8958, R-118958), che sono stati immessi in commercio in alcuni stati asiatici, ma sono ancora in fase III di studi clinici in altri paesi. Entrambi hanno mostrato attività contro ceppi di influenza A e B zanamivir- e oseltamivir-resistenti sia *in vitro* che *in vivo* (Kohno *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2009). Peramivir è somministrato solo in forma intravenosa in quanto possiede una biodisponibilità veramente bassa (Barroso *et al.*, 2005). Laninamivir è un analogo dell'acido sialico, strutturalmente simile a Zanamivir, somministrato per via inalatoria sotto forma di profarmaco (laninamivir octanato) ed in grado di svolgere un'azione inibitoria a lunga durata (Koyama *et al.*, 2009). Questo effetto prolungato è dovuto al fatto che questo farmaco è convertito al metabolita attivo, lananimivir, ed è trattenuto nei polmoni e nella trachea per un lungo periodo, mostrando un'emivita notevolmente più lunga rispetto agli altri inibitori di neuraminidasi (Koyama *et al.*, 2009). Tutti gli inibitori di neuraminidasi sopra elencati, trattandosi di analoghi dell'acido sialico, agiscono sul sito attivo dell'enzima e nonostante sia una regione altamente conservata, sono stati selezionate diverse sostituzioni associate a ridotta sensibilità agli inibitori di neuraminidasi (Samson *et al.*, 2013). Le sostituzioni in questione riguardano i seguenti amminoacidi di NA E105, E119, I122, Q136, D151, R152, D198, R224, S246, H274, R292, N294, e R371 e mappano nella regione del sito attivo dell'enzima o nelle strette vicinanze. Considerando che la frequenza di queste mutazioni è in notevole aumento e che la comparsa di virus farmaco-resistenti è stata riscontrata anche in assenza di farmaco, questo comporta una notevole limitazione nell'efficacia clinica di questi farmaci (Samson *et al.*, 2013). Allo stato attuale però, non è stata identificata nessuna mutazione che conferisca

resistenza a laninamivir (Samson *et al.*, 2013). Nonostante questo dato debba essere confermato, laninamivir rimane l'unico inibitore di neuraminidasi non soggetto a farmacoresistenza.

Gli altri due farmaci già commercializzati nella terapia anti-influenzale sono amantadina e rimantadina, appartenenti alla classe degli inibitori del canale ionico M2. Essi agiscono legandosi al lume del poro di M2 e la loro carica positiva intrinseca produce una repulsione elettrostatica tale da impedire il flusso di protoni all'interno del virione, interferendo così con il processo di transcapsidazione del virus (**Figura 15**).

Figura 15. Meccanismo d'azione dei bloccanti del canale ionico M2.



Rappresentazione del ciclo di replicazione di IAV ed in evidenza la fase inibita dai bloccanti del canale ionico M2. Il pannello centrale mostra in dettaglio il meccanismo d'azione degli adamantani (Hayden, 2006).

Tuttavia questi farmaci sono attivi solamente contro IAV e non contro IBV, in quanto ci sono notevoli differenze nella sequenza amminoacidica di M2 tra i virus influenzali di tipo A e B (Pinto & Lamb, 2006). Oltre alla mancanza di un effetto inibitorio su IBV, questi farmaci possono avere anche gravi effetti collaterali di tipo neurologico e per questo non possono essere somministrati ai bambini al di sotto dei 12 anni d'età e alle donne in gravidanza o durante l'allattamento, perché non vi sono ancora dati sufficienti per assicurarne l'innocuità in questi casi. Tuttavia la maggior limitazione nell'uso di amantadina e rimantadina è dovuta alla rapida emergenza di varianti resistenti, dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* (Hay *et al.*, 1986). È noto, infatti, che singole sostituzioni amminoacidiche ai residui 26, 27, 30, 31, e 34 del dominio trans-membrana della proteina di M2 conferiscono la cross-resistenza a questi due farmaci (Wang *et al.*, 2013). Si stima che circa il 98% dei ceppi virali circolante contenga sostituzioni amminoacidiche nel dominio trans-membrana di M2 che conferiscono resistenza agli adamantani; compromettendone totalmente la loro utilità clinica (Bright *et al.*, 2005).

Oltre ai farmaci già in commercio, ce ne sono molti altri in via di sviluppo, che vanno a bersagliare anche altre proteine virali coinvolte in fasi fondamentali del ciclo di replicazione del virus. Un'altra classe di composti anti-influenza è costituita dagli inibitori dell'HA. In letteratura esistono numerosissimi inibitori che hanno come *target* questo enzima e si dividono principalmente in base a due diversi meccanismi d'azione. Infatti, tali inibitori possono agire in un primo caso legandosi ad HA ed impedendone il legame all'acido sialico, necessario per l'adsorbimento virale sulla membrana cellulare, oppure in un secondo caso bloccando il cambiamento conformazionale di questa glicoproteina e conseguentemente anche la fusione dell'*envelope* virale con la membrana endosomiale, necessario per il rilascio di vRNP nel citoplasma. Per fare un esempio, la prima strategia di inibizione, che prevede l'interdizione del processo di adsorbimento virale, è sfruttata dalla cianovirina-N. Si tratta di una lectina isolata da *E.coli* che si lega a strutture oligosaccaridiche ricche in mannosio presenti sulla glicoproteina dell'HA e per ingombro sterico ne impedisce il legame con l'acido sialico presente sulla membrana cellulare della cellula ospite (O'Keefe *et al.*, 2003; Smee *et al.*, 2008). Un esempio invece di inibitori del cambiamento conformazionale dell'emoagglutinina è rappresentato dal tert-butil idrochinone (TBHQ). Questo composto, infatti, agisce legandosi in una tasca idrofobica nella regione dello stelo di emoagglutinina ed in tal modo stabilizza la conformazione della glicoproteina a pH neutro, impedendone alcuna modificazione (Bodian *et al.*, 1993).

Un altro bersaglio virale emergente è rappresentato dalla proteina NP, dato i suoi molteplici ruoli nel ciclo di replicazione del virus. Alcune *small molecules*, tra cui la nucleozina ed i suoi

derivati (Su *et al.*, 2010), sono in grado di inibire le funzioni svolte da questa proteina, impedendo principalmente la corretta interazione proteina-proteina tra monomeri di NP e promuovendo la formazione di aggregati non funzionali. Recentemente è stato identificato un addizionale effetto inibitorio sulla crescita virale determinato da Nucleozina. Infatti, questo composto sembra bloccare il traffico citoplasmatico di vRNPs di nuova sintesi, arrestando la produzione di progenie virali infettive (Amorim *et al.*, 2013).

Anche numerosi agenti anti-influenzali che bersagliano l'RNA polimerasi sono stati identificati e saranno trattati separatamente nel prossimo Paragrafo (1.8).

Nonostante il determinante apporto delle proteine virali, il ciclo di replicazione virale è strettamente ospite-dipendente. Infatti, molte proteine o fattori cellulari sono essenziali nelle fasi di maturazione del virus ed allo stesso tempo possono non essere cruciali per la crescita cellulare, rappresentando a tutti gli effetti dei bersagli ideali per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-influenzali (Karlas *et al.*, 2010; König *et al.*, 2010 ; Müller *et al.*, 2012). Molti inibitori basati su *target* cellulari sono già stati identificati ed alcuni di essi si trovano già in fasi avanzate di studi clinici. Un esempio lampante è rappresentato da Fludase (DAS181), una proteina di fusione ricombinante che previene l'adsorbimento del virus alla cellula, rimuovendo enzimaticamente i residui terminali di acido sialico dalle glicoproteine e dai glicopeptidi presenti sulla superficie delle cellule epiteliali delle vie aeree (Triana-Baltzer *et al.*, 2009; Malakhov *et al.*, 2006).

Un'altra classe di inibitori sono gli *small interfering* RNA (siRNA) in grado di silenziare in maniera specifica un gene bersaglio senza avere un impatto sull'espressione dei geni dell'ospite. In particolare gli siRNA (21-26 nt) possono indurre un processo catalitico inibendo le molecole di mRNA e causare una diminuzione dell'espressione del gene bersaglio. E' stato dimostrato come anche questi siRNAs o oligonucleotidi antisenso inibiscono la replicazione virale sia *in vitro* che *in vivo* (Zhang *et al.*, 2009).

1.8 Inibitori dell'RNA polimerasi dei virus dell'influenza

Gli agenti antivirali attualmente utilizzati per il trattamento delle infezioni da virus dell'influenza (adamantani, oseltamivir e zanamivir), come precedentemente affermato, hanno numerosi svantaggi.

Questi problemi stimolano la ricerca di nuovi composti dotati di innovativi meccanismi d'azione, che vadano ad interagire con bersagli alternativi. Grazie alla sua struttura a

multidomini e alle numerose attività enzimatiche che svolge, rendendolo bersagliabile in differenti siti, un interessante *target* è rappresentato dall'RNA polimerasi RNA-dipendente (*RNA-dependent RNA polymerase*; RdRP) virale. Il primo composto ad esser stato descritto come un inibitore della trascrizione dei virus influenzali è stata la RBV (Sidwell *et al.*, 1972). RBV è un analogo nucleosidico che inibisce un ampio spettro di virus ed in particolar modo contro virus a RNA, compresi IAV e IBV (Sidwell *et al.*, 1972). RBV è convertito intracellularmente nella sua forma monofostato ed agisce inibendo l'enzima IMP deidrogenasi, che catalizza la conversione dell'IMP a xantosina monofostato durante la sintesi di GTP. Allo stato attuale, RBV è stata approvata solo per la terapia delle infezioni del virus respiratorio sinciziale (RSV) ed in combinazione con l'interferone α nel trattamento delle infezioni da virus dell'epatite C (HCV). Nonostante un'indiscussa efficacia nell'inibire la replicazione di virus influenzali *in vitro*, RBV non ha ottenuto un'applicazione clinica nella terapia anti-influenzale, dovuta alla tossicità e la sua dubbia efficacia *in vivo*. Di recente taribavirin, un pro-farmaco della RBV, ha mostrato simile efficacia contro infezioni da virus dell'influenza, ma con minore tossicità (Sidwell *et al.*, 2005). Questo farmaco è in Fase III degli studi clinici per la terapia delle infezioni causate da HCV. Un altro analogo nucleosidico con attività anti-influenzale è il favipavir (T705; 6-fluoro-3-idrossi-2-pirazinacarbossamide), riportato per la prima volta da Furuta *et al.* nel 2002 (Furuta *et al.*, 2002). Favipiravir viene modificato da enzimi cellulari e convertito a ribofuranosil-5'-trifosfato, che inibisce l'attività della polimerasi virale (Furuta *et al.*, 2005). E' stato dimostrato che questo composto ha attività antivirale non solo verso tutti e tre i tipi di virus influenza A, B e C (Furuta *et al.*, 2002; Kiso *et al.*, 2004; Furuta *et al.*, 2005), ma anche verso altri virus a RNA, mentre non è efficace contro virus a DNA. Attualmente questo composto è sottoposto alla Fase III degli studi clinici per valutarne l'efficacia in pazienti con infezioni da influenza virus.

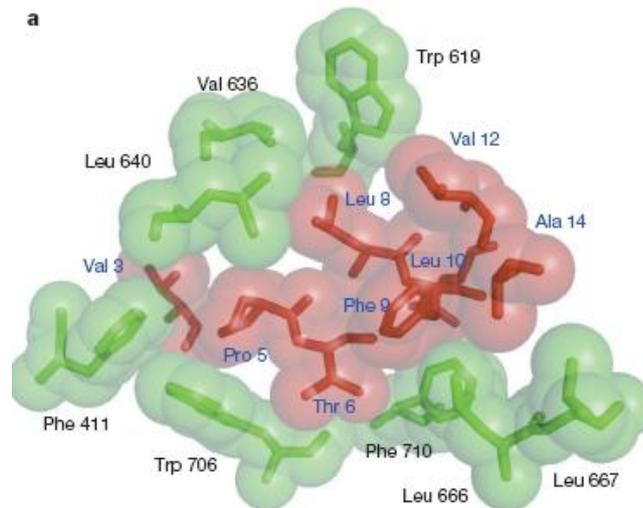
Oltre all'attività polimerasica del RdRP, anche l'attività endonucleasica di PA e l'attività di legame al cap svolta da PB2, necessarie entrambi per il processo di *cap-snatching*, si prestano molto bene a rappresentare potenziali bersagli per lo sviluppo di nuovi anti-influenzali (Dias *et al.*, 2009; Gulligay *et al.*, 2008). Infatti, nel corso degli ultimi anni sono stati identificati numerosi inibitori di tali attività, anche se molti di essi non sono stati ulteriormente sviluppati (Tomassini *et al.*, 1996; Tomassini *et al.*, 1996; Parkes *et al.*, 2003).

Come già descritto precedentemente, l'RNA polimerasi del virus dell'influenza è un complesso multiproteico che si forma grazie alle interazioni tra le tre subunità PA, PB1 e PB2. Considerando che queste interazioni sono necessarie affinché avvenga la replicazione virale, e che l'interfaccia di interazione è piuttosto conservata tra i vari ceppi virali, si può

assumere che l'inibizione di tali interazioni, da parte di inibitori dell'interazione proteina-proteina (PPI), rappresenta un valido ed interessante approccio per lo sviluppo di nuovi anti-influenzali ad ampio spettro (Palù & Loregian, 2013). Questa strategia si basa sulla dissociazione di complessi proteici virali attraverso l'uso di inibitori di varia natura, includendo peptidi o *small molecules*, che mimino una delle regioni coinvolte nell'interazione tra le subunità del complesso proteico (Loregian *et al.*, 2002; Loregian & Palù, 2005a; Loregian & Palù, 2005b; Palù & Loregian, 2013). L'assoluta specificità delle interazioni proteina-proteina offre la possibilità di attuare un'inibizione selettiva e virus-specifica. Questi composti potrebbero, inoltre, ovviare al problema dei ceppi resistenti. Mutazioni puntiformi nel sito catalitico dell'enzima spesso conferiscono resistenza a farmaci che sono analoghi dei substrati naturali, invece, una singola mutazione in una subunità dell'interfaccia proteina-proteina richiede di solito la mutazione complementare nell'altra subunità per mantenere intatto il complesso ed è molto più difficile che insorgano due mutazioni complementari. Questo rende improbabile il fatto che la proteina bersaglio acquisisca resistenza all'inibitore. Infine, poiché questi composti hanno come bersaglio siti differenti rispetto ai farmaci antivirali comunemente utilizzati, verosimilmente essi potrebbero essere attivi anche contro ceppi virali resistenti a questi farmaci. Tal approccio era già stato utilizzato dal nostro gruppo di ricerca per inibire la replicazione di altri virus, identificando inibitori capaci di dissociare i complessi polimerasici di Herpes simplex virus di tipo 1 (HSV-1) e di citomegalovirus (HCMV); (Loregian *et al.*, 2004a; Loregian *et al.*, 2004b; Loregian & Coen, 2006).

La fattibilità di applicare questo tipo di approccio verso le interazioni del complesso polimerasico del virus d'influenza è stata dimostrata dall'identificazione di due peptidi, corrispondenti ad i primi amminoacidi del dominio N-terminale di PB1 (i residui 1-25 e 1-15 di PB1), che erano in grado di dissociare il complesso PA-PB1 (Ghanem *et al.*, 2007; Wunderlich *et al.*, 2009). Sempre gli stessi peptidi, coniugati al dominio *translocating* della proteina TAT del Virus dell'Immunodeficienza umana (*Human Immunodeficiency Virus*; HIV) che ne permetteva l'entrata all'interno della cellula, mostravano la capacità di inibire la replicazione virale (Ghanem *et al.*, 2007; Wunderlich *et al.*, 2009). Inoltre, la recente pubblicazione di due strutture cristallografiche della porzione C-terminale tronca di PA complessata con un peptide N-terminale di PB1 ha mostrato che solo pochi residui sono coinvolti nel legame tra PB1 e PA (Obayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008; **Figura 16**).

Figura 16. Residui amminoacidici coinvolti nell'interazione PA-PB1



Rappresentazione dei contatti idrofobici tra i residui della subunità di PA (coloranti in verde) ed i residui della subunità di PB1 (coloranti in rosso).

Queste scoperte hanno suggerito un possibile intervento terapeutico con *small molecules* per inibire l'interazione tra le subunità PA e PB1, con lo scopo di prevenire l'attività polimerasica e di conseguenza bloccare la replicazione virale. A conferma del notevole interesse che ha suscitato questo tipo di approccio, negli ultimi anni sono state sviluppate ed identificate diverse *small molecules* in grado di dissociare l'interazione tra le subunità virali PA e PB1 (Muratore *et al.*, 2012a; Fukuoka *et al.*, 2012; Muratore *et al.*, 2012b; Kessler *et al.*, 2013; Massari *et al.*, 2013; Pagano *et al.*, 2014; Tintori *et al.*, 2014). Interessante evidenziare come diversi di questi nuovi inibitori dell'interazione PA-PB1 sono stati identificati mediante uno *screening in silico*, usando le strutture cristallografiche disponibili dell'interfaccia d'interazione PA-PB1 (Muratore *et al.*, 2012a; Fukuoka *et al.*, 2012; Kessler *et al.*, 2013; Tintori *et al.*, 2014). Questo approccio è stato utilizzato anche dal nostro gruppo di ricerca ed ha portato all'identificazione di alcuni composti capaci di interferire con tale interazione *in vitro* (Muratore *et al.*, 2012a), che sono stati poi utilizzati come composti di partenza per lo sviluppo di analoghi strutturali caratterizzati da un notevole incremento di attività inibitoria (Massari *et al.*, 2013). Questo lavoro è il progetto della mia tesi e sarà descritto in dettaglio in seguito.

La recente pubblicazione di una struttura cristallografica dell'interfaccia di questa interazione ha messo in luce che solo piccole regioni di entrambe le proteine sono coinvolte nel legame (residui amminoacidici 678–757 di PB1 e residui amminoacidici 1–37 di PB2) (Sugiyama *et al.*, 2009), rendendo anch'essa un promettente bersaglio da parte di PPI. A conferma della fattibilità di questo approccio è stato identificato un peptide sintetico, corrispondente ai residui 1–37 di PB2, che ha mostrato un effetto inibitorio sull'interazione PB1-PB2 *in vitro*

(Chase *et al.*, 2011). Successivamente è stato riportato anche un ulteriore peptide, corrispondente alla sequenza amminoacidi 731–757 di PB1, con effetto inibitorio sull'interazione PB1-PB2 ed attività antivirale (Li *et al.*, 2013). Sorprendentemente gli autori hanno mostrato che quest'ultimo peptide interagisce con PB1, e non PB2 come sarebbe stato logico attendersi, suggerendo quindi che il peptide compete con PB2 per il legame a PB1. Nonostante questi due interessanti peptidi, allo stato attuale nessuna *small molecule* che prevede come bersaglio l'interazione PB1-PB2 è stata ancora riportata.

2. Scopo

Scopo di questo progetto di dottorato è quello di identificare delle *small molecules* dirette contro la polimerasi del virus dell'influenza.

L'RNA polimerasi del virus dell'influenza è un eterotrimerico costituito da tre proteine (PB1, PB2 e PA) indispensabili per la replicazione del genoma virale. L'interfaccia interazione di queste subunità sono molto conservate tra i diversi ceppi virali e non sono soggette a riassortimento genico. Per questo motivo, l'inibizione di queste interazioni potrebbe rappresentare una potenziale strategia per lo sviluppo di composti anti-influenza ad ampio spettro, ovviando al problema della variabilità antigenica e ottenendo un farmaco attivo contro qualsiasi ceppo del virus dell'influenza. Inoltre grazie alla struttura cristallografica di PA complessata con la porzione N-terminale di PB1 è stato possibile dimostrare che solo alcuni residui sono responsabili del legame tra PB1 e PA, il che suggerisce la possibilità di inibire questa interazione anche con *small molecules*. E' nostra intenzione, quindi, quale nuova strategia antivirale per combattere l'infezione dovute a IAV e IBV, sviluppare composti in grado di dissociare l'interazione tra le subunità PA e PB1 dell'RNA polimerasi virale e di conseguenza di inibire la replicazione del virus; tali composti potrebbero rappresentare un punto di partenza per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-influenza. Intendiamo partire dai risultati ottenuti da un *screening in silico* di librerie virtuali sulla base della struttura cristallografica del complesso PA-PB1, condotto precedentemente dal nostro gruppo di ricerca, che ha permesso di identificare potenziali inibitori di tale interazione (Muratore *et al.*, 2012a). Tuttavia solo una parte di essi si sono confermati come tali nell'inibire l'associazione fisica tra PA e PB1 *in vitro*.

Partendo dai composti attivi, procederemo con l'ottimizzazione della loro struttura chimica. A tale scopo verranno disegnati e sintetizzati un'ampia serie di analoghi strutturali con lo scopo di aumentare la potenza e la selettività dei composti attivi. Tutti questi analoghi verranno successivamente sottoposti ad una caratterizzazione biologica mirata a confermare la loro capacità di dissociare l'interazione fisica tra le subunità PA e PB1 sia *in vitro* che in un contesto cellulare, nonché la loro attività antivirale contro IAV e l'assenza di citotossicità in linee cellulari. Dal punto di vista chimico invece saranno effettuati degli studi di previsione di *binding* molecolare per chiarire la dinamica dell'interazione di questi composti con il bersaglio, delineando così delle relazioni struttura-attività, al fine di sviluppare ulteriori analoghi in grado di ottimizzare le interazioni con il *target* e quindi capaci di adattarsi meglio

alla relativa tasca di legame. Gli analoghi che dimostreranno le migliori attività nei saggi biologici verranno ulteriormente caratterizzati per valutare come varia il loro effetto antivirale nel tempo e la loro capacità di inibire la replicazione di vari ceppi e sottotipi di IAV, di IBV ed anche di altri virus a DNA e RNA. Dal momento che il bersaglio è conservato tra i diversi sottotipi di IAV ed anche in IBV, ma non in altri virus, ci attendiamo che questi composti possiedano un'attività anti-influenzale specifica e ad ampio spettro. In conclusione, in tale studio ci prefiggiamo di identificare una serie di nuovi *scaffold* dotati di un meccanismo specifico e selettivo contro i virus influenzali, che fornisca le basi per lo sviluppo di nuovi farmaci da essere affiancati a quelli già utilizzati nella terapia anti-influenzale.

3. Materiali e Metodi

3.1 Composti

I composti sono stati sintetizzati presso il laboratorio del Prof. G. Cruciani (Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie dell'Università di Perugia) e quello della Prof.ssa Tabarrini (Dipartimento di Tecnologie Farmaceutiche dell'Università di Perugia), solubilizzati in DMSO (dimetilsolfossido, Sigma-Aldrich) e conservati a -20°C.

Come composti di riferimento sono stati utilizzati RBV (Roche) e ganciclovir (GCV; Sigma), entrambi solubilizzati in H₂O e conservati a -20°C.

3.2 Proteine e peptidi

La proteina Glutathione-S-Transferasi (GST) è stata espressa dal plasmide pD15-GST e purificata da colture di *E. coli* BL21(DE3)/pLysS mediante cromatografia di affinità con colonne di “sepharose” coniugato a glutathione, come descritto precedentemente (Loregian *et al.*, 2004a). Le proteine 6His-PA (239-716) e GST-PB1(1-25) sono state espresse e purificate come descritto in seguito, rispettivamente nel **Paragrafo 3.10.a** e **3.10.b**

Il PB1(1–15)–Tat peptide è stato sintetizzato e purificato da Peptide Facility del Centro di Ricerca Interdipartimentale per le Biotecnologie Innovative (CRIBI) dell'Università di Padova. Questo peptide è costituito dalla porzione N-terminale (residui amminoacidici 1-15) di PB1 implicata nell'interazione con PA, fusa alla sequenza C-terminale (residui amminoacidici 47–59) della proteina Tat di HIV necessaria a mediare l'entrata all'interno della cellula.

3.3 Oligonucleotidi sintetici

Gli oligonucleotidi sintetici usati in questo lavoro di tesi sono riportati in **Tabella 3**.

Tabella 3. Sequenza degli oligonucleotidi utilizzati.

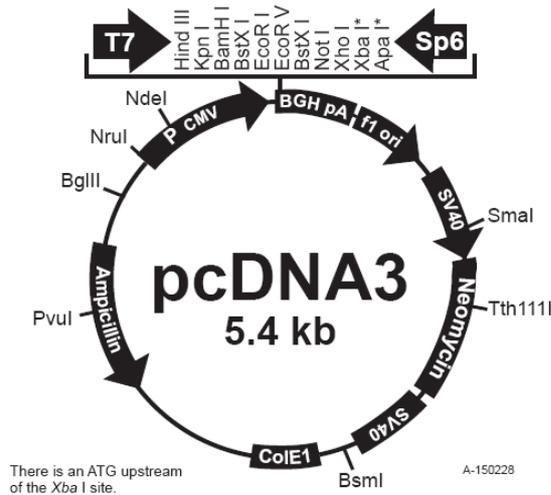
Primer	Lunghezza	Sequenza nucleotidica
pDNA PA K643L/F	45-mer	5' - GGGAAGGTCTGCAGGACTTTATTAGCACTGTCGGTATTCAACAGC -3'
pDNA PA K643L/R	45-mer	5' - GCTGTTGAATACCGACAGTGCTAATAAAGTCCTGCAGACCTTCCC - 3'
pDNA PA W706G/F	40-mer	5' - CCCTGGGTTTTGCTTAATGCTTCTGGGTTCAACTCATTCC -3'
pDNA PA W706G/R	40-mer	5' - GGAATGAGTTGAACCCAGAAGCATTAAAGCAAAACCCAGGG -3'

3.4 Plasmidi

3.4.a Plasmide pcDNA3

Il plasmide pcDNA3 (Invitrogen) è un vettore di espressione di 5.4 migliaia di paia di basi (kbp). Il vettore contiene: (1) il promotore/*enhancer* IE di HCMV che permette un livello di espressione alto ed efficiente della proteina ricombinante di interesse il cui gene viene clonato a valle; (2) il promotore T7; (3) un sito di policlonaggio per permettere l'inserzione del gene o della sequenza di DNA di interesse; (4) il sito di poliadenilazione del gene BGH (*Bovine Growth Hormone*) per avere una terminazione efficiente della trascrizione e la poliadenilazione dell'mRNA; (5) il gene per la resistenza all'ampicillina per selezionare il vettore in *E. coli* e il gene di resistenza alla neomicina per la selezione in cellule di mammifero; (6) l'origine di replicazione ColE1 che permette la replicazione del plasmide con un alto numero di copie in *E. coli* (**Figura 17**).

Figura 17. Mappa del plasmide pcDNA3.



I plasmidi pcDNA3-PA, pcDNA3-PB1, pcDNA3-PB2 e pcDNA3-NP sono stati forniti dal Prof. Paul Digard (University of Cambridge, UK) e contengono rispettivamente i geni *PA* (2200 bp) nel sito EcoRI, *PB1* (2300 bp) nel sito HindIII, *PB2* (2300 bp) nel sito BamHI o *NP* (1500 bp) nel sito EcoRI di pcDNA3. Il plasmide pPolI-Luc fornito da P. Digard contiene le sequenze non codificanti del segmento 8 del genoma del virus dell'influenza all'interno delle quali è stato inserito l'RNA codificante la luciferasi *firefly*.

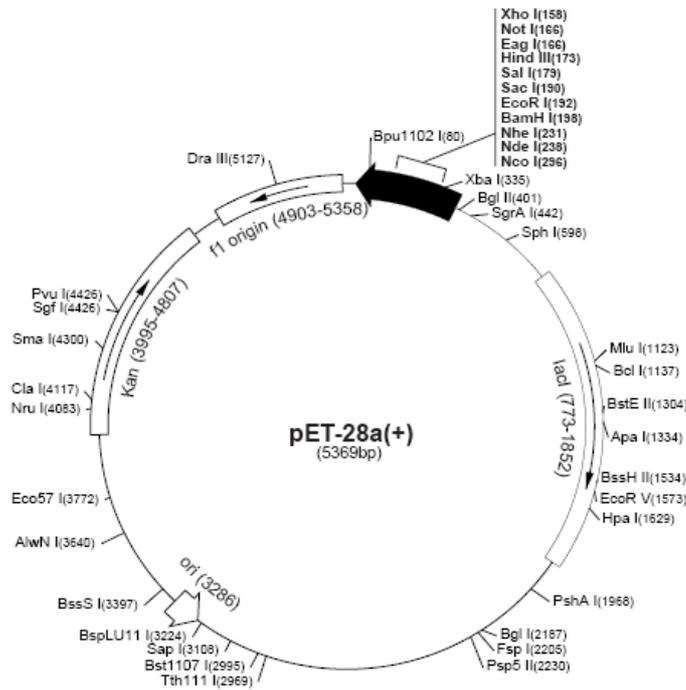
3.4.b Plasmide pD15-GST

Il plasmide pD15-GST (5,4 kb, fornito dal Prof. Donald M. Coen, Harvard Medical School, Boston, MA) è un vettore di espressione in *E. coli* che contiene il promotore per l'RNA polimerasi del fago T7, il *ribosome binding site* (RBS), un *tag* GST per purificare proteine di fusione ricombinanti in batteri. Contiene inoltre il gene codificante la resistenza all'ampicillina per il mantenimento in ceppi batterici.

3.4.c Plasmide pET28a

Il plasmide pET28a (5,4 kb; Novagen, **Figura 18**) è un vettore di espressione in *E. coli* che contiene il promotore per l'RNA polimerasi del fago T7, un *tag* di poli-istidine per una rapida purificazione di proteine di fusione ricombinanti in batteri con resine a base di nickel, un sito di policlonaggio e il terminatore per la RNA polimerasi del fago T7. Inoltre contiene il gene codificante la resistenza alla kanamicina per il mantenimento in ceppi batterici.

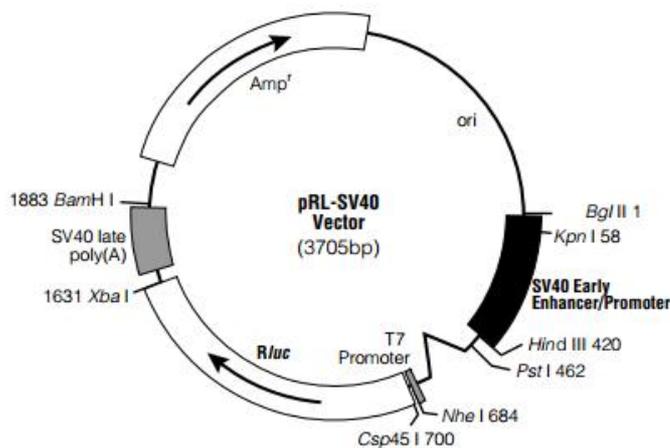
Figura 18. Mappa del plasmide pET28a.



3.4.d Plasmide pRL-SV40

Il plasmide pRL-SV40 (3,7 kb; Promega, **Figura 19**) è un vettore di espressione di un gene *reporter* utilizzato come controllo interno in cotrasfezioni di cellule eucariotiche. Il gene *reporter* è rappresentato dal cDNA codificante *Renilla* luciferasi, derivante dall'organismo marino *Renilla reniformis*. Il plasmide pRL-SV40 contiene inoltre il promotore/*enhancer* SV40 che permette un livello di espressione alto e costitutivo della *Renilla* luciferasi.

Figura 19. Mappa del plasmide pRL-SV40 (Promega).



3.5 Cellule

Cellule HEK 293T (*Human Embryonic Kidney 293T*), MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), HFF (*Human foreskin fibroblasts*), A549 (*carcinomic human alveolar basal epithelial cell*), L929 (fibroblasti murini) sono state coltivate nel terreno di Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM; Gibco[®] Life Technologies), supplementato con siero fetale bovino (*Foetal Bovine Serum*, FBS; Gibco[®] Life Technologies) al 10% precedentemente inattivato (per 30' a 56°C), penicillina e streptomina 1% finale (P/S, Gibco[®] Life Technologies). Tutte le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37°C in presenza del 5% di CO₂.

3.6 Virus

Il virus dell'influenza A/PR/8/34 è stato fornito dal Prof. Paul Digard (University of Cambridge, UK). Il virus dell'influenza di tipo A: A/WSN/67/05, A/SOLOMON ISLAND/3/06 ed il virus influenzale B/MALAYSIA/2506/4 sono stati forniti dal Dott. Cusinato (Servizio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera di Padova). L'isolato clinico A/PARMA/24/09 sono stati forniti dalla Dott.ssa Isabella Donatelli (Istituto Superiore di Sanità, Roma). I ceppi influenzali locali H1N1 della variante pandemica suina originata nel 2009 (A/PADOVA/30/2011, A/PADOVA/72/2011, and A/PADOVA/253/2011) sono stati ottenuti dal Dott. C. Salata e dalla Dott.ssa A. Calistri (Università di Padova). Il virus dell'influenza B/LEE/40 è stato fornito dal W. S. Barclay (Imperial College, London, United Kingdom).

Il ceppo AD169 virus di HCMV è stato acquistato da American Type Culture Collection; il virus della stomatite vescicolare (vesicular stomatitis virus; VSV) è stato fornito dal Prof. G. Gribaudo (Università di Torino). L'isolato clinico di adenovirus (AdV) è stato fornito dal Servizio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera di Padova.

3.7 Ceppo batterico e terreni di coltura

Il ceppo batterico *E. coli* DH5 α è utilizzato per le preparazioni di DNA plasmidico, mentre il ceppo batterico *E. coli* BL21(DE3)pLys è stato utilizzato per l'espressione delle proteine 6His-PA (239-716) e GST-PB1(1-25).

Tabella 4. Ceppi batterici utilizzati.

Ceppi di <i>Escherichia coli</i>	
Ceppo	Genotipo
DH5 α	F ϕ 80lacZAM15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k^- , m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-
BL21(DE3)pLys	<i>E. coli</i> B F $^-$ dcm ompT hsdS(r_B^- m_B^-) gal λ (DE3)[pLysS Cam r]

I genotipi di questi ceppi è riportato in **Tabella 4**. Questo ceppi batterici sono stati coltivati in terreno liquido LB (Luria-Bertani) contenente bacto-triptone 1%, estratto di lievito 0,5%, NaCl 1% oppure su terreno solido LB addizionato con bacto-agar 1,5% (LB-agar). A questi terreni è stato aggiunto l'antibiotico ampicillina (100 μ g/ml) per il mantenimento dei plasmidi.

Un terreno più ricco, il SOC, è stato utilizzato durante la trasformazione batterica per elettroporazione (bacto-triptone 2%, estratto di lievito 0,5%, NaCl 0,5%, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosio 20 mM).

3.8 Trasformazione batterica mediante elettroporazione

3.8.a Preparazione di batteri elettrocompetenti

Una singola colonia di *E. coli* DH5 α è stata inoculata in 2 ml di LB e fatta crescere *overnight* (O/N) a 37°C. In seguito, i 2 ml di coltura sono stati inoculati in 200 ml di LB ed i batteri sono stati fatti crescere per circa 3 ore fino al raggiungimento di una densità ottica (*Optical Density*; O.D.) a 600nm di circa 0,5. In seguito è stata bloccata la crescita incubando le cellule in ghiaccio per 20-25 minuti. Le cellule sono state poi centrifugate a 4000 giri al minuto (*rounds per minute*, rpm) per 10 minuti a 4°C. Il *pellet* cellulare è stato risospeso in 40 ml di acqua sterile fredda e ricentrifugato; successivamente è stato risospeso in 40 ml di glicerolo 10%, ricentrifugato e risospeso infine in 1,5 ml di GYT (glicerolo 10%, Yeast Extract

0,125%, bacto-triptone 0,25%). I batteri sono stati aliquotati (aliquote da 80 µl) e conservati a -80°C.

3.8.b Trasformazione mediante elettroporazione

La trasformazione batterica è stata effettuata aggiungendo il DNA plasmidico d'interesse (100-200 ng) ad 80 µl di batteri competenti in apposite cuvette per elettroporazione (BioRad) pre-raffreddate in ghiaccio. L'apparecchio Gene Pulser (BioRad) è stato programmato a 1,5 KV, 1000 Ω, 25 µF ed i batteri sottoposti ad uno *shock* elettrico. In seguito allo *shock* sono stati aggiunti 900 µl di SOC ed i batteri sono stati incubati in agitazione a 225 rpm a 37°C per 30 minuti. Successivamente i batteri sono stati piastrati su terreno selettivo LB-agar, al fine di selezionare i batteri trasformati e fatti crescere a 37°C O/N.

3.9 Tecniche di biologia molecolare

Sono riportate di seguito le tecniche di biologia molecolare che sono state utilizzate durante questo lavoro di tesi.

3.9.a Estrazione e purificazione di DNA plasmidico da E. coli

Per isolare il DNA plasmidico dalle cellule batteriche sono state effettuate preparazioni in piccola, media e grande scala (Miniprep, Midiprep e Maxiprep), partendo rispettivamente da colture batteriche di: 1-2 ml di per la, 50-100 ml per la Midiprep e 0,5-1 l per la Maxiprep. Successivamente il DNA plasmidico ottenuto dalle tre preparazioni è stato estratto utilizzando i protocolli relativi ai seguenti *kit*: *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Miniprep, Promega), *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Midiprep, Promega) e *Plasmid Maxi Kit* (Maxiprep, QIAGEN). La resa è stata valutata tramite tecniche spettrofotometriche descritte nel **Paragrafo** sottostante (3.9.b).

3.9.b Quantificazione degli acidi nucleici

La quantità di DNA plasmidico è stata determinata allo spettrofotometro (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific®) mediante lettura della O.D. di diluizioni degli acidi nucleici alla lunghezza d'onda di 260 nm, corrispondente al massimo picco di assorbimento per le basi azotate. Lo strumento permette di risalire alla concentrazione del DNA sfruttando la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon * l * C$$

dove A è l'assorbanza del campione, ε è il coefficiente di estinzione molare (pari a 6600 M⁻¹*cm⁻¹ per il DNA a doppio filamento e 6220 M⁻¹*cm⁻¹ per l'RNA a singolo filamento), l è la lunghezza del cammino ottico (pari a 0.1 cm) e C la concentrazione dell'acido nucleico in soluzione. La presenza di eventuali contaminazioni di tipo proteico è stata rilevata analizzando la lunghezza d'onda di 280 nm, alla quale il legame peptidico presenta il picco massimo di assorbimento. Il DNA è stato considerato sufficientemente puro quando il rapporto OD₂₆₀/OD₂₈₀ è compreso tra 1,8 e 2,0.

3.9.c Taglio di DNA con enzimi di restrizione

Le reazioni di restrizione di DNA plasmidico sono state eseguite con enzimi NE BioLabs nei rispettivi tamponi di reazione. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima (37°C) per 2-6 ore.

3.9.d Mutagenesi sito-specifica

Per ottenere i plasmidi mutati è stato utilizzato il protocollo di amplificazione previsto da QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), sfruttando le proprietà della Pfu DNA polimerasi, che replica i filamenti di DNA con alta fedeltà. La mutagenesi è stata effettuata seguendo le indicazioni riportate dal manuale del *kit*. In **Tabella 3** sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi usati per la mutagenesi. Ogni reazione di reazione a catena della DNA polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) per la mutagenesi sito specifica è stata effettuata utilizzando 25 ng del plasmide contenente l'insero da amplificare (pcDNA PA) in un volume finale di 25 µl, comprendente gli opportuni *primers forward* e *reverse* (vedi **Tabella 3**) alla concentrazione 0,2-0,25 µM, dATP, dTTP, dCTP e dGTP 250 µM, 1,25 unità

di *PfuUltra*TM *High-Fidelity* DNA polimerasi (Stratagene), 2,5µl di *buffer*, in H₂O. La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando un termociclature (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) secondo il seguente schema: denaturazione del DNA e attivazione della polimerasi (30 secondi a 95°C), 16 cicli comprendenti ciascuno una reazione di denaturazione (30 secondi a 94°C), appaiamento (1 min a 55°C) ed estensione (15 secondi a 68°C). Al termine la reazione è bloccata a 4°C. Alla fine dei cicli di amplificazione sono stati ottenuti principalmente plasmidi mutati non circolarizzati. Dopo la reazione di amplificazione, la miscela è stata raffreddata in ghiaccio per alcuni minuti e sottoposta a digestione enzimatica con 1 µl di endonucleasi di restrizione *Dpn* I (10 U/µl) per un'ora a 37°C.

L'endonucleasi *Dpn* I, specifica per il DNA metilato o semi-metilato, ha consentito di eliminare il DNA parentale dam-metilato proveniente nel DNA plasmidico originario (non mutato) da ceppi di *E. coli* quindi non generati dall'amplificazione mediata dai primer sopra elencati ma presenti. La miscela risultante è stata utilizzata per trasformare le cellule in dotazione al kit "XL1 *Blue Supercompetent Cells*" (Genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]* per *heat-shock*, mediante esposizione a 42°C per 45 secondi, preceduta e seguita da un'incubazione in ghiaccio.

3.9.e Separazione dei frammenti di DNA con gel d'agarosio

I plasmidi ed i frammenti di DNA amplificati con PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio 1-1,5% (weight/volume, w/v; SeaKem) in tampone TAE [idrossimetil amminometano (Tris)-Acetato-EDTA 1x, ossia Tris-acetato 0,04 M e EDTA 0,001M (Carlo Erba)]. Al gel d'agarosio è stato addizionato (1 µl/20ml) il colorante degli acidi nucleici Eurosafe (Euroclone), molecola che si intercala fra le basi di DNA ed emette una fluorescenza verde visibile con un transilluminatore a raggi ultravioletto (UV).

Per verificare le dimensioni dei plasmidi o dei frammenti di DNA sono stati utilizzati opportuni marcatori a peso molecolare noto, tra cui: il marcatore 1 *Kb* DNA *Ladder* (NE BioLabs; 0,5-10 Kbp) ed il *Marker VIII* (Roche/Boehringer; 19-1114 bp).

3.9.f Sequenziamento

Il sequenziamento di DNA plasmidico è stato effettuato utilizzando l'ABI PRISMTM BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer), che si basa sul metodo enzimatico di Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Tale metodo utilizza dideossinucleotidi

terminatori (ddNTPs) a cui è legato un gruppo donatore di fluorescenza (fluoresceina) collegato, tramite un *linker*, ad un gruppo accettore di fluorescenza (d-rodamina). Il *linker* assicura la massima efficienza di trasferimento di energia tra il gruppo donatore ed accettore di fluorescenza. Questi due gruppi sono associati ai ddNTPs in modo da non interferire stericamente con la reazione di incorporazione dei ddNTPs nel filamento neosintetizzato. Ognuno dei quattro ddNTPs lega un diverso gruppo accettore, che è eccitato dalla stessa lunghezza d'onda (448 nm), ma emette il massimo di fluorescenza in un diverso intervallo di lunghezza d'onda, variabile tra 500 e 700 nm (dR110 per la guanina, nel blu; dR6G per l'adenina (A), nel verde; dTAMRA per la timina, nel giallo; dROX per la citosina, nel rosso). I plasmidi da sequenziare sono stati precedentemente amplificati tramite PCR. Nella miscela di reazione sono stati mescolati 1 µl di BigDye™ Terminator Mix (Applied Biosystem); 2 µl di tampone 5x (Tris-HCl 200 mM pH 9,0, MgCl₂ 5 mM) e 700 ng di plasmide da sequenziare, in un volume finale di 20 µl. La reazione è stata condotta utilizzando un termociclatore (Thermal Cycler, Eppendorf) secondo il seguente schema:

- 95°C per 10 min

e 30 cicli comprendenti ciascuno una reazione di:

- denaturazione per 30 sec a 95°C

- appaiamento per 5 sec a 50-55°C

- estensione per 4 min a 60°C

Al termine la reazione è stata bloccata a 4°C.

In seguito alla reazione di amplificazione il DNA è stato purificato dai nucleotidi non incorporati. Ai prodotti di PCR sono stati aggiunti 16 µl di H₂O deionizzata e 64 µl di etanolo 96% e sono stati incubati per 30 min a temperatura ambiente. Successivamente la miscela è stata centrifugata per 30 min, è stato eliminato il surnatante e il DNA precipitato lavato con 100 µl di etanolo 70%. Infine il DNA da sequenziare è stato risospeso in 17 µl di tampone contenente anche formamide e incubato a 95°C per 4 min e poi messo in ghiaccio. Dopo essere stati sottoposti a tale trattamento, i frammenti amplificati sono stati sequenziali utilizzando lo strumento 3130X/Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.10 Espressione e purificazione di proteine di fusione

3.10.a Espressione e purificazione della proteina di fusione 6His-PA (239-716)

Per purificare la proteina di fusione 6His-PA (239-716), un'aliquota di *E. coli* BL21(DE3)pLys è stata elettroporata con 500 ng del plasmide pET28a-PA(239-716). Dopo aver fatto crescere la coltura O/N a 37°C in 20 ml di LB con kanamicina 50 µg/ml, questa è stata diluita 1:50 in LB con kanamicina 50 µg/ml e fatta crescere a 37°C fino al raggiungimento di una OD₆₀₀ pari a 0,8-1. Quando la coltura ha raggiunto OD₆₀₀ 0,8-1 ne è stato prelevato 1 ml, centrifugato a 13000 rpm ed il *pellet* è stato risospeso in 100 µl di *sample buffer* 1X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerolo 10%, sodio dodecilsolfato (SDS) 2%, β-mercaptoetanolo 5%, blu di bromofenolo 0,5%) e fatto bollire 5 minuti a 94°C (campione pre-induzione). L'espressione proteica è stata indotta con Isopropil β-D-1-tiogalattopiranoside (IPTG) 0,5 mM incubando a 16°C O/N. Al termine dell'induzione è stato prelevato 1 ml di coltura, centrifugato, risospeso in 100 µl di *sample buffer* 1X e sottoposto ad incubazione a 94°C per 5 minuti (campione post-induzione). La coltura è stata centrifugata a 13000 rpm ed il *pellet* è stato risospeso in tampone di lisi (Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, urea 500 mM, β-mercaptoetanolo 10 mM, imidazolo 25 mM, lisozima 1 mg/ml e inibitori di proteasi). La miscela è stata sottoposta a 2 cicli di congelamento/scongelamento e a sonicazione (5 volte per 30"). Successivamente il lisato batterico è stato centrifugato per 30 minuti a 13000 rpm a 4°C. Dal surnatante sono stati prelevati 100 µl, sono stati aggiunti 25 µl di *sample buffer* 5X; il campione è stato posto a 94°C per 5 minuti (campione surnatante). In parallelo è stata preparata la colonna con la resina NI-NTA *agarose* funzionalizzata con nichel (Qiagen) ed equilibrata con 10 volumi di tampone di lisi. Il surnatante è stato caricato in colonna ed è stato raccolto lo scarto. Si sono prelevati 100 µl dello scarto ed aggiunti nuovamente a 25 µl di *sample buffer* 5X per poi essere sottoposti a 94°C per 5 minuti (campione scarto). La colonna è stata lavata con 10-20 volumi di tampone di lavaggio (Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, urea 500 mM, β-mercaptoetanolo 10 mM, imidazolo 25 mM). La proteina è stata eluita con 10 volumi di tampone di eluizione (Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, urea 500 mM, β-mercaptoetanolo 10 mM, imidazolo 250 mM). Da ciascuna frazione sono stati prelevati 100 µl, aggiunti 25 µl di *sample buffer* 5X ed 5 minuti a 94°C. Al resto di ciascuna frazione si sono aggiunti glicerolo 20% e ditiotreitolo (DTT) 2 mM. I campioni sono stati conservati a -80°C e successivamente caricati in gel denaturante di poliacrilammide 8,5%. Come riferimento è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare *Prestained Protein Sharpmass V* (Euroclone; 11-250KDa). E' stata effettuata una corsa elettroforetica a voltaggio costante

(160 V) per circa 45 min. Le frazioni contenenti la proteina in concentrazione maggiore sono state riunite e dializzate usando una *Slide-A-Lyzer* 10K (0,5-3 ml, 10000 MWCO, Pierce) in *storage buffer* (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 mM, glicerolo 30%, DTT 5 mM) per quattro ore in lenta agitazione a 4°C. La proteina dializzata è stata: quantificata secondo metodo di Bradford (BioRad), utilizzando il kit Protein Assay (BioRad) come descritto nel Paragrafo **3.10.d**, aliquotata e conservata a -80°C.

3.10.b Espressione e purificazione della proteina di fusione GST-PB1(1-25)

Per purificare la proteina di fusione GST-PB1(1-25) un'aliquota di *E. coli* BL21(DE3)pLyS è stata elettroporata con 500 ng del plasmide pD15-PB1(1-25). Dopo aver fatto crescere la coltura O/N a 37°C in 20 ml di LB più ampicillina 100 µg/ml, questa è stata diluita 1:50 in LB contenente ampicillina 100 µg/ml e fatta crescere a 37°C fino al raggiungimento di OD₆₀₀ pari a 0,8-1. Quando la coltura ha raggiunto OD₆₀₀ 0,8-1 ne è stato prelevato 1 ml, centrifugato, ed il *pellet* risospeso in 100 µl di *sample buffer* 1X e fatto bollire 5 minuti a 94°C (campione pre-induzione). L'espressione proteica è stata indotta con IPTG 0,5 mM incubando a 16°C O/N. Al termine dell'induzione è stato prelevato 1 ml di coltura, centrifugato, risospeso in 100 µl di *sample buffer* 1X e sottoposto ad incubazione a 94°C per 5 minuti (campione post-induzione). La coltura è stata centrifugata ed il *pellet* risospeso in tampone di lisi (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerolo 20%, DTT 5 mM, lisozima 1 mg/ml e inibitori di proteasi). La miscela è stata sottoposta a 2 cicli di congelamento/scongelo e a sonicazione (5 volte per 30").

Successivamente il lisato batterico è stato centrifugato per 30 minuti a 13000 rpm a 4°C. Dal surnatante sono stati prelevati 100 µl, sono stati aggiunti 25 µl di *sample buffer* 5X; il campione è stato fatto bollire 5 minuti a 94°C (campione surnatante). È stata preparata la colonna contenente la resina *glutathione sepharose-4 fast-flow* (Amersham), funzionalizzata con glutatione ridotto, ed è stata equilibrata con 10 volumi di tampone di lisi. Il surnatante è stato caricato in colonna ed è stato raccolto lo scarto; da questo sono stati prelevati 100 µl, aggiunti a 25 µl di *sample buffer* 5X e sottoposti a 94°C per 5 minuti (campione scarto). La colonna è stata lavata con 20 volumi di tampone di lavaggio (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerolo 20%, DTT 5 mM). La proteina è stata eluita con 10 volumi di tampone di eluizione (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerolo 20%, DTT 5 mM, glutatione 40 mM). Da ciascuna frazione sono stati prelevati 100 µl, sono stati aggiunti 25 µl di *sample*

buffer 5X e sono stati fatti bollire 5 minuti. Al resto di ciascuna frazione sono stati aggiunti glicerolo 20%. I campioni sono stati conservati a -80°C e successivamente caricati in gel denaturante di poliacrilammide 12%. Come riferimento è stato utilizzato il marcatore di peso molecolare *Prestained Protein Sharpmass V* (Euroclone; 11-250KDa). E' stata effettuata una corsa elettroforetica a voltaggio costante (160 V) per circa 45 min. Le frazioni contenenti la proteina in concentrazione maggiore sono state riunite e dializzate usando una *Slide-A-Lyzer 10K* (0,5-3 ml, 10000 MWCO, Pierce) in *storage buffer* (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 mM, glicerolo 30%, DTT 5 mM) per quattro ore in lenta agitazione a 4°C. La proteina dializzata è stata: quantificata mediante il metodo di Bradford (BioRad), come descritto nel Paragrafo X, aliquotata e conservata a -80°C.

3.10.c Analisi elettroforetica di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)

I campioni sono stati caricati in gel di poliacrilammide con SDS 0,1%. Come riferimento è stato utilizzato il *marker Prestained Protein Sharpmass V* (Euroclone; 11-250KDa). E' stata effettuata una corsa elettroforetica a voltaggio costante (160 V) per circa 45 min in un tampone di corsa contenente Tris 0,3%, glicina 1,44%, SDS 0,1%.

Ciascun gel è stato poi incubato per 1 h in Blu Coomassie G-250 0,2% (Sigma), metanolo 40%, acido acetico 10% per la colorazione delle proteine, e decolorato per 1 h in metanolo 30%, acido acetico 10%.

3.10.d Determinazione della concentrazione proteica secondo il metodo di Bradford (BioRad protein assay)

Per determinare la concentrazione delle proteine purificate è stato utilizzato il BioRad *protein assay* che si basa sul metodo di Bradford; tale saggio permette di determinare la concentrazione totale di proteina, tramite un metodo colorimetrico. Il metodo di Bradford si basa sull'azione del *Coomassie brilliant blue* G-250, un colorante che, in soluzioni acide, si lega non covalentemente alle proteine grazie ai suoi gruppi sulfonici, formando composti colorati. Il *Coomassie blue* ha un picco di assorbanza a 475 nm (rosso), che in ambiente acido si sposta a 595 nm (blu) quando è legato a delle proteine. La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione. Pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica.

Si può ricavare la concentrazione proteica tramite una retta di taratura costruita mettendo in relazione concentrazioni note di γ -globuline (standard) e la loro rispettiva assorbanza a 595 nm. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione delle proteine. Tramite lo standard si può risalire così alla concentrazione incognita delle proteine totali nel campione.

3.11 ELISA

E' stato fatto il *coating* in piastre da 96 pozzetti (Nuova Aptca) per 3 ore a 37°C con 50 μ l di 6His-PA (239-716) a concentrazione finale 400 ng/ μ l. La proteina 6His-PA (239-716) è stata diluita in PBS (*Phosphate Saline Buffer*) 1X. Al termine dell'incubazione la proteina non legata è stata eliminata per inversione ed è stato fatto il bloccaggio con 100 μ l/pozzetto di albumina di siero bovino (BSA) al 2% per 1 ora a 37°C. Successivamente sono stati fatti 5 lavaggi con 200 μ l/pozzetto l di PBS 1X e Tween 20 0.3% e si è incubato con 50 μ l/pozzetto di GST-PB1 (1-25) o GST a concentrazione finale 200 ng/ μ l (diluite in PBS1 X), in presenza o meno del peptide o dei composti a diverse concentrazioni, O/N a temperatura ambiente in camera umida. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. Dopo aver effettuato 5 lavaggi con 200 μ l/pozzetto di PBS 1X e Tween 20 0.3%, ciascun pozzetto è stato incubato con anticorpo monoclonale anti-GST-HRP (GenScript, DBA Italia Cat. n° A00866) diluito 1:4000 in PBS 1X e FBS 2% per 1 ora a temperatura ambiente. Sono stati effettuati ulteriori 5 lavaggi con 200 μ l/pozzetto di PBS 1X e Tween 20 0.3%, seguiti da un'incubazione di 6 minuti circa a temperatura ambiente con 50 μ l di 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB, KPL). La reazione è stata bloccata aggiungendo 50 μ l/pozzetto di HCl diluito 1:6 in H₂O ed è stata letta l'assorbanza a 450 nm grazie ad un lettore ELISA per micropiastre (Tecan Sunrise).

3.12 Preparazione degli stocks virali

3.12.a Preparazione degli *stock* dei virus dell'influenza

Per preparare gli *stocks* virali dei ceppi dell'influenza, cellule MDCK, seminate 10⁶/ml il giorno precedente in fiasche T25 (Costar), sono state infettate ad una *Multiplicity Of Infection* (MOI) di 0.005 per ciascun ceppo virale, precedentemente diluito in terreno DMEM senza siero con BSA 0,14% e tripsina TPCK-trattata 1 μ g/ml. L'infezione è stata condotta a 37°C e

dopo un'ora sono stati aggiunti 5 ml di terreno DMEM senza siero con BSA 0,14% e tripsina TPCK-trattata 1 µg/ml (Worthington Biochemical Corporation) alle cellule infettate. L'infezione si è protratta finché era possibile osservare un esteso effetto citopatico (circa sul 90% del totale delle cellule). Al termine, il terreno di coltura è stato raccolto e centrifugato per 5 minuti a 3000 rpm a 4°C per eliminare i residui cellulari. Il surnatante così ottenuto è stato poi aliquotato e congelato a -80°C.

Una volta aliquotati e stoccati, gli *stocks* virali sono stati sottoposti a distinte titolazioni come descritto nel **Paragrafo 3.13.a**.

3.12.b Preparazione degli stock di VSV

Per preparare gli *stocks* virali di VSV, cellule L929, seminate 10^6 /ml il giorno precedente in fiasche T25 (Costar), sono state infettate con MOI di 0.01 di ciascun ceppo virale diluito in terreno DMEM senza siero. L'infezione è stata condotta a 37°C e dopo un'ora sono stati aggiunti 5 ml di terreno DMEM senza siero alle cellule infettate. L'infezione si è protratta finché era possibile osservare un esteso effetto citopatico (circa sul 90% del totale delle cellule). Al termine le cellule sono state raccolte e centrifugate per 5 minuti a 3000 rpm a 4°C per eliminare i residui cellulari. Il surnatante così ottenuto è stato poi aliquotato e congelato a -80°C.

Una volta aliquotati e stoccati, gli *stocks* virali sono stati sottoposti a distinte titolazioni come descritto nel **Paragrafo 3.13.b**.

3.12.c Preparazione degli stock di HCMV

Per preparare gli *stocks* del ceppo di HCMV (AD169) sono state infettate fiasche T75 (Costar) contenenti circa 3×10^6 HFF ciascuna, seminate il giorno precedente, a MOI di 0,01 di ciascun ceppo virale diluito in terreno DMEM con P/S, ma senza siero. L'infezione è stata effettuata per 2 ore a 37°C; al termine, gli inoculi virali sono stati rimossi con un lavaggio dei monostrati cellulari e le cellule infettate sono state incubate con circa 10 ml di terreno DMEM completo per circa 9 giorni a 37°C, finché non è stato osservato un esteso effetto citopatico nel monostrato cellulare. Al termine, le cellule sono state staccate con uno *scraper* e riunite al terreno di coltura. Dopo aver mescolato bene, il contenuto delle fiasche è stato riunito, sonicato per 10 minuti in ghiaccio per rompere le cellule e successivamente centrifugato per 5

minuti a 1800 rpm a 4°C. Il surnatante così ottenuto è stato poi aliquotato e congelato a –80°C.

Una volta aliquotati e stoccati, gli *stocks* virali sono stati sottoposti a distinte titolazioni come descritto nel **Paragrafo 3.13.c**.

3.12.d Preparazione degli *stock* di AdV

Per preparare gli *stocks* virali di AdV, cellule A549, seminate 10^6 /ml il giorno precedente in fiasche T25 (Costar), sono state infettate con MOI di 0.01 di ciascun ceppo virale diluito in terreno DMEM senza siero. L'infezione è stata condotta a 37°C e dopo due ore sono stati aggiunti 5 ml di terreno DMEM senza siero alle cellule infettate. L'infezione si è protratta per 6 giorni dove era possibile osservare al microscopio un esteso effetto citopatico (circa sul 90% del totale delle cellule). Al termine le cellule sono state raccolte e centrifugate per 5 minuti a 3000 rpm a 4°C per eliminare i residui cellulari. Il surnatante così ottenuto è stato poi aliquotato e congelato a –80°C.

Una volta aliquotati e stoccati, gli *stocks* virali sono stati sottoposti a distinte titolazioni come descritto nel **Paragrafo 3.13.d**.

3.13 Titolazione degli *stocks* virali

3.13.a Titolazione degli *stock* dei virus dell'influenza

Per titolare gli *stocks* di influenza, ottenuti come descritto nel **Paragrafo 3.12.a**, cellule MDCK sono state seminate alla concentrazione di $0,7 \times 10^6$ cellule/pozzetto in una piastra da 12 pozzetti ed incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state infettate con 250 µl di diluizioni seriali 1:10 degli *stocks* virali in doppio (da 10^{-3} a 10^{-8}). Un pozzetto per ogni piastra non è stato infettato, in modo da avere un controllo negativo d'infezione. Trascorsa 1 ora d'infezione a 37°C, è stato aggiunto 1 ml/pozzetto di terreno DMEM senza siero con BSA 0,14% e tripsina TPCk-trattata 1 µg/ml, contenente cellulosa Avicel 1,2% (w/v; FMC). Le cellule poi sono state incubate a 37°C per 2 giorni nel caso di titolazioni di ceppi di IAV per 3 giorni nel caso di titolazioni di ceppi di IBV. Al termine, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in PBS 1X. Dopo circa mezz'ora, le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% (w/v) in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state poi contate le placche virali formatesi in ciascun

pozzetto ed il titolo degli *stocks* virali è stato determinato per ogni diluizione applicando la formula seguente:

$$\frac{\text{Numero di placche ad una certa diluizione} \times \text{fattore di diluizione} \times 4}{\text{Titolo virale espresso in PFU/ml (Plaque Forming Units, unità formanti placca)}}$$

La media tra i valori di PFU/ml calcolati per le varie diluizioni ci ha permesso di determinare il titolo dello *stock*.

3.13.b Titolazione degli *stock* di VSV

Per titolare gli *stocks* di VSV, ottenuti come descritto nel **Paragrafo 3.12.b**, cellule L929 sono state seminate alla densità di 4×10^5 cellule/pozzetto in una piastra da 12 pozzetti ed incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo sono state infettate con 250 µl di diluizioni seriali 1:10 degli *stocks* virali in doppio (da 10^{-3} a 10^{-8}) per un'ora 37°C. Un pozzetto per piastra non è stato infettato, in modo da avere un controllo negativo d'infezione. Trascorsa un'ora, le cellule sono state incubate con 1 ml per pozzetto di terreno DMEM senza siero con BSA 0,14%, tripsina TPCK-trattata 1 µg/ml e cellulosa Avicel 1,2% a 37°C per 2 giorni. Al termine, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in PBS 1X. Dopo circa mezz'ora, le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% (w/v) in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state poi contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto e il titolo degli *stocks* virali è stato determinato per ogni diluizione applicando la formula seguente:

$$\frac{\text{Numero di placche ad una certa diluizione} \times \text{fattore di diluizione} \times 4}{\text{Titolo virale in PFU/ml}}$$

La media tra i valori di PFU/ml calcolati per le varie diluizioni ci ha permesso di determinare il titolo dello *stock*.

3.13.c Titolazione degli *stock* di HCMV

Per titolare gli *stocks* di HCMV, ottenuti come descritto nel **Paragrafo 3.12.c**, cellule HFF sono state seminate il giorno precedente alla densità di $1,5 \times 10^5$ cellule/pozzetto in una piastra da 24 pozzetti ed incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state infettate con 200 µl di diluizioni seriali 1:10 degli *stocks* virali in triplo (da 10^{-4} a 10^{-9}) per 2 ore a 37°C. Un pozzetto per piastra non è stato infettato, in modo da avere un controllo negativo d'infezione. Al termine dell'incubazione, l'inoculo virale è stato rimosso dai monostrati cellulari e le cellule sono state incubate con 1 ml per pozzetto di terreno completo (DMEM con FBS 5% e P/S) contenente metilcellulosa 0,6% per 10 giorni a 37°C. Al termine, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di soluzione di fissaggio (acido acetico e metanolo in rapporto 1:2). Dopo circa mezz'ora, le cellule sono state colorate con 1 ml di cristal violetto 0,4% (w/v) in MetOH/H₂O (1:4 volume/volume, v/v), lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state poi contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto e il titolo degli *stocks* virali è stato determinato per ogni diluizione, applicando la formula seguente:

$$\text{Numero di placche ad una certa diluizione} \times \text{fattore di diluizione} \times 5 = \\ \text{Titolo virale espresso in PFU/ml}$$

La media tra i valori di PFU/ml calcolati per le varie diluizioni ci ha permesso di determinare il titolo dello *stock*.

3.13.d Titolazione degli *stock* di AdV

Per titolare gli *stocks* di AdV, ottenuti come descritto nel **Paragrafo 3.12.d**, cellule A549 sono state seminate alla densità di 2×10^5 cellule/pozzetto in una piastra da 24 pozzetti ed incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo sono state infettate con 200 µl di diluizioni seriali 1:10 degli *stocks* virali in doppio (da 10^{-3} a 10^{-8}) per due ore a 37°C. Un pozzetto per piastra non è stato infettato, in modo da avere un controllo negativo d'infezione. Trascorse due ore, le cellule sono state incubate con 1 ml per pozzetto di terreno DMEM e cellulosa Avicel 1,2% a 37°C per circa 6 giorni. Al termine, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in PBS 1X. Dopo circa mezz'ora, le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state poi

contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto e il titolo degli *stocks* virali è stato determinato per ogni diluizione applicando la formula seguente:

Numero di placche ad una certa diluizione x fattore di diluizione x 5 =
Titolo virale in PFU/ml

La media tra i valori di PFU/ml calcolati per le varie diluizioni ci ha permesso di determinare il titolo dello *stock*.

3.14 Saggi di attività antivirale

3.14.a Saggi di riduzione delle placche con IAV, IBV

Cellule MDCK sono state seminate alla densità di $0,7 \times 10^6$ /ml per pozzetto in piastre da 12 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo le cellule sono state infettate con Flu di tipo A e B (ceppo A/PR/8/34, o A/WSN/67/05, o A/SOLOMON ISLAND/3/06, o A/PARMA/24/09, o A/PADOVA/30/2011, o A/PADOVA/72/2011, o A/PADOVA/253/2011, o B/MALAYSIA/2506/4, o B/LEE/40) con 30-40 PFU per pozzetto in DMEM senza FBS con BSA 0,14%, Tripsina TPCK-trattata 1 µg/ml e diverse concentrazioni dei composti da saggiare (0, 25, 50, 100 µM) o DMSO per un'ora a 37°C. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stato aggiunto un volume di DMSO affinché la concentrazione finale fosse del 0,1%. Trascorsa un'ora, è stato aggiunto ulteriore terreno DMEM senza siero con BSA 0,14%, tripsina 1 µg/ml, cellulosa Avicel 1,2% e le rispettive concentrazioni dei composti da saggiare o DMSO. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. Dopo un'incubazione a 37°C di 2 giorni per i virus influenzali di tipo A e di 3 giorni per i virus influenzali di tipo B, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in PBS 1X. Dopo circa mezz'ora, le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state poi contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto.

3.14.b Saggi di riduzione delle placche con VSV

Cellule L929 sono state seminate alla densità di 4×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 12 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state infettate a 37°C per un'ora con 30-50 PFU di VSV per pozzetto, in DMEM senza FBS. Al termine dell'incubazione, è stato aggiunto ulteriore terreno (DMEM con FBS 2%) con cellulosa Avicel 1,2% e le rispettive concentrazioni dei composti da saggiare o DMSO. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro affinché la concentrazione finale fosse del 0,1%. Dopo un'incubazione di 2 giorni in ambiente umidificato a 37°C, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in H₂O. Dopo circa mezz'ora le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state poi contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto.

3.14.c Saggi di riduzione delle placche con HCMV

Cellule HFF sono state seminate alla densità di $1,5 \times 10^5$ /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti ed incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state infettate rispettivamente con 100 PFU di HCMV (ceppo AD169) in DMEM senza FBS con P/S 1% a 37°C ed incubate a 37°C per 2. Al termine dell'incubazione, è stato rimosso l'inoculo virale, le cellule sono state lavate con PBS 1X ed è stato aggiunto terreno completo (DMEM con FBS 2% e P/S) contenente metilcellulosa 0,6% (Sigma-Aldrich) e diverse concentrazioni dei composti da saggiare. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro affinché la concentrazione finale fosse del 0,1%. Dopo un'incubazione di 10 giorni in ambiente umidificato a 37°C, il monostrato cellulare è stato fissato con metanolo e acido acetico 2:1 e colorati con cristallo violetto (Sigma). Dopo circa mezz'ora, le cellule sono state colorate con 1 ml di cristal violetto 0,4% (w/v) in MetOH/H₂O (1:4, v/v), lavate con acqua e lasciate asciugare ed infine è stata effettuata la conta delle placche virali.

3.14.d Saggi di riduzione delle placche con AdV

Cellule A549 sono state seminate alla densità di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state infettate a 37°C per due ore con 30-50 PFU di AdV per pozzetto, in DMEM senza FBS. Al termine dell'incubazione, è stato aggiunto ulteriore terreno (DMEM con FBS 2%) con cellulosa Avicel 1,2% e le rispettive concentrazioni dei composti da saggiare o DMSO. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro affinché la concentrazione finale fosse del 0,1%. Dopo un'incubazione di 2 giorni in ambiente umidificato a 37°C, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in H₂O. Dopo circa mezz'ora le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state poi contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto.

3.15 Saggi di riduzione della progenie virale di IAV

Cellule MDCK sono state seminate alla densità di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti ed incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo, le cellule sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 0,005 in DMEM senza FBS con BSA 0,14%, tripsina 1 µg/ml ed i composti da saggiare a diverse concentrazioni a 37°C. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro affinché la concentrazione finale fosse del 0,1%. Dopo un'ora è stato aggiunto terreno DMEM senza siero con BSA 0,14%, tripsina 1 µg/ml ed i composti a diverse concentrazioni o DMSO. Dopo un'incubazione di 4, 8, 12, 24 e 48 ore in ambiente umidificato a 37°C sono stati raccolti i terreni di coltura e titolati come descritto nel **Paragrafo 3.12.a**.

3.16 Saggi di citotossicità

La citotossicità dei composti è stata determinata in due differenti linee cellulari (HEK 293T e MDCK) utilizzando il metodo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoliumbromide], secondo il protocollo del “Cell Proliferation Kit I” (Boehringer Mannheim). Questo metodo è un saggio enzimatico colorimetrico che permette di quantificare l’attività delle deidrogenasi mitocondriali presenti in cellule metabolicamente attive. E’ un metodo sensibile, di facile esecuzione e veloce.

Le cellule HEK 293T e MDCK sono state seminate alla concentrazione di 2×10^4 /100 μ l per pozzetto in piastre da 96 pozzetti e trattate con varie concentrazioni di ogni composto diluito in DMEM. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ciascun esperimento. La concentrazione finale di DMSO derivante dalla soluzione del composto è stata mantenuta allo 0,1% (v/v) in tutti i campioni. Nei campioni non trattati con i composti è stato aggiunto un volume appropriato di DMSO puro, in modo da ottenere una concentrazione finale dello 0,1%.

Dopo un’incubazione di 24 ore per le cellule HEK 293T e di 48 ore per le cellule MDCK, sono stati aggiunti alle cellule 10 μ l/pozzetto della soluzione di MTT (5 mg/ml in PBS 1X). Le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C, per permettere l’incorporazione e la riduzione del tetrazonio, dopodiché sono stati ulteriormente aggiunti 100 μ l per pozzetto di soluzione solubilizzante (SDS 10%, HCl 0,01N),! per favorire la solubilizzazione dei cristalli di formazano e la lisi cellulare. Le piastre sono state poi lasciate ad incubare per altre 3 ore a 37°C, al termine del quale è stata letta l’assorbanza a 550 nm grazie ad un lettore ELISA per micropiastre (Tecan Sunrise)..

3.17 Saggi *minireplicon*

Cellule HEK 293T sono state seminate alla densità di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno seguente è stato scartato il terreno di coltura ed è stato aggiunto 250 μ l per ogni pozzetto di terreno DMEM con FBS ed antibiotici. Dopo 2 ore di incubazione a 37°C le cellule sono state trasfettate utilizzando il protocollo del calcio fosfato. Questo metodo prevede il mescolamento di una soluzione tampone HEPES contenente ioni fosfato, insieme a una soluzione di cloruro di calcio (CaCl₂) in modo da

creare la formazione di un precipitato che lega le molecole di DNA facilitandone il legame alla superficie cellulare ed il suo ingresso all'interno della cellula per endocitosi.

Ogni reazione prevedeva la trasfezione di:

- 100 ng dei plasmidi pcDNA-PA, pcDNA-PB1, pcDNA-PB2 e pcDNA-NP, per permettere l'espressione rispettivamente delle proteine PA, PB1, PB2 e NP del virus dell'influenza di tipo A
- 50 ng del plasmide pPoll-Luc che consiste in una molecola di RNA a polarità negativa che contiene il gene reporter *firefly* luciferasi, fiancheggiato da sequenze non codificate del segmento 8 genomico,
- 50 ng del plasmide pRL-SV40 che esprime costitutivamente il gene reporter della *Renilla* luciferasi e serve a normalizzare variazioni nell'efficienza di trasfezione.

Le *mix* di trasfezione sono state preparate in modo da diluire i plasmidi in una soluzione contenente CaCl₂ 200mM e H₂O in un volume finale di 25 µl per ogni reazione o pozzetto. Queste soluzioni contenenti il mix di DNA sono state poi addizionate a 25 µl di soluzione HBS 2X (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄) e dopo aver mescolato velocemente, le miscele sono state incubate a temperatura ambiente per 1 minuto, per poi esser vortexate. A questo punto sono stati aggiunti i composti a diverse concentrazioni e le risultanti miscele sono state aggiunte alle cellule ed incubate per 4 ore a 37°C. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. Terminata l'incubazione, il terreno di coltura è stato sostituito con lo stesso volume (300 µl) di terreno DMEM completo fresco con l'aggiunta di DMSO o dei composti alle stesse precedenti concentrazioni, nei rispettivi pozzetti. A 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lisate aggiungendo 50 µl di un buffer A per pozzetto (Tris fosfato 25 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, MgCl₂ 8 mM, DTT 1 mM) ed incubando 2 minuti a RT in agitazione. In seguito sono stati aggiunti 50 µl di un buffer B per pozzetto (Tris fosfato 25 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, MgCl₂ 8 mM, glicerolo 30%, BSA 2%, ATP 0,8 mM, DTT 1 mM). Il lisato cellulare è stato centrifugato 1 minuto a 13000 rpm, dopodiché 60 µl del lisato, insieme a 25 µl di luciferina 0,6 mM (Sigma), sono stati trasferiti in ciascun pozzetto di una piastra adatta alla lettura di segnali di luminescenza (Costar). Allo stesso tempo, altri 22,5 µl del lisato cellulare sono stati trasferiti in altri pozzetti della stessa o di un'altra piastra (Costar), al quale sono stati aggiunti 2,5 µl/pozzetto di *Renilla* Luciferase Assay Substrate 10X (Promega) che contiene la celenterazina, il substrato naturale della *Renilla* luciferasi. Le misurazioni della quantità di substrato metabolizzato sono effettuate al luminometro

(VICTOR™ X2 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer), poiché entrambe le reazioni sviluppano luminescenza.

Negli studi di *minireplicon* svolti per indagare l'effetto dei composti sull'attività della polimerasica virale in presenza delle mutazioni K643L e W706G sulla proteina PA, è stata eseguita una procedura identica a quella appena descritta, con l'eccezione della sostituzione del plasmide pcDNA-PA rispettivamente con il plasmide pcDNA-PAK643L (100 ng/reazione) oppure con il plasmide pcDNA-PAW706G (100 ng/reazione).

4. Risultati e discussione

4.1 Sviluppo di inibitori delle interazioni proteina-proteina tra le subunità PA e PB1

4.1.a Background

Come già accennato nell'Introduzione, siamo partiti dai risultati precedentemente ottenuti dal nostro gruppo di ricerca con uno *screening in silico* di una libreria virtuale costituita da milioni di strutture di *small molecules* (Muratore *et al.*, 2012a).

Lo *screening in silico* è stato condotto utilizzando la struttura cristallografica depositata da He e collaboratori (3CM8) in Protein Data Bank (He *et al.*, 2008). La subunità PA nella struttura riportata da He *et al.* è stata considerata il bersaglio, mentre il peptide corrispondente agli aa 1-25 di PB1 è stato considerato come ligando. Il ligando è stato virtualmente rimosso dalla cavità e le due strutture di PA e di PB1 sono state modellate separatamente. Per l'approccio *in silico* è stato necessario analizzare in primo luogo le caratteristiche intrinseche delle proteine in esame (PA e PB1). Il sito di legame di PA con il frammento di PB1 è stato analizzato utilizzando i campi d'interazione molecolare (MIFs) generati dal software GRID. Questa cavità è piuttosto idrofobica, e ciò è in accordo con il fatto che la regione di PB1 che interagisce con PA è caratterizzata da cinque legami a idrogeno intramolecolari che ne determinano una struttura piuttosto rigida e idrofobica in superficie. Grazie all'utilizzo di FLAP (Fingerprint for Ligand And Protein), un software di modellistica molecolare, è stato possibile ricavare dai MIFs alcuni punti in cui è massimale l'energia di interazione tra le subunità (Perruccio *et al.*, 2006; Baroni *et al.*, 2007). I punti così selezionati corrispondono a una precisa coordinata spaziale nel sito attivo di PA ed a una precisa interazione chimica (idrofobica, accettore di legame a idrogeno, donatore di legame a idrogeno). Un punto idrofobico della proteina tenderà ad essere esposto ad un punto idrofobico del ligando, mentre un donatore di legame ad idrogeno della proteina tenderà ad essere esposto ad un punto accettore del ligando e viceversa. E' stato quindi utilizzato FLAP per condurre uno *screening* virtuale, sulla base dei punti selezionati, di circa 3 milioni di composti presenti nel database ZINC, valutando la similarità tra le molecole presenti nel database e la cavità di PA sia dal punto di vista sterico che chimico. Questa procedura, unita all'applicazione di un *software* di *docking* (GLUE) ha consentito di selezionare circa 34000 molecole dal database iniziale. Tali molecole sono state ulteriormente processate sulle 8 conformazioni più stabili della proteina,

ricavate da studi di dinamica molecolare. Imponendo vincoli più restrittivi (da un punto di vista energetico) si è ridotto ulteriormente il numero delle molecole, ottenendone circa 300. Sebbene tale risultato sia sperimentalmente maneggiabile, un numero così elevato di composti risulta difficile da saggiare in laboratorio, perciò si è scelto di ridurre ulteriormente il numero delle molecole. Al fine di selezionare tra le 300 molecole solo quelle potenzialmente più interessanti, le molecole virtuali sono state modellate con un software che permette di valutare le proprietà farmacocinetiche dei composti in esame (chiamate anche proprietà ADME). Si è deciso di utilizzare solo molecole con appropriate proprietà farmacocinetiche, ossia aventi ben definiti valori per proprietà legate a Assorbimento Distribuzione Metabolismo ed Escrezione. Attraverso tale studio è stato possibile selezionare 65 molecole che rispondevano ai giusti requisiti ADME. Di queste 65 molecole caratterizzate, 32 erano disponibili in commercio e sono state acquistate.

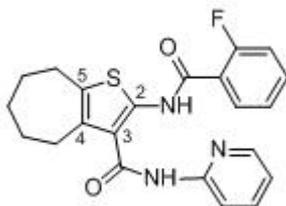
Le molecole sono state successivamente caratterizzate con diversi saggi, sia *in vitro* che in coltura cellulare. I composti **1**, **5**, **10**, **18** e **31** sono stati identificati per la loro capacità di inibire l'interazione PA-PB1 in maniera dose-dipendente, ottenendo valori di IC_{50} nel *range* del micromolare, senza tuttavia mostrare significante citotossicità in un pannello di linee cellulari ($CC_{50} > 250 \mu M$) (Muratore *et al.*, 2012a). Sulla base delle caratteristiche chimiche, le Hit **5**, **10** e **31** sono state selezionate per sviluppare degli analoghi strutturali nel tentativo di incrementare la loro abilità di dissociare l'interazione PA-PB1 ed ottenere quindi un'attività anti-influenzale più potente, mantenendo l'assenza di citotossicità. Il disegno e la caratterizzazione biologica degli analoghi delle tre diverse Hits rappresentano tre progetti distinti l'uno dall'altro e perciò saranno discussi separatamente nei seguenti paragrafi.

4.2 Sviluppo di analoghi della Hit 10

4.2.a Disegno di analoghi della HIT 10

In questo studio, condotto in collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Oriana Tabarrini dell'Università di Perugia, abbiamo selezionato la **Hit 10** e da questa *small molecule* abbiamo sviluppato dei derivati tiofene-3-carbossimide, al fine di ottenere l'ottimizzazione strutturale del composto (Massari *et al.*, 2013). Siamo partiti da questo composto in quanto, nonostante esibisse solo una modesta attività antivirale contro IAV (con valori di EC₅₀ di poco superiori a 100 µM), non mostrava segni di citotossicità (CC₅₀ > 250 µM) nelle linee cellulari MDCK e HEK 293T e soprattutto era in grado di inibire l'interazione PA-PB1 *in vitro* con un valore di IC₅₀ di 90.7 µM (Muratore *et al.*, 2012a). Dal punto di vista chimico, la **Hit 10** è costituita da un anello tetraidrociclooptatofene collegato ad un gruppo ammidico funzionalizzato con un anello aromatico sia in posizione C-2 che in posizione C-3 (**Figura 20**).

Figura 20. Struttura chimica della Hit 10.



Gli analoghi della **Hit 10** sono stati ottenuti principalmente seguendo la strategia classica della “*medicinal chemistry*”, ma anche su suggerimento dello studio computazionale ottenuto mediante l'utilizzo dell'algoritmo FLAP, in base ai risultati dei saggi biologici dei derivati già esaminati. Questa infatti, rappresenta una procedura di *docking* non classica che, utilizzando la struttura cristallografica del complesso PA-PB1, permette di valutare tutte le ipotesi sulla modalità di legame dei composti già “screenati”, cercando la miglior sovrapposizione dei GRID MIFs calcolati per la cavità di PA e per il ligando. Un'alta similarità tra MIFs della proteina e del ligando indica una modalità di legame energeticamente favorevole. Da questa analisi si può infatti predire quali correzioni possono essere apportate per incrementare le interazioni con la cavità di PA e ottenere un incremento dell'attività dei composti.

Precedenti studi svolti dal nostro gruppo di ricerca (Muratore *et al.*, 2012a) hanno rilevato l'importanza delle interazioni idrofobiche nel processo di riconoscimento tra ligando e PA. In accordo con il modello descritto da Liu & Yao (Liu & Yao, 2010), all'interno della cavità di PA s'ipotizza l'esistenza di tre regioni idrofobiche che costituiscono le tasche di legame per

eventuali inibitori. Queste tre regioni idrofobiche sono rappresentate dai tre *spot* verdi presenti nella **Figura 22**. Una prima tasca idrofobica è delineata dai residui W706 e P411 di PA, che a sua volta sono coinvolti nel legame con il residuo P5 della porzione N-terminale di PB1. La seconda tasca idrofobica invece è formata dall'interazione di P710 con il residuo L666 ed è implicata nel legame con F9 di PB1. Infine un'addizionale regione idrofobica è localizzata nel mezzo della cavità ed è principalmente generata dalle catene alifatiche del residuo E623 e il *backbone* proteico di PA.

Sulla base di queste informazioni sono stati disegnati 35 analoghi della **Hit 10** (Massari *et al.*, 2013). La maggior parte dei composti sintetizzati presentano le seguenti modifiche:

- all'anello *o*-fluorofenile posizionato in C-2 ,
- in misura minore prevedono modifiche all'anello piridinico presente in posizione C-3
- ad entrambi gli anelli (sia in C-2 che in C-3).

Infine sono stati sintetizzati anche alcuni analoghi con modifiche all'anello cicloeptano collegato in C-4 e C-5, la cui grandezza è stata ridotta in cicloesano e ciclopentano. Tuttavia l'aumento della citotossicità in quest'ultimi composti, specialmente nei cicloesano derivati, ha scoraggiato la sintesi di ulteriori analoghi.

4.2.b Caratterizzazione biologica degli analoghi della Hit 10

Tutti gli analoghi sintetizzati sono stati valutati per la loro capacità di dissociare l'interazione fisica tra le subunità PA e PB1 in esperimenti di ELISA. Questi saggi ELISA permettono di misurare specificatamente *in vitro* l'inibizione dell'interazione tra PA e PB1 in presenza di un composto attivo. Gli ELISA sono stati condotti come descritto nel **Paragrafo 3.11** e prevedono l'utilizzo delle proteine 6His-PA(239-716) e GST-PB1(1-25) purificate come riportato sopra. Riassumendo brevemente, in questo saggio viene eseguito il *coating* del fondo dei pozzetti di piastre utilizzando la proteina 6His-PA(239-716) e successivamente viene aggiunta la proteina GST-PB1(1-25) o GST come controllo. Il legame tra le due proteine è stato determinato utilizzando un anticorpo monoclonale anti-GST coniugato con la perossidasi. Aggiungendo il substrato per l'enzima, il TMB, e leggendo i valori di assorbanza è stato possibile rilevare l'interazione tra le due proteine. I valori di assorbanza ottenuti da ciascun composto ad una data concentrazione in presenza di GST-PB1(1-25) sono stati sottratti ai valori ottenuti del corrispettivo campione in presenza della proteina GST, togliendo così il *background* aspecifico. I dati ottenuti poi sono stati riportati in valore percentuale,

considerando il controllo trattato con DMSO come 100% e poi utilizzati per costruire un grafico che mette in relazione l'attività inibitoria (espressa in questo valore percentuale) con la concentrazione di composto utilizzato. Una volta ottenuto il grafico è stato possibile calcolare per ogni composto il valore di IC_{50} che esprime la concentrazione del composto che riduce del 50% l'interazione tra PA and PB1. In ogni esperimento di ELISA è stato incluso il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ come controllo positivo. Questo peptide infatti è in grado di inibire l'interazione PA-PB1 *in vitro* con un valore di IC_{50} di $\sim 35 \mu M$ (**Tabella 5**) ed è costituito dalla porzione N-terminale (amminoacidi 1-15) di PB1 implicata nell'interazione con PA, fusa alla sequenza C-terminale (amminoacidi 47-59) della proteina Tat di HIV necessaria a mediare l'ingresso del peptide PB1 all'interno della cellula.

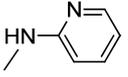
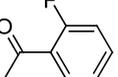
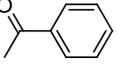
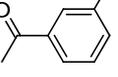
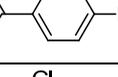
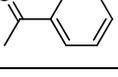
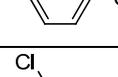
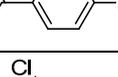
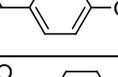
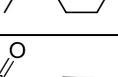
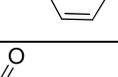
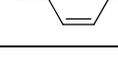
In parallelo, per ogni composto è stata valutata anche la sua attività antivirale in PRA contro il ceppo del virus dell'influenza A/PR/8/34 (PR8). L'attività antivirale è stata espressa come valore di EC_{50} , cioè la concentrazione di composto tale da ridurre del 50% la formazione di placche virali. Per controllo, alcuni campioni sono stati infettati con l'aggiunta di DMSO alla stessa concentrazione, il solvente in cui sono solubilizzati i composti, per escludere ci potesse essere un effetto inibitorio da parte del DMSO. I dati ottenuti sono stati riportati in valore percentuale considerando il controllo trattato con DMSO come 100% e poi utilizzati per costruire un grafico che mette in relazione il numero delle placche virali formatesi, espresso in questo valore percentuale, con la concentrazione di composto utilizzato. Una volta ottenuto il grafico è stato possibile calcolare per ogni composto il valore di EC_{50} . In ogni esperimento è stato incluso RBV come composto di riferimento, un noto inibitore dell'RNA polimerasi di virus ad RNA che mostra valori EC_{50} di $\sim 8 \mu M$ in esperimenti di PRA contro IAV (**Tabella 5**).

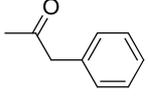
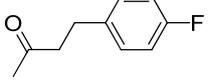
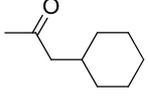
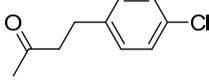
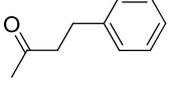
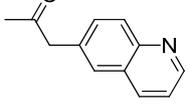
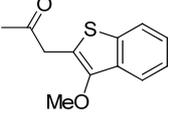
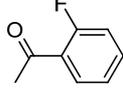
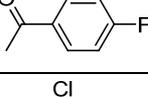
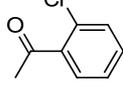
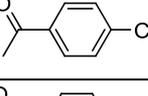
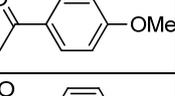
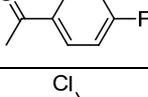
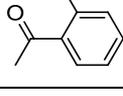
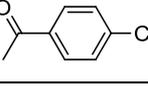
Infine, per escludere che l'eventuale attività antivirale fosse dovuta all'effetto tossico sulle cellule, tutti i composti sono stati testati in saggi di citotossicità MTT in due linee cellulari, MDCK e HEK 293T. Questo metodo si basa su un saggio enzimatico colorimetrico che utilizza come substrato il composto MTT e consente di ottenere una misura quantitativa delle cellule vive e metabolicamente attive. Tale composto è un substrato cromogenico delle deidrogenasi mitocondriali. Effettuando una lettura a 550 nm (lunghezza d'onda di assorbimento del prodotto dell'MTT) vengono misurati i valori di assorbanza relativi alle cellule trattate con ciascuna concentrazione di composto. Questi valori vengono riportati in grafico, in relazione alle concentrazioni di composto saggiate. Elaborando i dati è possibile determinare i valori di CC_{50} dei diversi composti sulle linee cellulari, che esprimono la

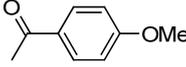
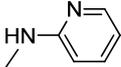
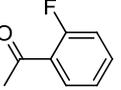
concentrazione di ogni singolo composto tale da inibire del 50% la vitalità cellulare. (**Tabella 5**).

In **Tabella 5** sono riassunti i dati relativi all'attività della **Hit 10** e di ciascun analogo sintetizzato, nei vari saggi: (ELISA, PRA e MTT) e riportate le loro strutture chimiche.

Tabella 5. Struttura e attività biologica degli analoghi della Hit 10.

Composto	Struttura			ELISA Interazione PA-PB1 IC ₅₀ (μM) ^a	PRA in cellule MDCK EC ₅₀ , (μM) ^b	Citotossicità (MTT Assay) CC ₅₀ , (μM) ^c	
	n	R'	R			cellule HEK 293T	cellule MDCK
HIT 10	3			145 ± 12	90 ± 13	>250	>250
T51	3	“		97 ± 11	>100	>250	>250
T4	3	“		>200	>100	>250	150
T5	3	“		99 ± 20	58 ± 7	>250	>250
T6	3	“		134 ± 21	39 ± 3	>250	>250
T22	3	“		32 ± 9	18 ± 2	>250	>250
T23	3	“		>200	23 ± 3	>250	>250
T24	3	“		>200	31 ± 5	231 ± 7	>250
T52	3	“		>200	20 ± 5	>250	180 ± 27
T25	3	“		>200	16 ± 1	250 ± 16	>250
T26	3	“		>200	19 ± 3	>250	>250

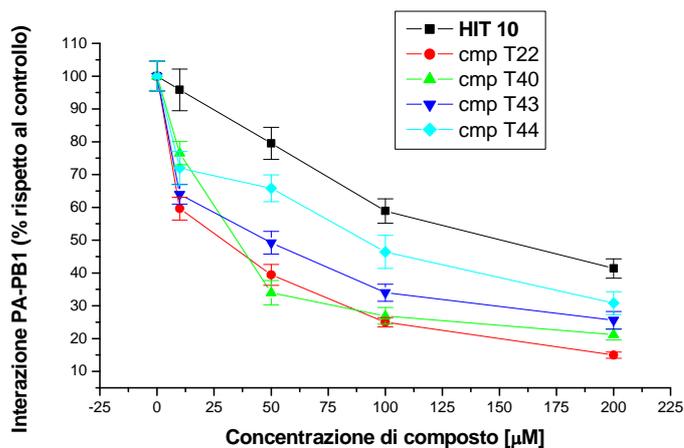
T37	3	“		>200	19 ± 1	220 ± 16	>250
T35	3	“		>200	17 ± 2	>250	>250
T39	3	“		>200	>100	>250	>250
T36	3	“		>200	18 ± 1	>250	246 ± 5
T38	3	“		>200	21 ± 2	>250	>250
T43	3	“		48 ± 12	58 ± 11	>250	>250
T44	3	“		90 ± 22	61 ± 9	>250	>250
T40	3	“	H	35 ± 10	26 ± 4	>250	>250
T9	3	NH ₂		>200	>100	>250	>250
T11	3	OEt	“	200	78 ± 3	>250	>250
T12	3	OH	“	200	76 ± 3	>250	>250
T27	3	OEt		>200	91 ± 10	>250	>250
T28	3	OEt		>200	94 ± 6	>250	>250
T29	3	OEt		>200	89 ± 10	>250	>250
T30	3	OEt		>200	95 ± 5	>250	>250
T34	3	OH		>200	81 ± 16	>250	>250
T31	3	OH		>200	79 ± 16	>250	>250
T32	3	OH		>200	43 ± 6	>250	>250

T33	3	OH		>200	52 ± 10	>250	>250
T2	2			>200	>100	60 ± 8	>250
T13	1	“	“	>200	>100	150 ± 8	>250
T8	2	NH ₂	“	>200	>100	31 ± 5	118 ± 12
T7	1	NH ₂	“	>200	>100	>250	>250
T14	1	OEt	“	>200	>100	>250	>250
T10	1	OH	“	159 ± 15	77 ± 15	>250	>250
RBV	/			N.D.	8 ± 2	>250	>250
peptide Tat-PB1₁₋₁₅	/			35 ± 10	40 ± 5	>100	>100

^a Attività dei composti in saggi ELISA d'interazione PA-PB1. Il valore di IC₅₀ rappresenta la concentrazione del composto che riduce del 50% l'interazione tra PA and PB1. ^b Attività dei composti nei saggi di riduzione delle placche, PRA, con il ceppo PR8. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. ^c Attività dei composti in saggi di MTT. Il valore di CC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che causa una diminuzione del 50% della vitalità cellulare. N.D.= non determinato. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Osservando le attività riportate nella **Tabella 5** ed il grafico rappresentato nella **Figura 21**, appare chiaro che le modifiche chimiche apportate in alcuni composti, tra cui **T22**, **T40**, **T43**, **T44**, hanno permesso un notevole aumento dell'attività degli analoghi nell'inibire l'interazione tra PA e PB1 *in vitro* rispetto al composto di partenza. In particolare, i composti **T22** e **T40** mostravano un'inibizione dell'interazione PA-PB1 più potente, ottenendo dei valori di IC₅₀ rispettivamente di 32 ± 9 μM e 35 ± 10 μM, comparabili a quelli ottenuti con il peptide di controllo (35 ± 10 μM).

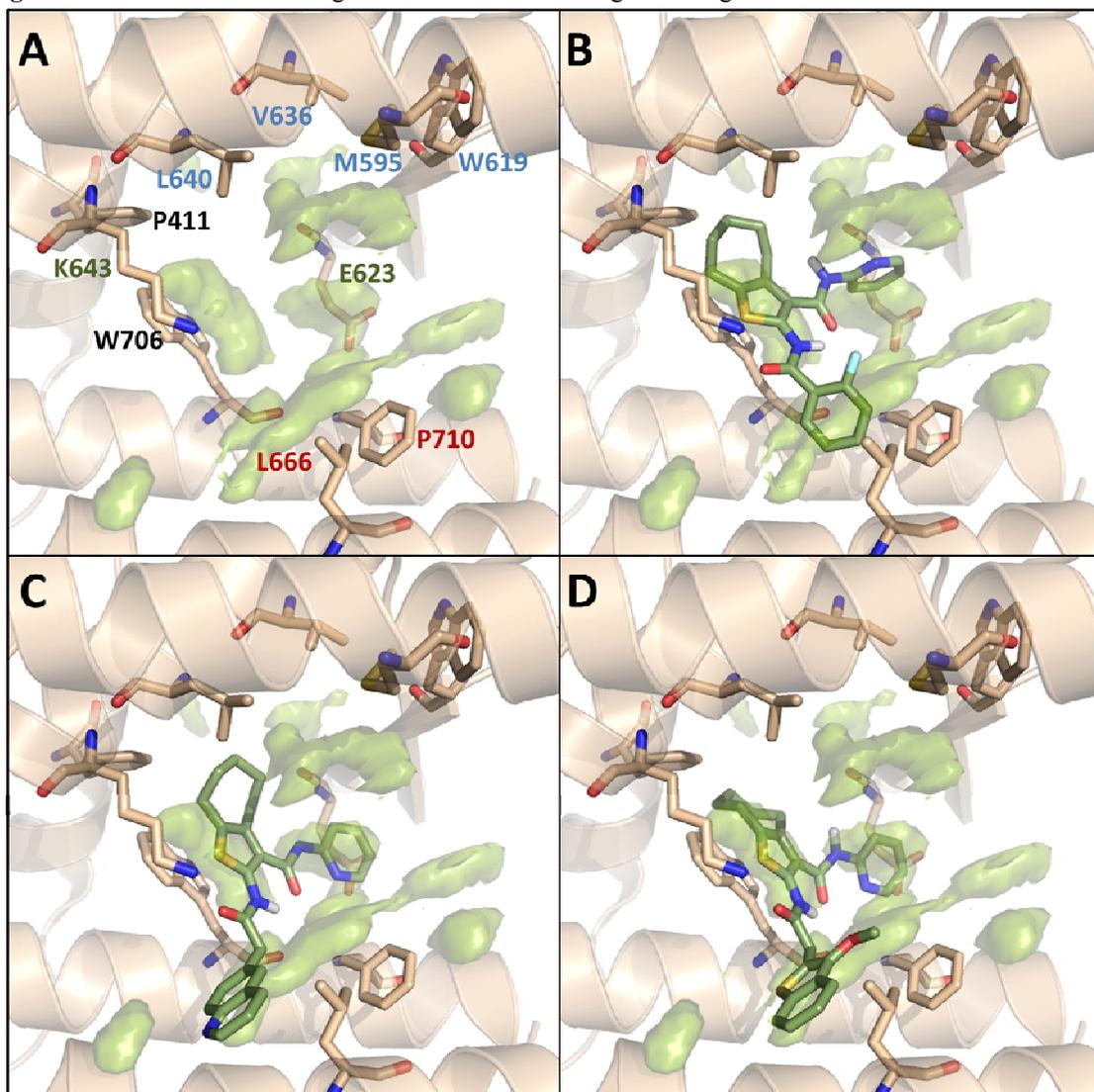
Figura 21. Comparazione dell'attività inibitoria in ELISA della Hit 10 e dei suoi analoghi più attivi.



I valori riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Da sottolineare che i composti **T43** e **T44**, disegnati su suggerimento dello studio computazionale con FLAP per aumentare le interazioni idrofobiche con la cavità di PA, si sono confermati più attivi del composto di partenza. In evidenza soprattutto il composto **T43**, che mostrava un'attività inibitoria tre volte maggiore rispetto a quella della **Hit 10**. Come confermato dalle pose di *docking* ottenute con FLAP riportate in **Figura 22**, queste diverse attività *in vitro* non sembrano corrispondere a differenti modi di legame dei tre composti. Infatti come la **Hit 10** (**Figura 22-B**), anche gli analoghi **T43** e **T44** sembrano interagire con le tre regioni idrofobiche della cavità di PA nello stesso modo (**Figura 22-C** e **Figura 22-D** rispettivamente).

Figura 22. Pose di docking della Hit 10 e degli analoghi T43 e T44 nella cavità di PA.



A) Regioni idrofobiche generate da GRID (Carosati *et al.*, 2004) nella cavità di PA della struttura cristallografica riportata da He e dai co-autori (He *et al.*, 2008). Le migliori pose di *docking* con FLAP per il: composto HIT 10 (B), composto T43 (C) e composto T44 (D). Residui che definiscono la prima (nero), la seconda (rosso), e la terza (blu) cavità come descritto da Liu & Yao sono qui riportati (Liu & Yao, 2010). Altri residui discussi nel testo sono riportati in verde.

Gli analoghi **T43** e **T44** inoltre differiscono dalla **Hit 10** solamente per il sostituito in posizione C-2 ed il composto più attivo, il derivato **T43**, possiede il sostituito più idrofobico in quella posizione, suggerendo così che una più forte interazione idrofobica con PA comporti un più difficile spiazzamento del composto e conseguentemente un' aumentata attività inibitoria.

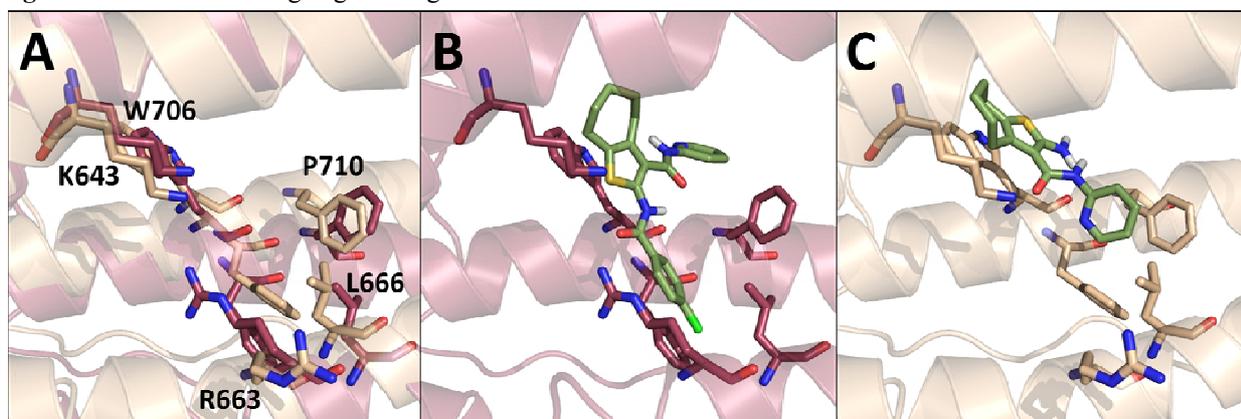
Al fine di effettuare un paragone sulle modalità di *binding* tra tutti gli analoghi attivi in ELISA, è stata analizzata e discussa anche la possibile posa di *docking* con FLAP nella cavità di PA dei composti più potenti, **T22** e **T40**, ed i risultati sono mostrati in **Figura 23**.

Il *docking* del composto **T22** nella stessa cavità risulta essere sfavorevole, dovuto all'ingombro sterico tra il *p*-cloro e il residuo P710 che definisce la seconda tasca idrofobica.

Tuttavia l'analisi della flessibilità del residuo P710, basata su studi di dinamica riportati precedentemente dal gruppo del Prof. Cruciani (Muratore *et al.*, 2012a), mostrava che il residuo P710 può ruotare quando il complesso PA-PB1 non è ancora formato, permettendo così di allargare la tasca di legame. In questo modo, il composto **T22** può adattarsi alla tasca di legame allargata e stabilire interazioni π - π tra il suo gruppo *p*-clorofenil ed il residuo W706 di PA (**Figura 23-B**). T22 inoltre può essere ulteriormente stabilizzato grazie a legami ad idrogeno con i residui R663 e K643. Quindi una spiegazione plausibile di questa potente attività di **T22** può essere dovuta alla presenza del sostituente *p*-cloro, capace di indurre un cambiamento nell'orientamento spaziale del residuo P710.

Riguardo al composto **T40**, la sua buona attività nel dissociare l'interazione PA-PB1 rappresenta un interessante risultato da analizzare, in quanto suggerisce che possedere una porzione idrofobica in posizione C-2 non è essenziale per l'attività inibitoria, come osservato con l'analogo **T43**. Inoltre le caratteristiche strutturali del composto **T40** non permettono la simultanea interazione con le tre regioni idrofobiche all'interno della cavità di PA, distinguendo così il proprio *binding mode* dalla **Hit 10** e dagli analoghi **T43** e **T44**.

Figura 23. Pose di docking degli analoghi T22 e T40 nella cavità di PA.



A) Comparazione tra la struttura cristallografica 3CM8 (rosa chiaro) e lo *span shot* dinamico (rosso scuro) di PA. Ipotesi sulla modalità di legame per i composti T22 (B) E T40 (C) nella cavità di PA ricostruita grazie a FLAP, dopo una breve minimizzazione.

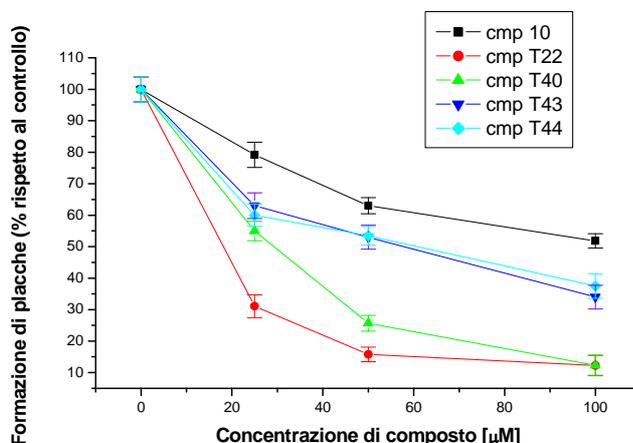
La posa del **T40** suggerita dal *docking* con FLAP infatti evidenzia una possibile interazione del composto, attraverso il gruppo piridinico, con W706 ed i residui I666 e P710 che circoscrivono la seconda tasca (**Figura 23-C**). Infine un addizionale legame ad idrogeno potrebbe verificarsi con il residuo K643 (**Figura 23-C**).

I dati ottenuti da *docking* ci hanno suggerito così delle possibili interazioni di questi composti, ma rappresentando delle ipotesi di *binding modes* dovranno essere riconfermati *in vitro*.

Passando poi ad analizzare l'attività antivirale, come atteso, tutti i derivati capaci di dissociare l'interazione PA-PB1, ossia i composti **T22**, **T40**, **T43** e **T44**, sono risultati attivi anche in

PRA nell'inibire la replicazione di IAV, con valori di EC₅₀ simili a quelli di IC₅₀ ottenuti in ELISA che variavano da 18 μM per il composto **T22** a 61 μM per il composto **T44**. In **Figura 24** è riportato il paragone tra l'attività antivirale in PRA della **Hit 10** rispetto all'attività dose-dipendente degli analoghi **T22**, **T40**, **T43** e **T44**, che evidenzia un effetto antivirale più efficace e dose-dipendente da parte dei derivati. Inoltre gli analoghi sopra citati non mostravano un profilo citotossico in nessuna delle due linee cellulari saggiate, con valori di CC₅₀ >250 μM (**Tabella 5**).

Figura 24. Comparazione dell'attività antivirale in PRA della Hit 10 e dei suoi analoghi più attivi.



I valori riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Al contrario, un dato sorprendente emerso da questo studio è che alcuni composti non attivi in ELISA erano dotati di attività antivirale a concentrazioni micromolari e non tossiche. Da un'analisi più approfondita di questi composti si può notare che l'inserimento di un gruppo mono- o di-metilenico tra il gruppo ammidico e l'anello fenilico in posizione C-2 conferisce ai composti un'eccellente attività antivirale. Infatti i derivati metilfenilici, **T25**, **T26**, e **T37**, proprio come gli analoghi etilfenilici, **T35**, **T36**, e **T38**, mostrano valori di EC₅₀ compresi tra 16 μM e 21 μM. Detto questo, risulta evidente che questi composti possiedono un alternativo meccanismo di inibizione della replicazione virale e saranno oggetto di studio nel prossimo futuro.

Un aspetto interessante da sottolineare e già accennato in precedenza è che la riduzione della grandezza dell'anello cicloeptano collegato in C-4 e C-5 a ciclopentano e soprattutto a cicloesano era associata ad un notevole aumento della citotossicità in una delle due o ad in entrambe le linee cellulari saggiate, come osservato per i composti **T2**, **T8** e **T13**. Ad

esempio, il derivato cicloesano **T8** ha ottenuto valori di CC_{50} di $31 \pm 5 \mu\text{M}$ in cellule HEK 293T e $118 \pm 12 \mu\text{M}$ in cellule MDCK.

Alla luce dei risultati ottenuti, gli analoghi **T22**, **T40**, **T43** e **T44**, che esibivano l'attività più potente verso l'interazione PA-PB1, sono stati selezionati per una più approfondita caratterizzazione che sarà discussa nei seguenti **Paragrafi 4.2.c, 4.2.d, 4.2.e e 4.2.f**.

4.2.c Studio dell'effetto di analoghi selezionati della Hit 10 sulla replicazione virale a diversi tempi post-infezione

Successivamente è stata valutata la capacità dei composti più promettenti, **T22**, **T40**, **T43** e **T44** di ridurre la progenie virale nel corso del tempo. Cellule MDCK sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 0,005 ed i composti da saggiare sono stati aggiunti a diverse concentrazioni (0, 3, 10, 30 e 100 μM). La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta allo 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro tale per cui la concentrazione finale fosse dello 0,1%. A diversi tempi post-infezione (12, 24 e 48 ore p.i.) è stato raccolto il *medium* di coltura delle cellule infettate e la progenie virale del *medium* è stata titolata mediante *plaque assay*. La RBV è stata inclusa nell'analisi come controllo positivo. Per ogni tempo di prelievo del *medium*, è stato calcolato il titolo della progenie virale ottenuta dai campioni trattati con i vari composti e rapportato con quello ottenuto nel controllo trattato solamente con DMSO, che costituisce il 100%. Dopodiché è stato costruito un grafico per ogni tempo di prelievo p.i., che mette in relazione la percentuale di carica virale ottenuta con la concentrazione di composto. Una volta ottenuto il grafico, è stato possibile calcolare per ogni composto il valore di EC_{50} .

Tabella 6. Attività antivirale degli analoghi selezionati della Hit 10 e di RBV sulla produzione di progenie virale nel tempo.

Composto	Saggio di riduzione della progenie virale EC_{50} (μM) ^a		
	12 ore p.i.	24 ore p.i.	48 ore p.i.
T22	12 \pm 3	45 \pm 6	75 \pm 10
T40	6 \pm 1	25 \pm 5	53 \pm 14
T43	20 \pm 6	23 \pm 7	32 \pm 9
T44	6 \pm 1	48 \pm 5	77 \pm 11
RBV	2 \pm 1	2 \pm 1	3 \pm 1

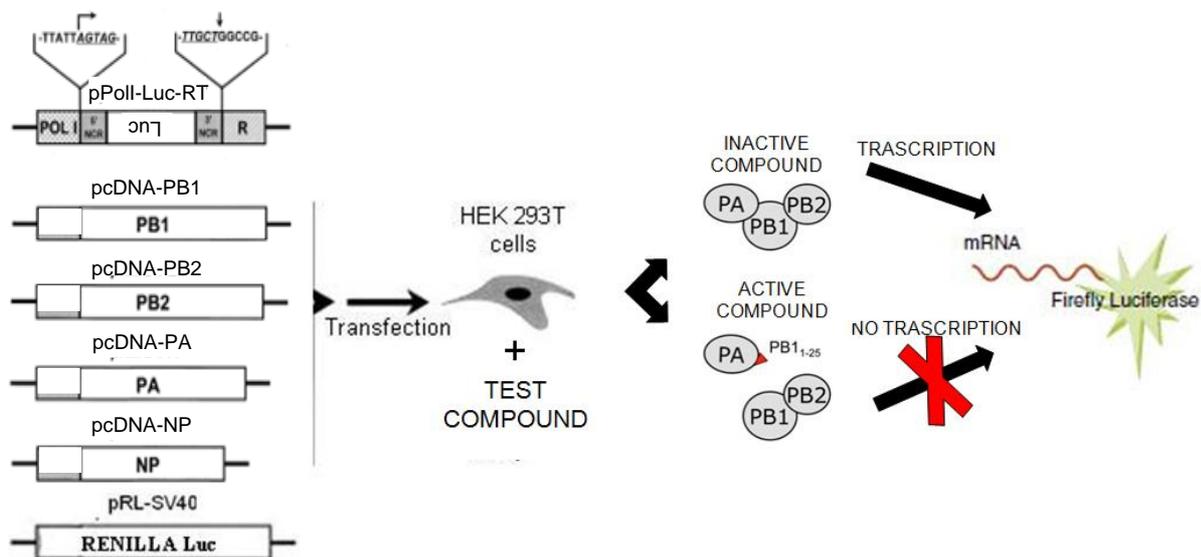
^a Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media \pm SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Osservando i dati riportati in **Tabella 6** è possibile apprezzare che ogni composto era in grado di inibire la produzione della progenie virale a 12, 24 e 48 ore post-infezione. Tuttavia i composti **T22**, **T40** e **T44** mostravano una diminuzione nell'attività antivirale nel corso del tempo. Infatti come si può vedere dalla **Tabella 6**, questi composti hanno ottenuto valori di più bassi di EC_{50} a 12 ore p.i. rispetto a quelli ottenuti a 24 e 48 ore p.i., a differenza del composto **T43** che ha ottenuto valori di EC_{50} pressoché costanti nel corso del tempo (valori di EC_{50} compresi tra 20 μ M e 32 μ M).

4.2.d Studio dell'effetto di analoghi selezionati della Hit 10 sull'attività della polimerasi virale in saggi di *minireplicon*

Successivamente si è voluta valutare la capacità degli analoghi selezionati di inibire l'attività della polimerasi virale, utilizzando un sistema cellulare in cui si mima la trascrizione virale e se ne valuta l'efficienza di inibizione. Il saggio di *minireplicon* prevede, infatti, che cellule HEK 293T vengano trasfettate con quattro diversi plasmidi esprimenti le proteine PA, PB1, PB2 e NP e un quinto plasmide contenente le estremità del segmento genomico 8 dell'influenza A all'interno delle quali è stato posto il gene *reporter* della luciferasi (**Figura 25**). Se il complesso replicativo si assembla in maniera corretta ed è attivo esso è in grado di trascrivere il gene *reporter*. L'attività trascrizionale viene misurata attraverso l'espressione di questo gene mediante lettura della luminescenza emessa. Alla mix di trasfezione viene aggiunto anche il plasmide pRL-SV40 che esprime costitutivamente il gene *reporter* della luciferasi di *Renilla* e ha lo scopo di normalizzare variazioni nell'efficienza di trasfezione. Il saggio è stato condotto aggiungendo inoltre i composti o RBV a tre diverse concentrazioni 25, 50 e 100 μ M. Per controllo, in alcuni campioni è stato aggiunto solo DMSO per escludere un'attività dovuta al solvente.

Figura 25. Rappresentazione schematica del saggio di *minireplicon* (modificato da Pleschka *et al.*, 1996).



Ciascun valore ottenuto è stato normalizzato in base all'efficienza di trasfezione. Per fare questo, è stata rapportata l'intensità di luminescenza, ovvero le RLU (*Relative Light Units*) emesse da luciferasi di *firefly* per ogni campione, con le rispettive RLU emesse da luciferasi di *Renilla*. I dati ottenuti in seguito a normalizzazione sono stati riportati in valore percentuale, considerando il controllo trattato con DMSO come 100% e poi utilizzati per costruire un grafico che mette in relazione il rapporto tra le RLU di *firefly* e di *Renilla* espresso in questo valore percentuale, in relazione alla concentrazione di composto utilizzato (**Figura 26**). In **Tabella 7** sono riportati i valori di EC_{50} per i composti e RBV.

Al fine di evitare falsi positivi d'inibizione, tutti i composti erano già stati precedentemente valutati in saggi MTT in cellule HEK 293T per determinarne l'eventuale citotossicità ma, come già accennato precedentemente, nessuno dei composti saggiati in *minireplicon* mostrava citotossicità in queste cellule alla massima concentrazione saggiata ($CC_{50} > 250 \mu\text{M}$; **Tabella 7**). Dai risultati ottenuti dai saggi di *minireplicon* si evince che i composti **T22**, **T40** e **T43**, oltre ad essere attivi in ELISA e non citotossici, erano in grado di inibire in modo dose-dipendente l'attività dell'RNA polimerasi virale (**Figura 26**). Da evidenziare inoltre che i composti **T22** e **T40** determinavano una riduzione della luminescenza in saggi *minireplicon* più potente di quella osservata in presenza del farmaco di riferimento, RBV (**Figura 26**) e ne risultavano quindi valori di EC_{50} più bassi (**Tabella 7**). Infatti i valori di EC_{50} ottenuti con i

due analoghi **T22** e **T40** erano rispettivamente di $10 \pm 2 \mu\text{M}$ e di $14 \pm 7 \mu\text{M}$, contro l' EC_{50} di $15 \pm 7 \mu\text{M}$ ottenuta con RBV.

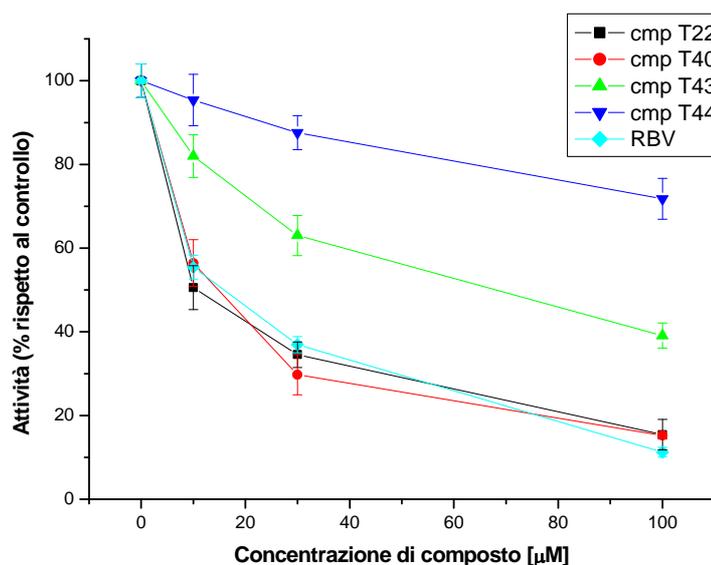
Tabella 7. Citotossicità in cellule HEK 293T ed attività contro l'RNA polimerasi virale di RBV e di analoghi selezionati della Hit 10.

Composto	Citotossicità in saggio MTT in HEK 293T CC_{50} (μM) ^a	Saggio Minireplicon EC_{50} (μM) ^b
T22	>250	10 ± 2
T40	>250	14 ± 7
T43	>250	67 ± 10
T44	>250	>100
RBV	>250	15 ± 7

^a Citotossicità dei composti in saggi MTT. Il valore di CC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che causa una diminuzione del 50% della vitalità cellulare di HEK 293T. ^b Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione del composto che reduce del 50% l'attività dell'RNA polimerasi virale in HEK 293T. Tutti i valori riportati rappresentano la media \pm SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Invece un dato inatteso è quello ottenuto con il composto **T44**, che sorprendentemente non causava una significativa diminuzione di espressione del gene *reporter* anche ad elevate concentrazioni ($\text{EC}_{50} > 100 \mu\text{M}$) e per tale ragione è stato escluso da analisi successive.

Figura 26. Attività dose-dipendente di analoghi selezionati della Hit 10 e di RBV in saggi di *minireplicon*.



I valori riportati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti.

Nonostante il composto **T43** si sia dimostrato attivo anche in questo esperimento, la sua EC_{50} ($67 \pm 10 \mu\text{M}$) è risultata molto superiore a quella ottenuta con i composti **T22** e **T40** e perciò non è stato ulteriormente caratterizzato.

4.2.e Effetto antivirale dei più promettenti analoghi della Hit 10 contro un pannello di ceppi di IAV.

Per caratterizzare ulteriormente l'attività antivirale degli analoghi della **Hit 10** con le migliori attività, **T22** e **T40**, si è deciso di saggiare questi due composti contro altri ceppi del virus dell'influenza A, ossia il virus H3N2 A/WSN/67/05, il virus H1N1 A/PARMA/24/09 e tre ceppi locali della nuova variante pandemica S-OIV (*swine-originated influenza virus*), ovvero A/PADOVA/30/2011, A/PADOVA/72/2011 e A/PADOVA/253/2011.

Cellule MDCK sono state infettate con questi virus a MOI 0,005 e trattate con diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 μM) o RBV per confronto.

Per controllo alcuni campioni sono stati infettati e, poi, trattati con DMSO, per escludere che il loro effetto dipendesse dal solvente. E' stata inclusa nel saggio anche la RBV come composto di riferimento. I valori di EC_{50} sono stati calcolati per ogni composto e riportati in

Tabella 8.

Tabella 8. Attività antivirale di RBV e dei composti in esame in PRA contro i ceppi clinici A/WSN/67/05, A/PADOVA/30/2011, A/PADOVA/72/2011, A/PADOVA/253/2011 e A/PARMA/24/09.

Ceppo virale	Composto PRA (EC_{50} , μM) ^a		
	T22	T40	RBV
A/PR/8/34 (H1N1)	18 ± 2	26 ± 4	8 ± 2
A/Padova/30/2011 (H1N1)	20 ± 4	28 ± 5	7 ± 2
A/Padova/72/2011 (H1N1)	19 ± 2	22 ± 3	6 ± 1
A/Padova/253/2011 H1N1)	21 ± 3	27 ± 2	11 ± 4
A/Parma/24/09 (H1N1) (Oseltamivir-resistente)	23 ± 3	25 ± 1	17 ± 2
A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	15 ± 1	19 ± 2	12 ± 7

^a Attività dei composti in saggi di riduzione delle placche, PRA, contro vari ceppi di IAV. Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Come mostra la **Tabella 8**, i composti T22 e T40 inibivano efficacemente tutti i ceppi di IAV saggiati, appartenenti sia al sottotipo H1N1 che H3N2, incluso anche un isolato clinico (A/Parma/24/09) resistente ad Oseltamivir. Questo dato inoltre fornisce indirettamente una conferma che i due derivati della **Hit 10** possiedono un meccanismo d'azione diverso da Oseltamivir. Osservando i risultati ottenuti, il composto **T22** si mostrava leggermente più potente del composto **T40** con valori di EC₅₀ che variavano dai 15 ai 23 µM, di poco più alti rispetto a quelli ottenuti con RBV (6-17 µM).

4.2.f Effetto antivirale dei più promettenti analoghi della Hit 10 contro IBV

Infine si è voluto saggiare l'attività antivirale di **T22** e **T40** anche contro IBV. E' stato utilizzato a tale scopo il ceppo B/Lee/40.

Cellule MDCK sono state infettate con il virus B/Lee/40 a MOI 0,005 e trattate con diverse concentrazioni di composto (25, 50 e 100 µM). Come in tutti gli altri esperimenti di PRA, è stata inclusa la RBV come controllo positivo. Alcuni campioni sono stati trattati con DMSO, per escludere che l'effetto osservato con i composti dipendesse dal solvente. I valori di EC₅₀ sono stati calcolati per ogni composto e riportati in **Tabella 9**.

Tabella 9. Attività antivirale di RBV e dei composti in esame in cellule MDCK infettate con B/Lee/40.

Composto	PRA in cellule MDCK contro B/Lee/40 (EC₅₀, µM)^a
T22	21 ± 1
T40	19 ± 1
RBV	6 ± 3

^a Attività dei composti nei saggi di riduzione delle placche, PRA, con il ceppo B/Lee/40. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Come si evince dai risultati riportati in **Tabella 9**, i composti in esame hanno confermato di poter inibire anche la replicazione di IBV, dimostrando quindi di possedere un'attività anti-

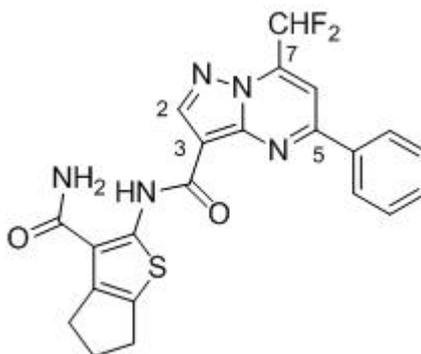
influenzale ad ampio spettro. Infatti, i composti **T22** e **T40**, proprio come RBV, riuscivano ad inibire la replicazione del virus B/Lee/40 con dei valori di EC_{50} rispettivamente di $21 \pm 1 \mu\text{M}$ e di $19 \pm 1 \mu\text{M}$, in linea con quelli ottenuti contro i vari ceppi di IAV.

4.3 Sviluppo di analoghi della Hit 5

4.3.a Disegno di analoghi della HIT 5

In questo studio, condotto in collaborazione con il gruppo del Prof. Gabriele Cruciani dell'Università di Perugia, abbiamo selezionato la **Hit 5** (**Figura 27**) per disegnare degli analoghi strutturali al fine di identificare un composto che avesse un'attività antivirale maggiore. La **Hit 5**, così come la **Hit 10**, era stata identificata nello *screening* già precedentemente descritto nel **Paragrafo 4.1.a** e si era evidenziata per la sua capacità di dissociare l'interazione PA-PB1 in ELISA e di interferire con l'attività polimerasica in *minireplicon* a concentrazioni micromolari (rispettivamente con valori di IC_{50} di $27 \pm 4 \mu\text{M}$ in ELISA e con valori di EC_{50} di $29 \pm 5 \mu\text{M}$ in *minireplicon*, come riportato in **Tabella 10**). Tuttavia non mostrava la stessa potenza nell'inibire la replicazione del ceppo PR8 in PRA (EC_{50} di $75 \pm 9 \mu\text{M}$), ma l'assenza di citotossicità confermata nelle due linee cellulari MDCK e HEK 293T (**Tabella 10**), ci ha incoraggiato nel cercare di sviluppare analoghi con una potenza antivirale maggiore.

Figura 27. Struttura chimica della Hit 5.



Per lo sviluppo di analoghi della **Hit 5** sono stati tentati due differenti tipi di approcci, ovvero:

- *virtual screening* basato su ligando attivo, utilizzando il composto **5** come *template* e cercando nuovi composti presenti nella libreria di *small molecules* dotati delle stesse caratteristiche chimiche, ma caratterizzati da *scaffold* diversi.
- SAR classica, seguendo una classica strategia di “*medicinal chemistry*” che permette di studiare le relazioni struttura-attività (*structure affinity relationship*, SAR).

4.3.b Analoghi della Hit 5 ottenuti per SAR classica

Siamo partiti dal disegno e sintesi di analoghi della **Hit 5** seguendo l'approccio di SAR classica ed in questa maniera sono stati ottenuti sette analoghi. Chimicamente, la **Hit 5** è costituita da una pirazolo[1,5-a]pirimidina collegata ad a) una porzione ciclopentatiofene carbossiammide in posizione C-3, b) un sostituente fenile in posizione C-5 e c) un gruppo difluorometilico in C-7. In questo studio, la porzione tiofenecarbossiammide è stata conservata, dal momento che questo *scaffold* si è dimostrato associato ad attività anti-influenzale, come confermato precedentemente con gli analoghi della **Hit 10** (Massari *et al.*, 2013). I derivati **69**, **48**, **47**, **82** e **83** prevedono anche il mantenimento del pirazolo[1,5-a]pirimidina, mentre il gruppo fluoro metilico, la porzione ciclopentatiofene ammide e il sostituente fenilico sono stati modificati. Ad esempio il composto **82** prevede la sostituzione dell'anello ciclopentile nella porzione tetraidrociclopentatiofene con un anello ciclo esile. Invece il composto **83** presenta la sostituzione del gruppo CHF₂ con un gruppo trifluorometile. Entrambi le precedenti modifiche, ovvero sia il gruppo trifluorometile che l'anello cicloesile, sono apportate al derivato **47**, come si può notare dalla **Tabella 10**. In questo composto sono stati poi introdotti due singoli sostituenti in posizione *para*, un gruppo metilico e un gruppo metossile, per ottenere rispettivamente i composti **69** e **48**. Dai precedenti studi era emerso che la riduzione della grandezza dell'anello alifatico fuso al tiofene è critico per l'effetto inibitorio (Massari *et al.*, 2013). Tuttavia, in questo studio abbiamo voluto valutare la variazione di attività associata alla sostituzione del gruppo ciclopentano con un anello cicloesano, apportata ai composti **82**, **47**, **69** e **48**, come già accennato. Gli ultimi due analoghi sono stati disegnati invece per capire l'effetto della sostituzione del pirazolo[1,5-a]pirimidina con un bioisostere triazolo[1,5-a]pirimidina (**70**) e con un eterociclo più piccolo come la piridina (**49**).

Una volta sintetizzati gli analoghi, ciascun composto è stato saggiato:

- in saggi MTT in cellule HEK 293T e MDCK al fine di valutarne l'eventuale citotossicità,
- in saggi ELISA per saggiare la loro capacità nel dissociare le subunità PA e PB1.

Successivamente solo quei composti senza rilevante citotossicità ed che allo stesso tempo mostravano un'attività inibitoria sull'interazione PA-PB1 sono stati ulteriormente valutati:

- in saggi PRA per esaminare la loro attività antivirale contro il ceppo PR8 di IAV,
- in saggi *minireplicon* per determinare il loro effetto sull'attività della polimerasi virale in un contesto cellulare.

In tutti gli esperimenti sono stati aggiunti sia il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ che RBV come composti di riferimento, ad eccezione dei saggi ELISA in cui è stato incluso solamente il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ come controllo positivo di inibizione. Tutti questi saggi sono stati eseguiti nella stessa maniera di quelli eseguiti con gli analoghi della **Hit 10** e sono stati ampiamente descritti nella sezione **Materiali e Metodi**. In **Tabella 10** sono riportati i dati ottenuti da questa caratterizzazione.

Tabella 10. Struttura e attività biologica degli analoghi della Hit 5 ottenuti per SAR classica.

Composto	Struttura				ELISA d'interazione PA-PB1 IC ₅₀ (μM) ^a	Saggio Mini replicon EC ₅₀ (μM) ^b	PRA EC ₅₀ (μM) ^c	Citotossicità (Saggio MTT) CC ₅₀ (μM) ^d	
	Scaffold	n	R _f	R				cellule MDCK	cellule HEK 293T
5	I	1	CHF ₂	H	27 ± 4	29 ± 5	75 ± 9	>250	>250
83	I	1	CF ₃	H	45 ± 3	27 ± 3	57 ± 15	>250	>250
82	I	2	CHF ₂	H	91 ± 7	94 ± 8	66 ± 8	>250	>250
47	I	2	CF ₃	H	120 ± 16	70 ± 6	>100	>250	>250
48	I	2	CF ₃	OMe	135 ± 14	N.D.	N.D.	40 ± 3	51 ± 3
69	I	2	CF ₃	Me	43 ± 10	64 ± 10	100 ± 14	>250	>250
70	II	2	CF ₃	H	7 ± 1	9 ± 2	24 ± 9	>250	>250
49	III	2	–	–	>200	N.D.	N.D.	>250	45 ± 3
peptide PB1₁₋₁₅-Tat	/				37 ± 6	21 ± 7	50 ± 13	>250	>250
RBV	/				N.D.	25 ± 5	16 ± 6	>250	>250

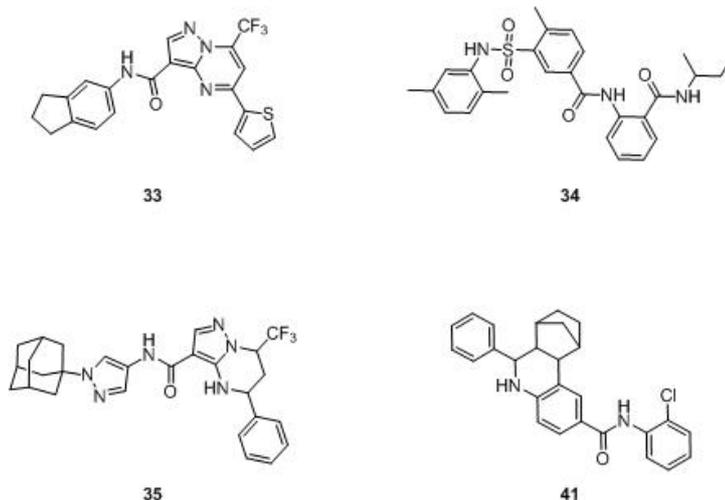
^a Attività dei composti in saggi ELISA d'interazione PA-PB1. Il valore di IC₅₀ rappresenta la concentrazione del composto che riduce del 50% l'interazione tra PA and PB1. ^b Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione del composto che riduce del 50% l'attività dell'RNA polimerasi virale in cellule HEK 293T. ^c Attività dei composti nei saggi di riduzione delle placche, PRA, con il ceppo PR8. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. ^d Attività dei composti in saggi MTT. Il valore di CC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che causa una diminuzione del 50% della vitalità cellulare. N.D.= non determinato. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Analizzando i dati riportati in **Tabella 10**, si nota che la sostituzione del gruppo ciclopentile presente nella **Hit 5** con il gruppo ciclo esile, apportata nel composto **82**, comportava un brusco calo dell'attività in ELISA (IC_{50} $91 \pm 7 \mu\text{M}$ contro $27 \pm 4 \mu\text{M}$), anche se allo stesso il composto **82** tempo mostrava un'efficacia leggermente maggiore rispetto al composto di partenza nell'inibire la replicazione del ceppo PR8 in PRA (EC_{50} di 66 ± 8 contro $75 \pm 9 \mu\text{M}$). Stesso discorso per il derivato trifluorometilico **83**, che si dimostrava più potente del composto parentale ed anche dell'**82** in PRA (con dei valori di $EC_{50} = 58 \mu\text{M}$), ma la sua attività in ELISA si rivelava quasi due volte inferiore rispetto a quella osservata per la **Hit 5** ($IC_{50} = 45 \pm 3 \mu\text{M}$). Invece il composto **47**, che possiede entrambe le sostituzioni del gruppo cicloesile e del trifluorometile presentava un calo dell'attività in tutti i saggi eseguiti. Tuttavia l'introduzione di un gruppo metile in posizione *para* nel composto **47** per ottenere il **69** comportava una maggiore attività in ELISA (IC_{50} $43 \pm 10 \mu\text{M}$), comparabile con quella osservata per la **Hit 5**. Sorprendentemente però, la sostituzione del gruppo metile del composto **69** con il gruppo metossile (**48**) era associata ad un profilo citotossico ($CC_{50} = 40 \pm 3 \mu\text{M}$ in cellule MDCK e $51 \pm 3 \mu\text{M}$ in cellule HEK 293T) ed inoltre determinava anche un effetto negativo in termini di attività, facendo così ipotizzare che la cavità di PA non si presti ad interagire con porzioni idrofile. Questa osservazione è in accordo con i nostri precedenti risultati (Muratore *et al.*, 2012a; Massari, *et al.*, 2013), indicando che le interazioni idrofobiche sono favorite per interagire con il bersaglio. L'assenza di attività in ELISA e la comparsa di citotossicità (solamente in cellule MDCK, con valori di CC_{50} di $45 \pm 3 \mu\text{M}$) osservate anche in presenza del composto **49**. Tutt'altro risultato invece è stato ottenuto sostituendo di nuovo l'anello centrale con un bioisostere triazolo[1,5-a]pirimidina ed il conseguente spostamento del gruppo carbossilico dalla posizione 3- alla 2-, che conferisce al composto **70** un'attività inibitoria molto potente. Il composto **70** infatti era in grado di dissociare il legame di PA con PB1 in ELISA con valori di IC_{50} di $7 \pm 1 \mu\text{M}$ e di interferire con l'attività catalitica della polimerasi virale con valori di EC_{50} di $9 \pm 2 \mu\text{M}$. Di poco più alti invece sono i valori di EC_{50} ottenuti con il composto **70** in PRA (EC_{50} di $24 \pm 9 \mu\text{M}$), dimostrando quindi di possedere un'attività antivirale 3 volte più potente rispetto alla **Hit 5**. In base a questi risultati si può affermare che il disegno di analoghi per SAR classica ha conseguito buoni risultati nell'ottimizzazione del composto, originando il composto **70** che è emerso come il composto più promettente di questa serie di derivati ed è stato oggetto di ulteriore caratterizzazione, come riportato nei seguenti paragrafi.

4.3.c Analoghi della Hit 5 ottenuti per Virtual Screening

In parallelo sono stati cercati analoghi della **Hit 5** usando FLAP non più per trovare la similarità fra cavità di PA e ligando, ma direttamente la similarità fra il composto attivo ed altre molecole presenti nel *database* commerciale ZINC, quindi è stato effettuato uno *screening* non più basato sulla struttura della proteina ma direttamente su un ligando attivo. Da questo *screening* virtuale sono stati identificati 293 composti con similarità con la **Hit 5** e quattro di essi sono stati selezionati sulla base del loro punteggio di similarità e prendendo in considerazione la loro disponibilità, il loro costo e la loro *druggability*. Le strutture di questi composti sono riportate in **Figura 28**. Nessuno dei quattro composti mostrati in **Figura 28** possiede la porzione tiofene-3-carbossiammide.

Figura 28. Struttura chimica degli analoghi della Hit 5 ottenuti per *virtual screening*.



Una volta sintetizzati gli analoghi, ciascun composto è stato saggiato:

- In saggi MTT in cellule HEK 293T e MDCK al fine di valutarne l'eventuale citotossicità,
- In saggi ELISA per saggiare la loro abilità nel dissociare le subunità PA e PB1,
- In saggi PRA per esaminare la loro attività antivirale contro il ceppo PR8 di IAV,
- In saggi *minireplicon* per determinare il loro effetto sull'attività della polimerasi virale in un contesto cellulare.

In tutti gli esperimenti sono stati aggiunti sia il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ che RBV come composti di riferimento, ad eccezione dei saggi ELISA in cui è stato incluso solamente il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ come controllo positivo di inibizione. Tutti questi saggi sono stati eseguiti nella stessa

maniera di quelli eseguiti con gli analoghi della **Hit 10** e sono stati ampiamente descritti nella sezione **Materiali e Metodi**.

Tabella 11. Caratterizzazione biologica degli analoghi della Hit 5 ottenuti per *virtual screening*.

Composto	ELISA d'interazione PA-PB1 IC ₅₀ (μM) ^a	Saggio Minireplicon EC ₅₀ (μM) ^b	PRA in cellule MDCK EC ₅₀ (μM) ^c	Citotossicità (Saggio MTT) CC ₅₀ (μM) ^d	
				cellule HEK 293T	cellule MDCK
HIT 5	27 ± 4	29 ± 5	75 ± 9	>250	>250
33	35 ± 4	34 ± 3	42 ± 5	12 ± 2	18 ± 2
34	30 ± 6	46 ± 4	19 ± 4	>250	>250
35	>200	N.D.	N.D.	30 ± 4	20 ± 3
41	>200	>100	>100	>250	>250
peptide Tat-PB1₁₋₁₅	37 ± 6	21 ± 7	51 ± 14	>250	>250
RBV	N.D.	25 ± 5	16 ± 6	>250	>250

^a Attività dei composti in saggi ELISA d'interazione PA-PB1. Il valore di IC₅₀ rappresenta la concentrazione del composto che riduce del 50% l'interazione tra PA e PB1. ^b Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione del composto che riduce del 50% l'attività dell'RNA polimerasi virale in cellule HEK 293T. ^c Attività dei composti in saggi di riduzione delle placche, PRA, con il ceppo PR8. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. ^d Attività dei composti in saggi MTT. Il valore di CC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che causa una diminuzione del 50% della vitalità cellulare. N.D.= non determinato. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

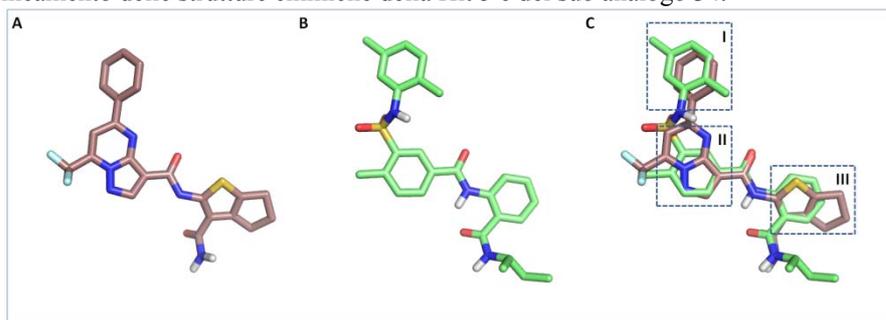
Analizzando i dati riassunti in **Tabella 11**, si evince che due degli analoghi ottenuti dallo *screening* risultavano essere notevolmente tossici sia in cellule HEK 293T e MDCK. Si tratta del composto **33**, che aveva ottenuto dei valori di CC₅₀ di 12 ± 2 μM in HEK 293T e 18 ± 2 μM in MDCK, e del derivato **35** che a sua volta possiede una CC₅₀ di 30 ± 4 μM in HEK 293T e di 20 ± 3 μM in MDCK. Il composto **33**, a differenza dell'analogo **35**, è risultato attivo nell'inibire l'interazione PA-PB1, accompagnata da attività antivirale in PRA, tuttavia a concentrazioni molto simili ai valori di CC₅₀ precedentemente riportati. Al contrario, il composto **41**, non esibiva fenomeni di citotossicità fino alla massima concentrazione saggiata, (250 μM), ma sfortunatamente non mostrava alcun effetto antivirale, nè tantomeno alcuna inibizione *in vitro* o in ambito cellulare sul legame tra le subunità virali PA e PB1. Per questo motivo tutti e tre i composti, **33**, **35** e **41**, non sono stati ulteriormente caratterizzati. Degno invece di più profonda caratterizzazione è stato il composto **34**. Infatti questo composto,

analogamente a quanto già osservato con la **Hit 5**, si è rivelato un buon inibitore dell'interazione tra PA e PB1 sia *in vitro* che in saggi di *minireplicon*. Inoltre da sottolineare il fatto che il derivato **34** ha dimostrato di inibire la replicazione di IAV molto più efficacemente della **Hit 5**, senza risultare tossico nelle due linee cellulari in cui è stato saggiato. Confrontando i valori di EC_{50} ottenuti in PRA con le due *small molecules*, si nota infatti che il composto **34** ($EC_{50} = 19 \pm 4 \mu\text{M}$) possiede un'attività antivirale 4 volte più potente rispetto al composto di partenza ($EC_{50} = 75 \pm 9 \mu\text{M}$), emergendo senza dubbio come il più promettente tra gli analoghi ottenuti da questo *screening*.

4.3.d Previsioni sulla modalità di legame della Hit 5 e del composto 34

Gli studi precedenti riguardanti le proprietà antivirali dell'analogo **34** avevano messo in luce importanti proprietà inibitorie di questo composto e successivamente abbiamo voluto investigare se questo analogo condividesse la stessa modalità di *binding* del composto di partenza, la **Hit 5**. A questo scopo prima di tutto abbiamo analizzato l'allineamento delle strutture chimiche dell'analogo **34** e della **Hit 5**. Nonostante queste molecole possedessero *scaffold* notevolmente differenti, l'allineamento delle due strutture, riportato nella **Figura 29**, rivela che i due composti sono molto simili in termini di grandezza e di forma tridimensionale ed inoltre entrambi presentano tre gruppi aromatici (nominati **I**, **II**, e **III**) disposti spazialmente in modo molto simile.

Figura 29. Allineamento delle strutture chimiche della Hit 5 e del suo analogo 34.

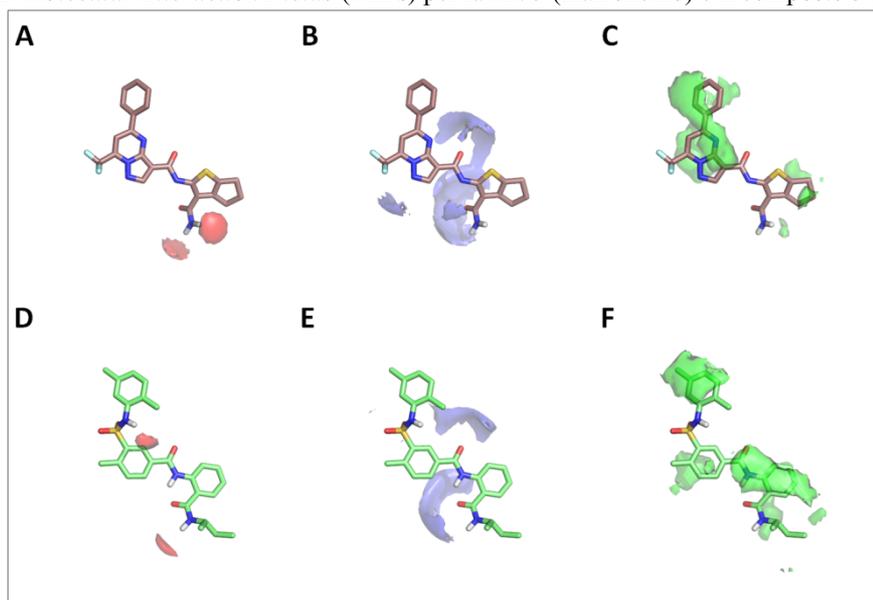


(A) struttura chimica della Hit 5 usata come *template*; (B) Conformazione dell'analogo 34; (C) sovrapposizione del composto 34 con la Hit 5. Le regioni idrofobiche simili delle due molecole sono evidenziate e nominate I, II, e III.

Da considerare anche che i due composti possiedono due gruppi ammidici che si sovrappongono: il primo gruppo ammidico connette il blocco **II** con il blocco **III**, mentre il secondo rappresenta un sostituente della porzione C. La somiglianza nelle direzionalità dei legami ad idrogeno dei gruppi ammidici farebbe quindi supporre un'interazione simile dei due

composti con PA. Con l'intento di verificare questa ipotesi, è stato valutato anche un confronto tra i GRID MIFs delle strutture chimiche dei due composti, che fornisce informazioni sulla possibile interazione con il bersaglio. Nella **Figura 30** sono illustrati i GRID MIFs dei due composti relativi a: donatori di legami ad idrogeno (blu), accettori di legami ad idrogeno (rosso) ed interazioni idrofobiche (verde). Dall'analisi dei GRID MIFs nell'allineamento tra le due strutture si possono apprezzare differenze sulla possibile modalità d'interazione con il *target*. Infatti malgrado ci siano somiglianze nelle possibili interazioni come accettori e donatori di legami ad idrogeno, le interazioni idrofobiche sembrano essere distribuite in un modo differente nei due composti. Infatti la **Figura 30** mostra che il gruppo sulfamidico che connette il blocco **I** con il blocco **II** nel composto **34** ha caratteristiche simili al gruppo tiofene della **Hit 5**, ma questa porzione è posizionato nella regione che connette il blocco **II** con il **III**.

Figura 30. GRID Molecular Interaction Fields (MIFs) per la Hit 5 (marroncino) e il composto 34 (verde).



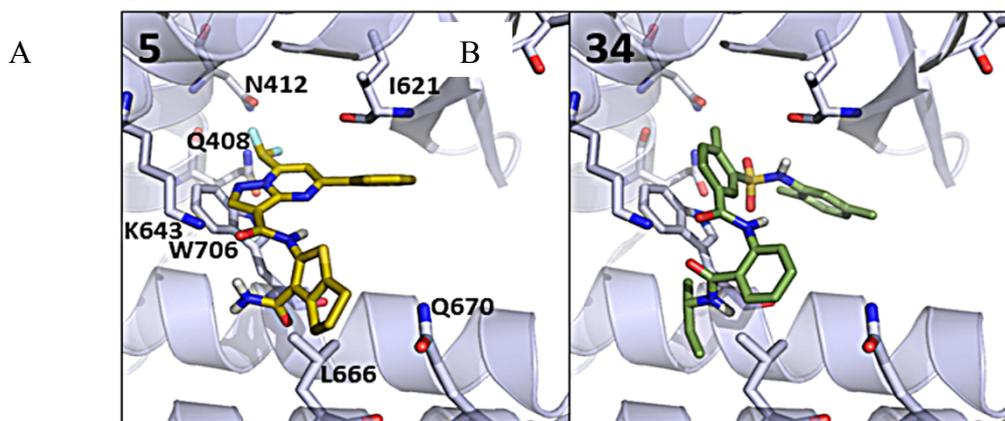
Le immagini A e D illustrano le possibili interazioni come accettori di legami ad idrogeno (campi rossi), le immagini B ed E illustrano le possibili interazioni come donatori di legami ad idrogeno (campi blu), le immagini C e F mostrano le interazioni idrofobiche (in verde).

Sulla base di queste considerazioni è possibile ipotizzare che le diverse attività mostrate dalla **Hit 5** e dal suo analogo **34** possano essere riconducibili a differenti interazioni con amminoacidi idrofobici nella cavità di PA.

Come ulteriore conferma, abbiamo comparato le pose di *docking* dei due composti in questione nella cavità di PA, ottenute durante il processo iniziale dello *screening* sopra descritto (**Paragrafo 4.3.c**). Le miglior pose del composto di partenza (**Hit 5**) e del suo

analogo **34** sono state generate con FLAP per ottimizzare le interazioni nella cavità di PA e sono riportate in **Figura 31**.

Figura 31. Migliori pose di docking della Hit 5 e del composto 34 nella cavità di PA ottenute con FLAP.



(A) Miglior posa per la Hit 5 calcolata da FLAP; (B) Miglior posa per il composto 34 calcolata da FLAP.

Dall'analisi delle pose di *docking* dei due composti ottenute con FLAP, si può osservare che entrambe le molecole orientano il blocco **II** verso il residuo W706 di PA. Come menzionato precedentemente (**Paragrafo 4.1.a**), la prima delle tre tasche idrofobiche presenti all'interno della cavità di PA e identificata da Liu e Yao è definita dai residui W706 e P411 (Liu & Yao, 2010). In particolar modo W706 è stato suggerito esser un residuo critico nell'interazione con PB1 (Muratore *et al.*, 2012a). La posa di *docking* del **34** sembra suggerire che tale composto abbia un orientamento favorevole per sviluppare interazioni π - π con W706. Inoltre, l'analogo **34** sembra stabilizzato da due legami ad idrogeno con i residui K643 e I621; mentre un terzo addizionale legame ad idrogeno può verificarsi tra Q408 di PA e il gruppo sulfamidico del composto **34**, anche se la rigida struttura a raggi x usata non permette una geometria ottimale. Al contrario, la **Hit 5** sembra essere coinvolta con un solo legame ad idrogeno con K643, in quanto manca un donatore di legami ad idrogeno rivolto verso I621. In aggiunta, il gruppo CF_2H della **Hit 5** è orientato verso Q408, ma l'entità da donatore di legami ad idrogeno di CHF_2 è piuttosto debole (Alkorta *et al.*, 2000). Riassumendo, il complesso PA-composto **34** sembra essere notevolmente più stabile rispetto a quello di PA con la **Hit 5**, grazie alla sua interazione π - π meglio orientata con W706 e all'addizionale punto di ancoraggio di legame ad idrogeno rappresentato dalla porzione sulfamidica.

È interessante inoltre notare che tutti i residui implicati nell'interazione con il composto **34** sono altamente conservati, non solo in tutti i ceppi di IAV, ma anche in ceppi di IBV, suggerendo quindi che una forte interazione con questi residui sia responsabile dell'attività anti-influenzale ad ampio spettro di questo composto contro IAV e IBV.

4.3.e Disegno degli analoghi del composto 34

Considerando che lo sviluppo di analoghi della **Hit 5** per SAR classica, seguendo la strategia classica della “*medicinal chemistry*”, aveva portato ad una buona ottimizzazione della **Hit 5** e considerando inoltre che il composto **34** possiede delle attività migliori del composto di partenza, si è voluto sviluppare degli analoghi per SAR classica anche per il derivato **34**. Prima di tutto abbiamo deciso di sintetizzare i composti **64** e **65**, che differiscono dal composto di partenza per la rimozione di uno (**64**) o di tutti (**65**) i sostituenti metilici. Infatti, i gruppi metilici non sembrano direttamente coinvolti in specifiche interazioni con i residui proteici di PA, ma possono avere un ruolo importante nel potenziare le interazioni idrofobiche, poiché è noto e già ampiamente discusso, che la cavità di PA ha una natura principalmente idrofobica (Liu & Yao, 2010; Muratore *et al.*, 2012a; Massari *et al.*, 2013). Inoltre, Liu e Yao hanno dimostrato che le tre tasche idrofobiche all’interno della cavità di PA coprono un’area più vasta rispetto al sito di legame dei nostri inibitori (Liu & Yao, 2010). Anche studi di *docking* sul composto **34** nella cavità di PA rivelavano la possibilità di estendere la struttura dei composti per investigare se altri residui proteici risultano critici nell’inibizione. Per tali ragioni, abbiamo pensato di sintetizzare i composti **67** e **68** in cui è stato aggiunto un anello aromatico alle due estremità del composto **34**. Un legame ammidico è stato usato per mimare le caratteristiche “*peptide-like*” nelle loro strutture. Infine, il composto **66** è stato disegnato con l’introduzione di un gruppo ossidrilico in posizione *para*, mirato a valutare possibili interazioni polari nella cavità di PA.

4.3.f Caratterizzazione biologica degli analoghi del composto 34

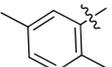
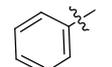
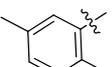
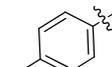
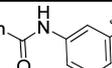
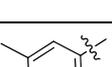
Una volta sintetizzati gli analoghi, ciascun composto, come i precedenti, è stato saggiato:

- In saggi MTT in cellule HEK 293T e MDCK al fine di valutarne l’eventuale citotossicità,
- In saggi ELISA per saggiare la loro abilità nel dissociare le subunità PA e PB1,
- In saggi PRA per esaminare la loro attività antivirale contro il ceppo PR8 di IAV,
- In saggi *minireplicon* per determinare il loro effetto sull’attività della polimerasi virale in un contesto cellulare.

In tutti gli esperimenti sono stati aggiunti sia il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ che RBV come composti di riferimento, ad eccezione dei saggi ELISA in cui è stato incluso solamente il peptide Tat-

PB1₁₋₁₅ come controllo positivo di inibizione. Tutti questi saggi sono stati eseguiti nella stessa maniera di quelli effettuati con gli analoghi della **Hit 10** e sono stati ampiamente descritti nella sezione **Materiali e Metodi**. In **Tabella 12** sono riportati i dati ottenuti da questa caratterizzazione.

Tabella 12. Struttura e attività biologica degli analoghi del composto 34.

Composto	Struttura			ELISA d'interazione PA-PB1 IC ₅₀ (μM) ^a	Saggio Minireplicon EC ₅₀ (μM) ^b	PRA in cellule MDCK EC ₅₀ (μM) ^c	Citotossicità (Saggio MTT) CC ₅₀ (μM) ^d	
	R	R'	Ar				cellule HEK 293T	cellule MCDK
34	<i>i</i> -Bu	Me		30 ± 6	46 ± 4	19 ± 4	>250	>250
64	<i>i</i> -Bu	H		9 ± 1	17 ± 1	30 ± 4	>250	>250
65	<i>i</i> -Bu	H		84 ± 5	25 ± 6	35 ± 10	>250	>250
66	<i>i</i> -Bu	H		>200	82 ± 5	>100	>250	>250
67	<i>i</i> -Bu	Me		>200	>100	>100	>250	>250
68	Ph	Me		92 ± 16	>100	25 ± 8	>250	70 ± 5

^a Attività dei composti in saggi ELISA d'interazione PA-PB1. Il valore di IC₅₀ rappresenta la concentrazione del composto che riduce del 50% l'interazione tra PA e PB1. ^b Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione del composto che riduce del 50% l'attività dell'RNA polimerasi virale in cellule HEK 293T. ^c Attività dei composti in saggi di riduzione delle placche, PRA, con il ceppo PR8. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. ^d Attività dei composti in saggi MTT. Il valore di CC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che causa una diminuzione del 50% della vitalità cellulare. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Dai risultati ottenuti in **Tabella 12** risulta evidente che la sostituzione dell'anello N-fenilico dal gruppo sulfamidico non incide sulla citotossicità, così come la rimozione di gruppi metilici. Al contrario, la modifica apportata nel composto **68**, ovvero la sostituzione del gruppo *i*-butile sulla parte terminale ammidica con un gruppo fenilico, comporta la comparsa di citotossicità in cellule MDCK. Lo stesso composto **68** mostra inoltre una modesta attività in ELISA (IC₅₀ = 92 ± 16 μM), accompagnata da un'interessante attività antivirale in PRA

($EC_{50} = 25 \pm 8 \mu M$), sebbene influenzata probabilmente dal profilo citotossico della molecola. Passando poi ad analizzare l'effetto associato alla rimozione dei gruppi metilici dall'anello aromatico, ci siamo concentrati sui risultati ottenuti con i composti **64** e **65**. Comparando i risultati ottenuti con i due analoghi in ELISA in relazione a quelli ottenuti con il composto di partenza (il composto **34**), si può concludere che la presenza di gruppi metilici comporti un leggero cambiamento di attività, ma non è cruciale per la conservazione dell'attività antivirale. Infatti la rimozione di un solo (**65**) o di tutti e tre i gruppi metilici (**64**) presenti sull'anello aromatico non causa l'abolizione dell'attività inibente dei composti, ma porta a risultati all'incirca comparabili a quelli ottenuti con il composto **34**. Infatti paragonando i valori di IC_{50} ottenuti in saggi ELISA con i due analoghi, **64** e **65**, rispetto al composto di partenza, si nota solo una leggera diminuzione di attività con il composto **65** e al contrario un più marcato aumento nella capacità di inibire l'interazione PA-PB1 con il derivato **64**. Analizzando invece i dati ottenuti con i due composti, **64** e **34**, in saggi *minireplicon*, si nota un netto incremento di attività da parte dell'analogo **64**, pari al doppio di quella osservata con il composto **34**. Anche in questo caso, il composto **64** risultava il più efficace tra gli analoghi, con una IC_{50} di $17 \pm 1 \mu M$, meritando quindi una caratterizzazione più approfondita. Invece, il composto **66**, che presenta un gruppo ossidrilico in posizione para della porzione sulfamidica, mostrava un drammatico calo di attività ($IC_{50} > 200 \mu M$ in ELISA, $EC_{50} > 100 \mu M$ in PRA), sottolineando ancora una volta l'importanza che riveste la componente idrofobica nell'interazione PA-PB1. Infine, l'aggiunta di un ulteriore gruppo idrofobico nella parte sulfonammidica, presente nel composto **67**, non influenzava la citotossicità, ma tuttavia comportava un effetto negativo sull'attività antivirale.

4.3.g Effetto antivirale dei più promettenti analoghi della Hit 5 contro un pannello di ceppi di IAV

Proprio come è stato fatto con i migliori analoghi della **Hit 10**, abbiamo deciso di caratterizzare ulteriormente l'attività antivirale degli analoghi della **Hit 5** con le migliori attività, ovvero i composti **64** e **70**. Prima di tutto si è deciso di saggiare questi due composti contro altri ceppi del virus dell'influenza A, ossia il virus H3N2 A/WSN/67/05, il virus H1N1 A/SOLOMON ISLAND/3/06, il virus H1N1 A/PARMA/24/09 resistente ad Oseltamivir, ed un ceppo locale della nuova variante pandemica S-OIV (*swine-originated influenza virus*), ovvero il virus A/PADOVA/30/2011.

Cellule MDCK sono state infettate con questi virus a MOI 0,005 e trattate con diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 μM) o RBV per confronto. Il risultato di questi esperimenti è riportato in **Tabella 13**.

Tabella 13. Attività antivirale di RBV e dei composti 64 e 70 in PRA contro i ceppi clinici A/WSN/67/05, A/SOLOMON ISLAND/3/06, A/PADOVA/30/2011 e A/PARMA/24/09.

Ceppo virale	Composto PRA (EC_{50} , μM) ^a		
	64	70	RBV
A/PR/8/34 (H1N1)	30 \pm 4	24 \pm 9	8 \pm 2
A/Padova/30/2011 (H1N1)	29 \pm 5	25 \pm 4	7 \pm 2
A/Solomon Island/3/06 (H1N1)	22 \pm 4	24 \pm 3	6 \pm 1
A/Parma/24/09 (H1N1) (Oseltamivir-resistant)	43 \pm 7	23 \pm 3	11 \pm 4
A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	24 \pm 4	20 \pm 2	17 \pm 2

^a Attività dei composti nei saggi di riduzione delle placche, PRA, con vari ceppi di IAV. Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media \pm SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Come atteso, i due composti sono risultati attivi contro tutti i ceppi di IAV saggiati, a concentrazioni micromolari contenuti in un *range* che varia da 22 a 43 μM per il composto **64** e da 20 a 25 μM per il composto **70**, in accordo con i rispettivi valori ottenuti nel PRA contro il ceppo PR8 (rispettivamente 30 \pm 4 e 24 \pm 9). Il composto **70** quindi si riconferma il più attivo tra gli analoghi della **Hit 5**, mostrando una potenza comparabile al composto di riferimento, la RBV (**Tabella 13**).

Questi risultati servono a dimostrare che i due composti non possiedono un'attività ceppo-specifica, ma riescono ad inibire la replicazione di più ceppi appartenenti a sottotipi diversi (H1N1 e H3N2). Inoltre mantengono la loro attività anche contro un ceppo resistente ad Oseltamivir, il virus A/Parma/24/09.

4.3.h Effetto antivirale dei più promettenti analoghi della Hit 5 contro ceppi di IBV

Dopo aver dimostrato un'attività antivirale ad ampio spettro contro IAV, si è voluto valutare l'efficacia di questi composti, **64** e **70**, anche contro IBV. A tale scopo sono stati utilizzati un paio di ceppi di influenza B: il virus B/Lee/40 ed il virus B/Malaysia/2506/4.

Cellule MDCK sono state infettate con il virus B/Lee/40 o il virus B/Malaysia/2506/4 a MOI 0,005 e trattate con diverse concentrazioni di composto (25, 50 e 100 μM). Come in tutti gli altri esperimenti di PRA, è stata inclusa la RBV come controllo positivo. In **Tabella 14** sono riportati i valori di EC_{50} ottenuti sia per i due composti in esame che per il composto di riferimento RBV.

Tabella 14. Attività antivirale di RBV e dei composti in esame in cellule MDCK infettate con B/Lee/40 e B/Malaysia/2506/4.

Composto	PRA in cellule MDCK (EC_{50} , μM) ^a	
	B/Lee/40	B/Malaysia/2506/4
64	26 \pm 3	28 \pm 4
70	24 \pm 5	22 \pm 4
RBV	6 \pm 3	8 \pm 2

^a Attività dei composti nei saggi di riduzione delle placche, PRA, contro ceppi di IBV. Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media \pm SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Dai dati riportati in **Tabella 14** si può affermare che i composti in esame hanno evidenziato la capacità di inibire anche la replicazione di IBV, inibendo entrambi i ceppi testati, B/Lee/40 e B/Malaysia/2506/4. I valori di EC_{50} ottenuti con i due analoghi della **Hit 5** sono in linea con i dati ottenuti contro i diversi ceppi di IAV ed anche stavolta il composto **70** si è confermato come il più potente tra i due, con una EC_{50} compresa tra 22 e 24 μM . Quindi, in sintesi, si può concludere che questi analoghi possiedono un'attività anti-influenzale ad ampio spettro, estesa anche a virus influenzali di tipo B.

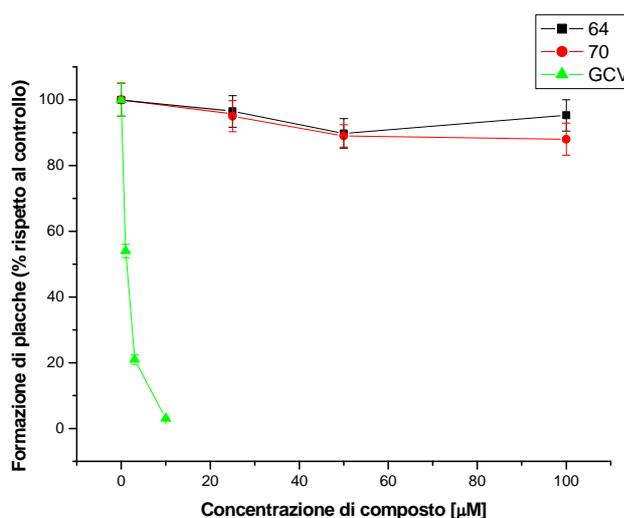
4.3.i Effetto antivirale dei composti contro altri virus (VSV, AdV e HCMV)

Per valutare la specificità dell'effetto antivirale dei composti attivi, essi sono stati saggiati contro altri virus: due virus a DNA (AdV e HCMV) ed un altro virus a RNA (VSV).

Cellule HFF sono state infettate con 100 PFU/pozzetto di virus HCMV e trattate con diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 μM) o Ganciclovir (GCV) come composto di riferimento, come descritto nel **Paragrafo 3.14.c**.

Per controllo alcuni campioni sono stati infettati e trattati con DMSO, il solvente in cui sono solubilizzati i composti per escludere che il loro effetto dipendesse dal solvente. In **Figura 32** è riportato il grafico che riporta l'attività dei due composti contro la replicazione di HCMV.

Figura 32. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti in esame, e GCV come controllo, contro HCMV.

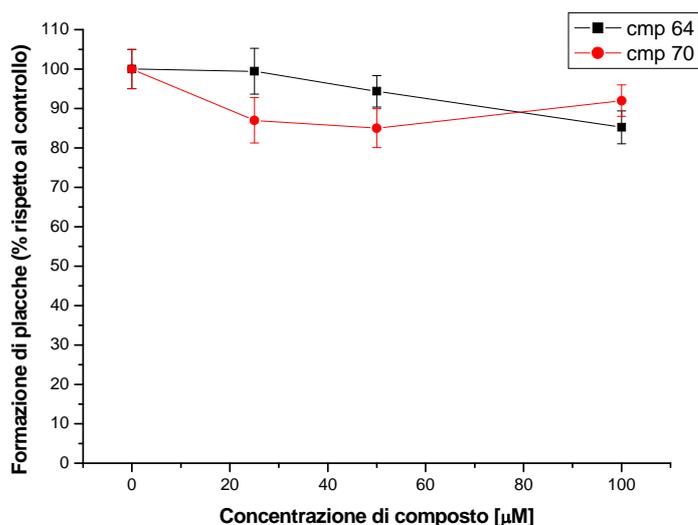


I valori riportati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti.

Elaborando i dati riportati in **Figura 32** è stato possibile determinare il valore di EC_{50} dei composti e del GCV, riportato in **Tabella 15**.

Cellule A549 sono state infettate con 40 PFU/pozzetto di un isolato clinico di AdV e trattate con diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 μM), come descritto nel **Paragrafo 3.14.d**. Per controllo alcuni campioni sono stati infettati e trattati con DMSO. In **Figura 33** è riportato il grafico che riporta l'attività dei due composti contro la replicazione di AdV.

Figura 33. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti in esame contro AdV.



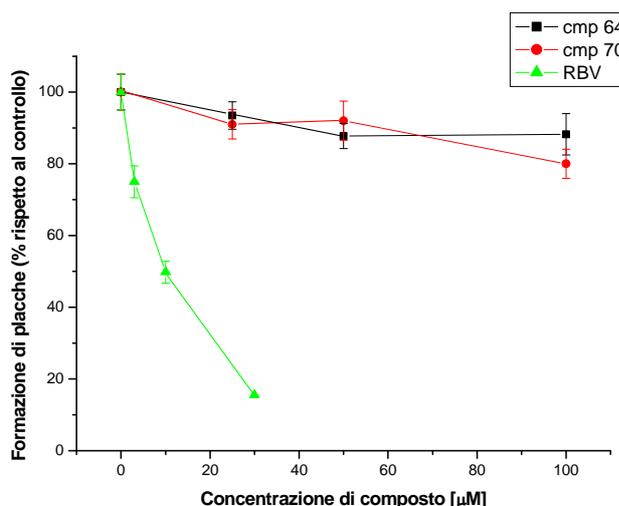
I valori riportati rappresentano la media di 2 esperimenti indipendenti.

Elaborando i dati riportati in **Figura 33** è stato possibile determinare il valore di EC_{50} dei due composti, riportato in **Tabella 15**.

Infine, cellule L929 sono state infettate con 50 PFU/pozzetto di un isolato clinico di VSV e trattate con diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 μM) o RBV per confronto), come descritto nel **Paragrafo 3.14.b**.

Sono stati effettuati dei controlli, in cui i campioni sono stati infettati e trattati con DMSO. In **Figura 34** è riportato il grafico che riporta l'attività dei due composti contro la replicazione di VSV.

Figura 34. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti in esame, e RBV come controllo, contro VSV.



I valori riportati rappresentano la media di due esperimenti indipendenti.

Elaborando i dati riportati in **Figura 34** è stato possibile determinare il valore di EC₅₀ dei composti e della RBV, riportato in **Tabella 15**.

Tabella 15. Attività antivirale dei composti in esame in cellule infettate con HCMV, AdV e VSV.

Composto	PRA (EC ₅₀ , μM) ^a VIRUS		
	HCMV in cellule HFF	AdV in cellule A549	VSV in cellule L929
64	>100	>100	>100
70	>100	>100	>100
GCV	1,3 ± 0,3	-	-
RBV	-	-	10 ± 2

^a Attività dei composti nei saggi di riduzione delle placche, PRA, con HCMV, AdV e VSV. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Come è possibile vedere dai valori riportati in **Tabella 15**, la replicazione di HCMV era inibita dal composto di riferimento GCV con un valore di EC₅₀ pari a 1,3 ± 0,3 μM, che è risultato comparabile con il valore riportato in letteratura (Loregian & Coen, 2006). Inoltre si osserva che la replicazione di VSV era inibita dal composto di riferimento RBV con un valore di EC₅₀ pari a 10 ± 2 μM, in accordo con la letteratura (Sidwell *et al.*, 1979). Al contrario, i composti **64** e **70** dimostravano di non possedere alcuna attività inibitoria verso nessun dei tre

virus contro cui sono stati saggiati, ottenendo in tutti i casi dei valori di $EC_{50} >$ di 100 μ M (**Tabella 15**).

Queste analisi hanno dimostrato, come ipotizzati dato il loro meccanismo d'azione, che i composti **64** e **70** non inibiscono la replicazione né di virus a DNA (HCMV e AdV), né di altri virus a RNA (VSV), confermando la specificità della loro attività antivirale nei confronti di IAV e IBV.

4.3.j Ipotesi sulle modalità di legame della Hit 5 e degli analoghi 64 e 70

Al fine di indagare se la **Hit 5** e due dei suoi analoghi più potenti, i composti **64** e **70**, possiedono la stessa modalità di legame a PA, abbiamo valutato in saggi *minireplicon* come varia l'attività inibitoria di questi composti con l'introduzione di singole mutazioni puntiformi in residui di PA che delimitano la cavità idrofobica e che sono coinvolti nell'interazione con PB1. Questo inoltre ci permetterebbe di capire se i composti interagiscono con i residui in esame oppure se la loro attività inibitoria è indipendente da essi. I residui di PA che abbiamo scelto per investigare questo effetto sono: W706 e K643. Questi residui sono stati mutati in modo da ottenere la sostituzione degli amminoacidi *wt* con altri aventi proprietà diverse, ottenendo così le seguenti sostituzioni: W706G e K643L. Il residuo W706 è stato scelto perché sembra avere un ruolo chiave nell'interazione con PB1, infatti la sua sostituzione ha effetti drammatici sull'attività della polimerasi virale, ma pur sempre rilevabile e quantificabile in saggi *minireplicon*. Nonostante K643 sembri non interagire direttamente con la subunità PB1, è un residuo molto flessibile, che si trova in prossimità della prima tasca idrofobica (delineata appunto dai residui W706 e P411 di PA) ed è stato selezionato perché supponiamo possa modulare la struttura della tasca ed influire così nel legame di PA con PB1. A conferma di ciò, la previsione di interazione della **Hit 5** mediante studi di *docking* precedentemente riportata (**Figura 31**) suggerisce un'interazione del composto con tale residuo. Inoltre uno studio precedentemente svolto dal nostro gruppo di ricerca ipotizzava che anche la **Hit 1**, un inibitore di PA-PB1 identificato tramite *screening* come descritto nel **Paragrafo 4.1.a**, potesse interagire con il residuo K643 di PA (Muratore *et al.*, 2012a).

Per valutare questa ipotesi, sono stati allestiti dei saggi di *minireplicon* utilizzando in parallelo tre diverse mix di trasfezione che differivano solamente per il plasmide codificante la proteina PA, in modo da valutare l'attività della polimerasi virale con la proteina PA *wt* oppure con PA con le mutazioni W706G o K643L. Per ogni mix sono stati saggiati i composti **5**, **64** e **70**

a tre diverse concentrazioni (25, 50 e 100 μM). Il saggio di *minireplicon* è stato eseguito come descritto nel **Paragrafo 3.17**. Per controllo, in alcuni campioni è stato aggiunto solo DMSO. I dati ottenuti in seguito a normalizzazione per ogni proteina diversa sono stati riportati in valore percentuale, considerando l'attività del controllo con la stessa proteina e trattato con DMSO come 100%. Questo ci ha permesso di ottenere un grafico che mette in relazione l'attività trascrizionale residua riportata in percentuale con la concentrazione di composto utilizzato, da cui è stato possibile determinare il valore di EC_{50} di ogni composto nei confronti di ogni diversa PA utilizzata (**Tabella 16**).

Per evidenziare ancor di più eventuali differenze di attività dei composti contro PA wt o mutata, abbiamo ulteriormente analizzato i dati ottenuti da questi saggi calcolando la percentuale di attività trascrizionale residua, per ogni proteina utilizzata, in presenza di ciascun composto alla concentrazione di 25 μM (quindi la concentrazione più vicina al valore di EC_{50} di ogni composto) rispetto all'attività della stessa proteina trattata con DMSO (**Tabella 17**).

Tabella 16. Attività della Hit 5 e dei composti 64 e 70 contro l'RNA polimerasi virale costituita da PA wt o mutata, espressa in valori di EC_{50} .

Proteina PA	Composto EC_{50} (μM) ^a		
	5	64	70
PA wt	30 \pm 4,0	17 \pm 3,5	12 \pm 2,9
PA K643L	45 \pm 4,1	16 \pm 4,1	12 \pm 4,4
PA W706G	74 \pm 11,1	15 \pm 4,0	13 \pm 5,1

^a Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione del composto che reduce del 50% l'attività dell'RNA polimerasi virale in cellule HEK 293T. Tutti i valori riportati rappresentano la media \pm SD dei dati ottenuti da almeno quattro esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Tabella 17. Attività residua dell'RNA polimerasi virale costituita da PA wt o mutata in presenza della Hit 5 e dei composti 64 e 70 alla concentrazione di 25 μM .

Proteina PA	Composto % attività dell'RNA polimerasi virale a 25 μM di ciascun composto ^a		
	5	64	70
PA wt	58,9 \pm 11,6	19,7 \pm 4,6	18,6 \pm 5,0
PA K643L	84,2 \pm 14,3	21,2 \pm 4,4	18,8 \pm 3,2
PA W706G	95,5 \pm 13,9	19,3 \pm 4,2	19,9 \pm 2,7

^a I valori riportati rappresentano, per ogni forma di PA, la % di attività polimerasica residua dei vari composti alla concentrazione di 25 μM , rispetto al controllo trattato con DMSO. Tutti i valori riportati rappresentano la media \pm SD dei dati ottenuti da almeno quattro esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Sebbene si tratti di risultati preliminari, da una prima analisi dei dati riportati in **Tabella 16**, si nota che la **Hit 5** risente notevolmente dell'eliminazione del residuo W706, mostrando una netta riduzione dell'attività inibitoria in presenza di PA con la mutazione W706G rispetto a quella wt. Infatti i valori di EC_{50} ottenuti da questo composto con PA W706G sono circa 2,5 volte superiori rispetto a quelli ottenuti con la proteina wt ($74 \pm 11 \mu\text{M}$ contro $30 \pm 4,0 \mu\text{M}$ della forma wt). Grazie ai valori riportati in **Tabella 17** si nota inoltre che il composto **5** alla concentrazione di $25 \mu\text{M}$ è del tutto inefficace nei confronti di PA W706G (attività polimerasi residua = $95,5 \pm 13,9\%$), mentre la stessa concentrazione dello stesso composto in presenza della proteina wt causava la riduzione di circa il 50% dell'attività della polimerasi rispetto al controllo trattato con DMSO (attività polimerasica residua = $58,9 \pm 11,6\%$). Anche la mutazione K643L sembra rendere la proteina PA un po' meno sensibile al composto **5**, infatti i valori di EC_{50} passano da $30 \pm 4,0 \mu\text{M}$ con PA wt, a $45 \pm 4,1 \mu\text{M}$ con la proteina mutata al residuo 643. In aggiunta, anche l'attività polimerasica residua della **Hit 5** a $25 \mu\text{M}$ in presenza di PA K643L era del $84,2 \pm 14,3\%$, notevolmente superiore a quella misurata con la proteina wt, ridotta a $58,9 \pm 11,6\%$.

Al contrario, non si notano differenze rilevanti paragonando le attività dei composti **64** e **70** in presenza della proteina PA wt con l'attività riportata dagli stessi inibitori contro entrambi i due mutanti di PA. Infatti i valori di EC_{50} ottenuti da questi composti e la loro % di inibizione a $25 \mu\text{M}$ risultano comparabili tra le tre diverse forme di PA (**Tabella 16** e **Tabella 17** rispettivamente).

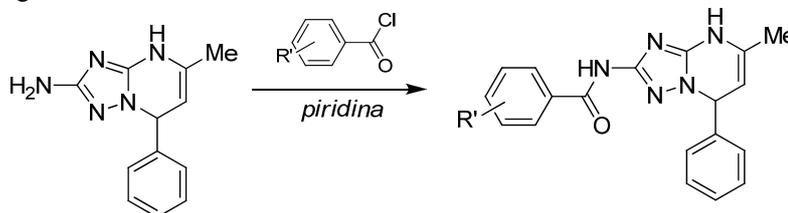
Questi risultati, seppur preliminari, sembrano indicare che i due analoghi **64** e **70** non interagiscono né con il residuo W706 né con K643, suggerendo di possedere un *binding mode* diverso dalla **Hit 5**. Tuttavia tali dati dovranno essere confermati prossimamente mediante studi di *docking*. Come atteso e predetto dagli studi di *docking* riportati al **Paragrafo 4.3.d** (**Figura 31**), la **Hit 5** sembra in grado di interagire, anche se debolmente, con il residuo K643 e la sua attività inibitoria sembra essere strettamente vincolata al residuo di triptofano in posizione 706 di PA.

4.4 Sviluppo di analoghi della Hit 31

4.4.a Disegno di analoghi della HIT 31

In questo studio, condotto in collaborazione con il gruppo della Prof.ssa Oriana Tabarrini dell'Università di Perugia, abbiamo selezionato la **Hit 31** e da questa *small molecule* abbiamo sviluppato degli analoghi al fine di ottenere l'ottimizzazione strutturale del composto. Siamo partiti da questo composto che, come nel caso della **Hit 10**, non esibiva una potente attività antivirale contro IAV ($EC_{50} > 100 \mu\text{M}$), ma mostrava una certa capacità di dissociare l'interazione PA-PB1 *in vitro* (IC_{50} di $137 \pm 12 \mu\text{M}$) e non sembrava possedere citotossicità ($CC_{50} > 250 \mu\text{M}$) nelle linee cellulari MDCK e HEK 293T (Muratore *et al.*, 2012a). La procedura utilizzata per la sintesi della **Hit 31** e dei suoi analoghi prevede una prima reazione che permette di ottenere il sintone chiave, successivamente funzionalizzato con l'appropriato benzil cloruro a dare i vari composti *target*. Nonostante tale procedura sintetica, rappresentata in **Figura 35**, sia piuttosto semplice, la purificazione dei derivati è risultata particolarmente difficoltosa, permettendo di preparare solo pochi analoghi della **Hit 31**.

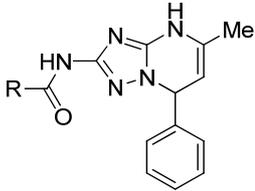
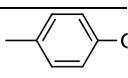
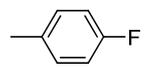
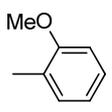
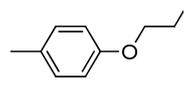
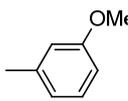
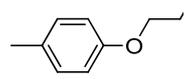
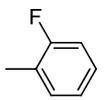
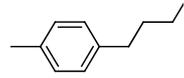
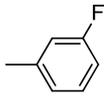
Figura 35. Schema generale di sintesi della Hit 31 e dei suoi derivati.



I derivati realizzati sono stati disegnati attraverso un classico approccio di “*medicinal chemistry*” e sono tutti caratterizzati dal nucleo 1,2,4-triazolopirimidinico mentre differiscono per il sostituito sull'anello benzenico legato tramite legame ammidico in posizione 2 (**Tabella 18**). Inizialmente, il gruppo metossilico in posizione *para* nella **Hit 31** è stato spostato nelle posizioni *orto* e *meta* dell'anello benzenico, a dare rispettivamente i derivati **T16** e **T17**. Il gruppo *p*-metossilico è stato anche rimpiazzato da un atomo di fluoro a dare lo stretto analogo **T20**; anche in questo caso l'atomo di fluoro è stato poi spaziato nelle posizioni *orto* e *meta*, a dare rispettivamente i derivati **T18** e **T19**. I risultati dei saggi biologici condotti con questa prima piccola serie di derivati hanno quindi guidato il disegno di altri tre analoghi. E' infatti emerso come il sostituito in posizione *para* sia favorito rispetto alle posizioni *meta* e *orto*, soprattutto per quanto riguarda la capacità dei derivati di inibire l'interazione PA-PB1. Tale indicazione ha suggerito di mantenere il sostituito in questa posizione andando ad

investigare ulteriormente la sua natura. Il gruppo *p*-metossilico della **Hit 31** è stato quindi rimpiazzato da catene lineari a diversa lunghezza, quali la catena *O*-propilica, *O*-butilica e butilica, a dare rispettivamente i derivati **T21**, **T41** e **T42**.

Tabella 18. Struttura chimica degli analoghi della Hit 31.

			
Composto	R	Composto	R
Hit 31		T20	
T16		T21	
T17		T41	
T18		T42	
T19			

4.4.b Caratterizzazione biologica degli analoghi della Hit 31

Una volta sintetizzati gli analoghi, ciascun composto è stato saggiato:

- In saggi MTT in cellule HEK 293T e MDCK al fine di valutarne l'eventuale citotossicità,
- In saggi ELISA per saggiare la loro abilità nel dissociare le subunità PA e PB1,
- In saggi PRA per esaminare la loro attività antivirale contro il ceppo PR8 di IAV,

In tutti gli esperimenti sono stati aggiunti sia il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ che RBV come composti di riferimento, ad eccezione dei saggi ELISA in cui è stato incluso solamente il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ come controllo positivo di inibizione. Tutti questi saggi sono stati eseguiti nella stessa maniera di quelli eseguiti con gli analoghi delle **Hits 10 e 5** e sono stati ampiamente descritti

nella sezione **Materiali e Metodi**. In **Tabella 19** sono riportati i dati ottenuti da questa caratterizzazione.

Tabella 19. Attività biologica degli analoghi della Hit 31.

Composto	ELISA d'interazione PA-PB1 IC ₅₀ (μM) ^a	PRA in cellule MDCK EC ₅₀ , (μM) ^b	Citotossicità (MTT Assay) CC ₅₀ , (μM) ^c	
			cellule HEK 293T	cellule MDCK
Hit 31	137 ± 12	>100	>250	>250
T16	>200	>100	240 ± 11	>250
T17	175 ± 9	>100	230 ± 15	>250
T18	185 ± 5	>100	>250	>250
T19	156 ± 6	>100	220 ± 15	>250
T20	138 ± 16	>100	190 ± 5	>250
T21	40 ± 10	47 ± 6	>250	230 ± 7
T41	37 ± 4	92 ± 7	>250	>250
T42	55 ± 10	90 ± 10	>250	>250
RBV	N.D.	8 ± 2	>250	>250
Tat-PB1₁₋₁₅ peptide	35 ± 10	40 ± 5	>100	>100

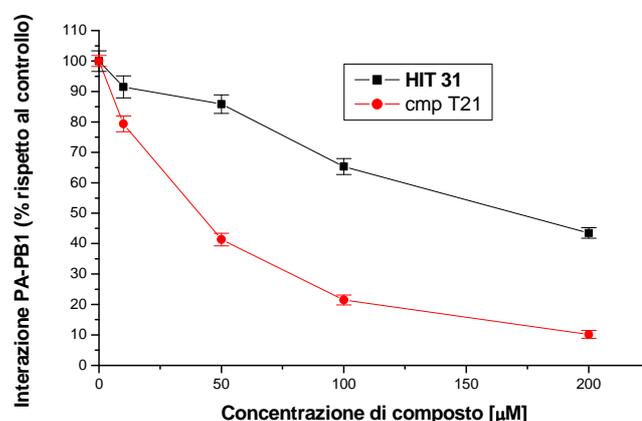
^a Attività dei composti in saggi ELISA d'interazione PA-PB1. Il valore di IC₅₀ rappresenta la concentrazione del composto che riduce del 50% l'interazione tra PA e PB1. ^b Attività dei composti in saggi di riduzione delle placche, PRA, con il ceppo PR8. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. ^c Attività dei composti in saggi MTT. Il valore di CC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che causa una diminuzione del 50% della vitalità cellulare. N.D.= non determinato. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Analizzando i dati ottenuti con il primo set di analoghi disegnati, che comprendono i composti dal **T16** al **T20**, si può notare che questi composti sono tutti caratterizzati da un'assenza di attività antivirale fino alla concentrazione di 100 μM e da una debole e variabile attività in ELISA (eccetto il composto **T16**), con valori IC₅₀ che oscillano tra 138 μM (**T20**) e 185 μM (**T18**). Questo ha permesso di capire, come già accennato in precedenza, che il

sostituente in posizione *para* sull'anello benzenico legato tramite legame ammidico in posizione 2 sia favorito rispetto alle posizioni *meta* e *orto*, nella capacità di inibire l'interazione PA-PB1. Tale analisi ha suggerito quindi lo sviluppo dei seguenti analoghi, **T21**, **T41** e **T42**, che prevedono la sostituzione del gruppo metossilico con altri sostituenti caratterizzati da catene lineari a diversa lunghezza posizionati sempre in posizione *para*. Dall'analisi dei dati biologici ottenuti con questo secondo set di derivati è emerso che tali modifiche hanno un effetto positivo sia in termini di potenza antivirale, che di capacità di inibire il legame tra PA e PB1 *in vitro*. In particolar modo, l'apporto della catena *O*-propilica ha un impatto determinante sulle proprietà del composto **T21**. Infatti **T21** è risultato l'analogo più potente nell'inibire la replicazione virale del ceppo PR8 (EC_{50} di $47 \pm 6 \mu\text{M}$) e mostra un'attività inibitoria in ELISA comparabile a quella del peptide di controllo (valori di IC_{50} rispettivamente di $40 \pm 10 \mu\text{M}$ e $35 \pm 10 \mu\text{M}$). Anche i composti **T41** e **T42** hanno rilevato una buona attività in ELISA, con il **T41** addirittura più attivo del **T21** (IC_{50} di $37 \pm 4 \mu\text{M}$), ma tuttavia non mostravano la stessa potenza in saggi PRA (valori di EC_{50} compresi tra 90 e 92 μM). Dall'analisi della citotossicità è emerso però una leggera citotossicità in cellule MDCK in presenza del composto **T21**, seppur a concentrazioni 5 volte maggiori rispetto al valore di EC_{50} ottenuto nel saggio antivirale.

In conclusione, si può affermare che, come si può vedere dal grafico rappresentato nella **Figura 36**, il derivato **T21** inibisce la replicazione di IAV in PRA molto più efficacemente rispetto al composto di partenza. Inoltre, osservando il grafico della **Figura 37**, si ha la conferma che il meccanismo d'inibizione di tale analogo è basato sulla dissociazione fisica delle subunità PA e PB1 della polimerasi virale.

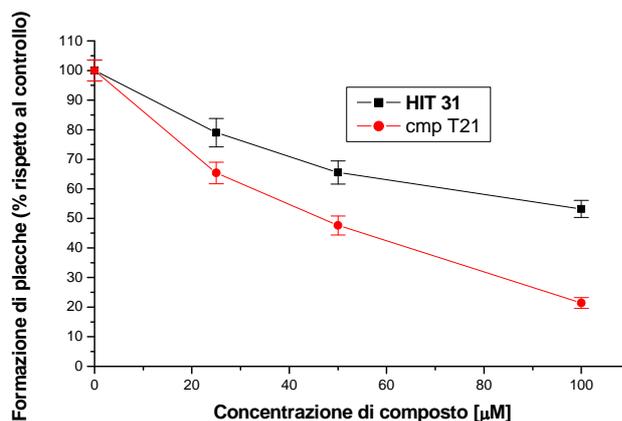
Figura 36. Comparazione dell'attività antivirale in PRA tra la Hit 31 ed il suo analoghi più attivo, il composto T21.



I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.

Alla luce di questi risultati abbiamo deciso che il composto T21 meritava un'ulteriore caratterizzazione.

Figura 37. Comparazione dell'attività inibitoria in ELISA tra la Hit 31 ed il suo analogo più attivo, il composto T21.



I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.

4.4.c Studio dell'effetto del derivato T21 sulla replicazione virale a diversi tempi post-infezione

Con lo scopo di caratterizzare ulteriormente l'attività antivirale del **T21** sono stati effettuati esperimenti di riduzione della progenie virale di IAV a MOI di 0,005 PFU/cellula MDCK. In questi esperimenti sono state saggiate diverse concentrazioni di **T21** (0, 3, 10, 30 e 100 µM) o di RBV inclusa nel saggio come controllo positivo. La concentrazione finale di DMSO è stata mantenuta allo 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stato aggiunto un volume di DMSO puro tale per cui la concentrazione finale fosse del 0,1%. A diversi tempi post-infezione (12, 24 e 48 ore p.i.) è stato raccolto il *medium* di coltura delle cellule infettate e la progenie virale nel *medium* è stata titolata mediante saggio delle placche. Per ogni tempo di prelievo del *medium*, la carica virale ottenuta dai campioni trattati con i vari composti ad una data concentrazione è stata riportata in valore percentuale considerando il corrispettivo controllo trattato con DMSO come 100%.

Dopodiché è stato costruito un grafico, per ogni tempo di prelievo p.i., che mette in relazione la percentuale di carica virale ottenuta (valore percentuale rispetto al controllo non trattato) con la concentrazione di composto correlata. Una volta ottenuto il grafico è stato possibile calcolare per ogni composto il valore di EC₅₀.

Tabella 20. Attività antivirale del T21 e RBV sulla produzione di progenie virale nel tempo.

Composto	Saggio di riduzione della progenie virale EC ₅₀ (μM) ^a		
	12 ore p.i.	24 ore p.i.	48 ore p.i.
T21	12 ± 3	45 ± 6	75 ± 10
RBV	2 ± 1	2 ± 1	3 ± 1

^a Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Dai dati riportati in **Tabella 20** è possibile osservare come non ci siano differenze significative tra i valori di EC₅₀ di RBV nei distinti esperimenti ai tre diversi prelievi effettuati nel tempo p.i. (i valori di EC₅₀ variano da 2 ± 1 μM a 12 h p.i. a 3 ± 1 μM a 48 h p.i.). Al contrario, è stata osservata una differenza nell'attività del composto **T21** nel corso del tempo, con un aumento dei valori di EC₅₀ da 12 ± 3 μM a 12 h p.i. a 75 ± 10 μM a 48 h p.i. Questa differenza d'attività sarà oggetto di studi futuri, ma potrebbe esser attribuibile ad una scarsa solubilità del composto nel terreno di coltura cellulare.

4.4.d Studio dell'effetto del composto T21 sull'attività della polimerasi virale in saggi di minireplicon

Successivamente si è voluto valutare l'effetto del composto **T21** sull'attività polimerasica virale utilizzando il saggio di *minireplicon*, descritto nella sezione **Materiali e Metodi** e discusso precedentemente. Il saggio è stato condotto aggiungendo i composti o RBV a tre diverse concentrazioni (25, 50 e 100 μM). Per controllo, in alcuni campioni è stato aggiunto solo DMSO. In **Tabella 21** sono riportati i valori di EC₅₀ per il **T21** e RBV, insieme ai valori di CC₅₀ degli stessi inibitori ottenuti dal saggio MTT in cellule HEK 293T, per discriminare una reale attività inibitoria da falsi positivi dovuti a citotossicità.

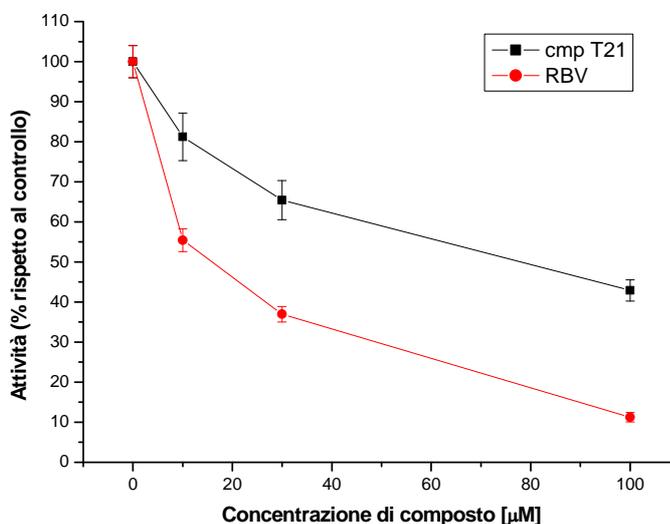
Dai risultati ottenuti dal *minireplicon* si evince che il composto **T21**, proprio come la RBV, esibiva un effetto inibente dose-dipendente sull'attività dell'RNA polimerasi virale (**Figura 38**), con un valore di EC₅₀ di 38 ± 7 μM (**Tabella 21**). Da evidenziare inoltre che lo stesso composto non mostrava alcuna citotossicità in cellule HEK 293T almeno fino alla concentrazione di 250 μM (**Tabella 21**).

Tabella 21. Citotossicità in cellule HEK 293T ed attività contro l'RNA polimerasi virale di RBV e del composto T21.

Composto	Citotossicità in saggio MTT in HEK 293T CC_{50} (μM) ^a	Saggio Minireplicon EC_{50} (μM) ^b
T21	>250	38 ± 7
RBV	>250	15 ± 7

^a Citotossicità dei composti T21 e RBV in saggi MTT. Il valore di CC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che causa una diminuzione del 50% della vitalità cellulare di cellule HEK 293T. ^b Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione del composto che reduce del 50% l'attività dell'RNA polimerasi virale in cellule HEK 293T. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Figura 38. Attività dose-dipendente del composto T21 e di RBV in saggi di minireplicon.



I valori riportati rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.

4.4.e Effetto antivirale del composto T21 contro un pannello di ceppi di IAV.

Come descritto sopra, studi precedenti hanno dimostrato che il composto **T21** è attivo nei confronti del ceppo PR8 di IAV. Per investigare se questo composto fosse efficace anche contro altri ceppi di IAV, è stato saggiato in PRA contro altri ceppi del virus dell'influenza A (il virus H3N2 A/WSN/67/05, il virus H1N1 A/PARMA/24/09 e tre ceppi locali della nuova variante pandemica S-OIV [*swine-originated influenza virus*], ovvero A/PADOVA/30/2011, A/PADOVA/72/2011, e A/PADOVA/253/2011).

Cellule MDCK quindi sono state infettate con questi virus a MOI 0,005 e trattate con diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 μM) o RBV come composto di riferimento.

Per controllo alcuni campioni sono stati infettati, ma non trattati con i composti, e in alcuni di questi è stato aggiunto DMSO, il solvente in cui sono solubilizzati i composti per escludere

che l'effetto di essi dipendesse dal solvente. In **Tabella 22** sono riportati i valori di EC₅₀ ottenuti in questi esperimenti.

Tabella 22. Attività antivirale di RBV e del composto T21 in PRA contro i ceppi clinici A/WSN/67/05, A/PADOVA/30/2011, A/PADOVA/72/2011, A/PADOVA/253/2011, e A/PARMA/24/09.

Ceppo virale	Composto PRA (EC ₅₀ , µM) ^a	
	T21	RBV
A/PR/8/34 (H1N1)	47 ± 6	8 ± 2
A/Padova/30/2011 (H1N1)	42 ± 4	7 ± 2
A/Padova/72/2011 (H1N1)	45 ± 5	6 ± 1
A/Padova/253/2011 H1N1)	41 ± 6	11 ± 4
A/Parma/24/09 (H1N1) (Oseltamivir-resistente)	61 ± 11	17 ± 2
A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	37 ± 2	12 ± 7

^a Attività dei composti nei saggi di riduzione delle placche, PRA, con vari ceppi di IAV. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti da almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

In **Figura 22**, dove è riportata l'attività dei composti **T21** e RBV, si può notare come il **T21** inibisca efficacemente tutti i ceppi di IAV saggiati, anche se a concentrazioni molto più alte rispetto a RBV ed altri analoghi delle **Hit 5** e **10** descritti in precedenza. Infatti dal calcolo della EC₅₀ sono stati ottenuti valori che oscillavano da 37 µM a 61 µM, contro il *range* di valori di 6-17 µM ottenuto con la RBV.

4.4.f Effetto antivirale del composto T21 contro IBV

Infine, si è voluta infine saggiare l'efficacia del **T21** nell'inibire la replicazione di un ceppo di IBV. A tale scopo è stata valutata l'attività di questo composto mediante saggi di riduzione delle placche in MDCK contro il ceppo B/Lee/40.

Cellule MDCK sono state infettate con il virus B/Lee/40 a MOI 0,005 e trattate con diverse concentrazioni di composto (25, 50 e 100 µM). La RBV è stata inclusa in ogni esperimento come composto di riferimento. Alcuni campioni sono stati trattati con DMSO come controllo.

L'attività antivirale è stata espressa come valore di EC₅₀, cioè la concentrazione di composto tale da ridurre del 50% la formazione di placche virali.

Tabella 23. Attività antivirale di RBV e del composto T21 in cellule MDCK infettate con B/Lee/40.

Composto	PRA in cellule MDCK contro B/Lee/40 (EC₅₀, μM)^a
T21	60 ± 5
RBV	6 ± 3

^a Attività dei composti nei saggi di riduzione delle placche, PRA, con il ceppo B/Lee/40. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che inibisce la formazione di placche del 50%. Tutti i valori riportati rappresentano la media ± SD dei dati ottenuti di almeno due esperimenti indipendenti eseguiti in duplicato.

Come dimostrato con analoghi di altre Hit, anche il composto **T21** ha evidenziato un'attività anti-influenzale ad ampio spettro, estesa anche a virus influenzali di tipo B. Infatti, come si osserva dalla **Tabella 23**, è in grado di poter inibire la replicazione di IBV, con un valore di EC₅₀ di 60 ± 5 μM.

5. Conclusioni

I farmaci attualmente utilizzati nella terapia delle infezioni da virus influenzali presentano numerosi svantaggi, tra cui effetti collaterali, scarsa efficacia, limitazioni nella somministrazione, ma soprattutto l'induzione della comparsa di ceppi virali resistenti. Per questi motivi esiste la necessità reale di sviluppare nuovi farmaci anti-influenzali in grado di colmare queste lacune e da affiancare al vaccino che risulta essere attualmente insufficiente per far fronte alle epidemie che si verificano ogni anno e ad eventuali pandemie influenzali. Il nostro gruppo di ricerca si è concentrato sullo sviluppo di inibitori dell'RNA polimerasi virale, che prevedono l'inibizione della formazione del complesso eterotrimerico della polimerasi, in particolare l'inibizione dell'interazione PA-PB1. Mediante uno *screening in silico* di molecole virtuali, effettuato utilizzando la struttura cristallografica della proteina PA complessata con la porzione N-terminale di PB1, sono stati identificati alcuni composti (Hits) in grado di dissociare l'interazione *in vitro* delle proteine PA e PB1 (Muratore *et al.*, 2012a). Ad eccezione del composto 1, queste Hits possedevano un meccanismo d'azione peculiare ma non un'attività inibitoria potente, ed allo stesso mostravano solamente una modesta attività antivirale nell'inibire la replicazione di IAV in PRA. Lo scopo dell'attività di ricerca svolta durante questo dottorato è stata quello di sviluppare degli analoghi strutturali partendo da alcuni di questi composti (**Hit 5**, **10** e **31**) identificati dallo *screening in silico*, con l'intento di incrementare la loro capacità di dissociare l'interazione PA-PB1 ed ottenere quindi un'attività anti-influenzale più potente, mantenendo l'assenza di citotossicità. Gli analoghi sono stati disegnati utilizzando vari approcci e una volta sintetizzati sono stati sottoposti ad una caratterizzazione biologica. Analizzando i dati ottenuti da ciascun composto nei saggi biologici si evince che per ogni Hit selezionata sono stati ottenuti degli analoghi più potenti, sia nell'inibizione dell'interazione tra PA e PB1 in ELISA, che nell'inibire la replicazione di IAV. Nel caso della **Hit 10** sono stati ottenuti gli analoghi **T22** e **T40** che esibivano un effetto inibitorio di circa 4-5 volte più potente rispetto al composto di partenza sia in saggi di ELISA e che di PRA (Massari *et al.*, 2013). Passando ad analizzare gli analoghi della **Hit 5**, si nota che i composti **64** e **70** risultavano i più promettenti, mostrando un'attività inibitoria circa tre volte più efficiente del composto di partenza in tutti i saggi utilizzati. Oltre al composto **70**, anche gli analoghi **34** e **65** hanno mostrato un notevole incremento di attività rispetto alla **Hit 5**, soprattutto nei saggi di PRA. Infine siamo riusciti ad ottenere un'ottimizzazione strutturale anche per la **Hit 31**, ottenendo l'analogo **T21** che mostra un'attività inibitoria in ELISA a

concentrazioni tre volte inferiori rispetto al composto di partenza ed allo stesso tempo possiede una potenza più di due volte superiore in PRA.

Questi dati inoltre ci hanno permesso di determinare quale impatto abbia l'introduzione di specifici gruppi chimici nell'attività dei composti, delineando così delle relazioni struttura-attività che possono essere sfruttate per la generazione di ulteriori inibitori ancora più potenti e specifici. I dati di SAR sono stati verificati e corroborati con simulazioni virtuali di interazione di alcune Hits ed i rispettivi analoghi più promettenti con la cavità di PA, mediante prove di *docking*. Da questa complessa analisi abbiamo determinato che la porzione tiofenearboassimide è un promettente *scaffold* di partenza per sviluppare composti anti-influenzali dotati di attività inibitoria sull'interazione PA-PB1 (Massari *et al.*, 2013). Inoltre è stato osservato che nella gran parte dei nostri analoghi l'introduzione di sostituenti idrofobici era connessa ad un aumento di attività inibitoria. Anche questa indicazione sembra in linea con precedenti studi (Liu & Yao, 2010; Muratore *et al.*, 2012a), che sottolineano l'importanza delle interazioni idrofobiche all'interno della tasca di PA. La cosa più sorprendente che è emersa da questo studio è che confrontando le strutture chimiche dei composti con le migliori attività, ovvero i composti **64**, **70**, **T22**, **T40**, si nota una grande differenza nello *scaffold* in alcuni di essi. Studi di *docking*, sebbene forniscano solamente un'ipotesi sulla modalità di interazione di questi composti e necessitano di una conferma *in vitro*, suggeriscono che questi composti potrebbero interagire con residui diversi di PA. Nonostante queste differenze, da un'analisi più dettagliata eseguita posteriormente, sembra che questi composti possiedano delle caratteristiche comuni, infatti presentano tutti una porzione carbonile che agisce come gruppo accettore di legami ad idrogeno ed un gruppo -NH che agisce come donatore di legami ad idrogeno (la natura del gruppo -NH è variabile e può spaziare da ammidi, ammine, sulfonammidi, ecc.). Per lo sviluppo di ulteriori analoghi, tutto questo ci spinge a focalizzare l'attenzione sulla possibilità di ottenere interazioni simili piuttosto che ottenere composti che condividono lo stesso *scaffold*.

Un altro risultato inaspettato ottenuto in questo lavoro è l'identificazione di alcuni derivati della **Hit 10**, tra cui i composti **T25**, **T26**, e **T37**, **T35**, **T36**, e **T38**, che si sono dimostrati capaci di inibire la replicazione del ceppo PR8 di IAV senza però agire sul legame proteina-proteina tra le subunità virali PA e PB1. Questo suggerisce l'esistenza di un alternativo meccanismo d'azione per tali composti e ciò sarà oggetto di studio nel prossimo futuro.

L'ulteriore caratterizzazione in altri saggi biologici degli analoghi più promettenti di ogni Hit, ovvero i composti **64**, **70**, **T21**, **T22**, **T40**, ha poi permesso di valutare a fondo le loro proprietà inibitorie ed i risultati sono stati molto soddisfacenti. Come atteso, questi composti,

oltre ad inibire l'interazione *in vitro* tra PA e PB1, si sono confermati in grado di inibire anche l'attività catalitica della polimerasi del virus dell'influenza A in un contesto cellulare. Infatti, dai risultati ottenuti con i saggi di *minireplicon* emerge che i composti hanno un'attività persino maggiore a quella osservata con il composto di riferimento, la RBV. Il composto **70** è risultato il più efficace di tutti, con dei valori di EC₅₀ pari a 9 ± 2 μ M. Saggi di riduzione della progenie virale, per valutare l'effetto antivirale a diversi tempi post-infezione, invece hanno evidenziato che tutti i composti saggiati mostravano un picco di attività antivirale alle 12 ore p.i. (valori di EC₅₀ compresi tra 6 e 12 μ M), perdendo poi parte della loro attività nel corso del tempo. E' nostra ipotesi che questi composti perdano in parte la loro attività nel tempo probabilmente perché, trattandosi di molecole piuttosto idrofobiche, vanno incontro a precipitazione nel medium cellulare e quindi ad una diminuzione della concentrazione del composto solubile.

Considerando che tali composti agiscono contro un bersaglio conservato tra i vari sottotipi di IAV, ma anche nei vari ceppi di IBV, abbiamo voluto dimostrare l'attività di questi composti in PRA contro un pannello di ceppi di IAV e IBV. Infatti questi inibitori hanno confermato di poter inibire la replicazione non solo di ceppi di laboratorio di IAV, ma anche di ceppi clinici isolati da pazienti, e di alcuni ceppi di IBV. La specificità dell'attività antivirale contro il virus dell'influenza è stata poi dimostrata per i composti **64** e **70**, in quanto entrambi i composti non mostravano alcun effetto inibitorio sia contro virus a RNA che contro virus a DNA.

Detto questo, quello che possiamo concludere è che sono stati identificati nuovi inibitori dell'interazione proteina-proteina tra le subunità di PA e PB1 dell'RNA polimerasi dei virus influenzali, con una specifica attività anti-influenzale ad ampio spettro. Nonostante che questi composti non siano estremamente potenti, abbiamo comunque ottenuto strato un notevole incremento di attività rispetto ai composti di partenza. Inoltre questo lavoro ha portato all'identificazione di nuovi *scaffold* dotati di attività antivirale che saranno ulteriormente studiati e sviluppati in futuro. Considerando il bersaglio innovativo, diverso da quello degli attuali farmaci anti-influenza, tali composti potrebbero avere un effetto sinergico se combinati ai farmaci già in uso clinico. Questo aprirebbe la strada all'ipotesi di utilizzare un mix di molecole antivirali, in grado potenzialmente di combattere più efficacemente le infezioni provocate da virus influenzali. Infatti come osservato per altre terapie antivirali combinate (ad esempio contro HIV e HCV), la combinazione di composti che agiscono con differenti meccanismi potrebbe permettere: di ottenere un'azione più efficace, di ridurre le dosi di ciascun farmaco, diminuendo quindi gli effetti collaterali connessi alla terapia mono-farmaco,

e soprattutto di limitare lo sviluppo di virus farmaco-resistenti che conducono ad un inevitabile fallimento terapeutico.

6. Bibliografia

Alymova I. V., Green A.M., van de Velde N., McAuley J.L., Boyd K.L., Ghoneim H.E. and McCullers J.A. (2011). Immunopathogenic and antibacterial effects of H3N2 influenza A virus PB1-F2 map to amino acid residues 62, 75, 79, and 82. *J. Virol*, **85**, 12324–12333.

Amorim M.J., Digard P. (2006). Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine*, **24**, 6651-6655.

Amorim M.J., Kao R.Y., Digard P. (2013). Nucleozin targets cytoplasmic trafficking of viral ribonucleoprotein-Rab11 complexes in influenza A virus infection. *J Virol*, **87**, 4694-4703.

Asano Y., Ishihama A. (1997). Identification of two nucleotide-binding domains on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J Biochem*, **122**, 627-634.

Arranz R., Coloma R., Chichon F.J., Conesa J.J., Carrascosa J.L., Valpuesta J.M, Ortin J., Martin-Benito J. (2012). The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. *Science*, **338**, 1634–1637.

Baroni M., Cruciani G., Sciabola S., Perrucio F., Mason J. S. (2007). A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for ligands and proteins (FLAP): Theory and application. *J Chem Inf Model*, **47**, 279–294.

Barroso L., Treanor J., Gubareva L., Hayden F.G. (2005). Efficacy and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor peramivir in experimental human influenza: randomized, controlled trials for prophylaxis and treatment. *Antivir Ther*, **10**, 901-910.

Baudin F., Petit I., Weissenhorn W., Ruigrok R.W. (2001). In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*, **281**, 102-108.

Beaton A.R., Krug R.M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6282-6286.

Bergmann M., Garcia-Sastre A., Carnero E., Pehamberger H., Wolff K., Palese P., Muster T. (2000). Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol*, **74**, 6203-6206.

Biswas S.K., Nayak D.P. (1994). Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein. *J Virol*, **68**, 1819-1826.

Biswas S.K., Boutz P.L., Nayak D.P. (1998). Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol*, **72**, 5493-5501.

Bodian D.L. Yamasaki R.B., Buswell R.L., Stearns J.F., White J.M., Kuntz I.D. (1993). Inhibition of the fusion-inducing conformational change of influenza hemagglutinin by benzoquinones and hydroquinones. *Biochemistry*, **32**, 2967-2978.

Bosch F.X., Garten W., Klenk H.D., Rott R. (1981). Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology*, **113**, 725-735.

Boulo S., Akarsu H., Ruigrok R.W., Baudin F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res*, **124**, 12-21.

Bright R.A., Medina M.J., Xu X., Perez-Oroz G., Wallis T.R., Davis X.M., Povinelli L., Cox N.J., Klimov A.I. (2005). Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*, **366**, 1175-1181.

Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr, Carter A.P., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. (2002). Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. *J Mol Biol*, **316**, 725-768.

Bui M., Whittaker G., Helenius A. (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*, **70**: 8391-8401.

Bui M., Wills E.G., Helenius A., Whittaker G.R. (2000). Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol*, **74**: 1781-1786.

Bussey K.A., Bousse T.L., Desmet E.A., Kim B., Takimoto T. (2010). PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells. *J Virol*, **84**, 4395-4406.

Carosati E., Sciabola S., Cruciani G. (2004). Hydrogen bonding interactions of covalently bonded fluorine atoms: from crystallographic data to a new angular function in the GRID force field. *J. Med. Chem*, **47**, 5114-5125.

Cass L.M., Efthymiopoulos C., Bye A. (1999). Pharmacokinetics of zanamivir after intravenous, oral, inhaled or intranasal administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet*, **36**, 1-11.

Chase G., Wunderlich K., Reuther P., Schwemmler M. (2011). Identification of influenza virus inhibitors which disrupt of viral polymerase protein-protein interactions. *Methods*, **55**, 188-191.

Chen J., Lee K.H., Steinhauer D.A., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C. (1998). Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, **95**, 409-417.

Chen W., Calvo P.A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., Bennink J.R., Yewdell J.W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **7**, 1306-1312.

Cheong H-K., Cheong C., Choi B-S. (1996). Secondary structure of the panhandle RNA of influenza virus A studied by NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4197-4201.

Coleman J.R. (2007). The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *J.Virol*, **15**, 4-9.

Compans R.W., Klenk H.D., Caligiuri L.A., Choppin P.W. (1970). Influenza virus proteins. I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology*, **42**, 880-889.

- Compans R.W., Content J., Duesberg P.H.** (1972). Structure of ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol*, **10**, 795-800.
- Conenello G.M., Zamarin D., Perrone L.A., Tumpey T. and Palese P.** (2007). A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog*, **3**, 1414–1421.
- Das K., Aramini J.M., Ma L.C., Krug R.M. & Arnold E.** (2010) Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct & Mol Biol*, **17**, 530-538.
- Davies B.E.** (2010). Pharmacokinetics of oseltamivir: an oral antiviral for the treatment and prophylaxis of influenza in diverse populations. *J Antimicrob Chemother*, **65**, 5-10.
- De Clercq E.** (2004). Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 704-720.
- Deng T., Engelhardt O.G., Thomas B., Akoulitchev A.V., Brownlee G.G. and Fodor E.** (2006). Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol*, **80**, 11911-11919.
- Dias A., Bouvier D., Crepin T., McCarthy A.A., HartD.J., Baudin F., Cusack S., Ruigrok R.** (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, **458**, 1-5.
- Digard P., Elton D., Bishop K., Medcalf E., Weeds A., Pope B.** (1999). Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol*, **73**, 2222-2231.
- Drake J.W.** (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 4171-4175.
- Elton D., Simpson-Holley M., Archer K., Medcalf L., Hallam R., McCauley J., Digard P.** (2001). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*, **75**, 408-419.
- Engelhardt O.G., Smith M., Fodor E.** (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol*, **79**, 5812-5818.
- Engelhardt O.G., Fodor E.** (2006). Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev Med Virol*, **16**, 329-345.

Fodor E., Pritlove D.C., Brownlee G.G. (1994). The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol*, **68**, 4092-4096.

Fodor E., Pritlove D.C., Brownlee G.G. (1995). Characterization of the RNA-fork model of the virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol*, **69**, 4012-4019.

Fodor E., Mingay L.J., Crow M., Deng T., Brownlee G.G. (2003). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol*, **77**, 5017-5020.

Fodor E. (2013). The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta virologica*, **57**, 113 – 122.

Fortes P., Lamond A.I., Ortín J. (1995). Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J Gen Virol*, **76**, 1001-1007.

Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, **79**, 2814-2822.

Fujii Y., Goto H., Watanabe T., Yoshida T., Kawaoka Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2002-2007.

Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y., Kuno M., Kamiyama T., Kozaki K., Nomura N., Egawa H., Minami S., Watanabe Y., Narita H., Shiraki K. (2002). In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 977-981.

Furuta Y., Takahashi K., Kuno-Maekawa M., Sangawa H., Uehara S., Kozaki K., Nomura N., Egawa H., Shiraki K. (2005). Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 981-986.

Gabriel G., Herwig A., Klenk H.D. (2008). Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog*, **4**, e11.

Gao R., Cao B., Hu Y., Feng Z., Wang D., Hu W., Chen J., Jie Z., Qiu H., Xu K., Xu X., Lu H., Zhu W., Gao Z., Xiang N., Shen Y., He Z., Gu Y., Zhang Z., Yang Y., Zhao X.,

Zhou L., Li X., Zou S., Zhang Y., Li X., Yang L., Guo J., Dong J., Li Q., Dong L., Zhu Y., Bai T., Wang S., Hao P., Yang W., Zhang Y., Han J., Yu H., Li D., Gao G.F., Wu G., Wang Y., Yuan Z. and Shu Y. (2013). Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med*, **368**, 1888-97.

Gastaminza P., Perales B., Falcon A. M., Ortín J. (2003). Mutations in the N-Terminal Region of Influenza Virus PB2 Protein Affect Virus RNA Replication but Not Transcription. *J Virol*, **77**, 5098-5018.

Ghanem A., Mayer D., Chase G., Tegge W., Frank R., Kochs G., Garcia-Sastre A., Schwemmler M. (2007). Peptide-mediated interference with Influenza A virus polymerase. *J Virol*, **81**, 7801-7804.

Gibbs J.S., Malide D., Hornung F., Bennink J.R., Yewdell J.W. (2003). The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol*, **77**, 7214-7224.

González S., Zürcher T., Ortín J. (1996). Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4456–4463.

Gonzales S., Ortin J. (1999). Characterization of Influenza Virus PB1 Protein Binding to Viral RNA: Two Separate Regions of the Protein Contribute to the Interaction Domain. *J Virology*, **73**, 631-637.

Guilligay D., Tarendeau F., Resa-Infante P., Coloma R., Crepin T., Sehr P., Lewis J., Ruigrok R.W. H., Ortin J., Hart D.J., Cusack S. (2008). The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol*, **5**, 500-506.

Guilligay D., Kadlec J., Crépin T., Lunardi T., Bouvier D., Kochs G., Ruigrok R.W. and Cusack S. (2014). Comparative structural and functional analysis of orthomyxovirus polymerase cap-snatching domains. *PLoS One*, **9**, e84973.

Guu T.S.Y., Dong L., Wittung-Stafshede P., Tao Y.J. (2008). Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit. *Virology*, **379**, 135–142.

- Hankins R.W., Nagata K., Kato A., Ishihama A.** (1990). Mechanism of influenza virus transcription inhibition by matrix (M1) protein. *Res Virol*, **141**, 305-314.
- Hara K., Shiotab M., Kidob H., Ohtsua Y., Toyoda T.** (2001). Protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit. *International Congress Series*, **1219**, 479-485.
- Hara K., Schmidt F. I., Crow M., Brownlee G.G.** (2006). Amino Acid Residues in the N-Terminal Region of the PA Subunit of Influenza A Virus RNA Polymerase Play a Critical Role in Protein Stability, Endonuclease Activity, Cap Binding, and Virion RNA Promoter Binding. *J Virol*, **80**, 7789-7798.
- Harris A., Cardone G., Winkler D.C., Heymann J.B., Brecher M., White J.M., Steven A.C.** (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19123-19127.
- Hay A.J. Zambon M.C., Wolstenholme A.J., Skehel J.J., Smith M.H.** (1986) Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine. *J Antimicrob Chemoter*, **18**, 19-29.
- Hayden F.G.** (2006). Antiviral resistance in influenza viruses--implications for management and pandemic response. *N Engl J Med*, **354**, 785-788.
- He X., Zhou J., Bartlam M., Zhang R., Ma J., Lou Z., Li X., Jioachimiak A., Zeng Z., Ge R., Rao Z., Liu Y.** (2008). Crystal structure of the polymerase PA_C-PB1_N complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature*, **454**, 1123-1126.
- Hemerka J.N., Wang D., Weng Y., Lu W., Kaushik R.S., Jin J., Harmon A.F. and Li F.** (2009). Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay. *J Virol*, **83**, 3944-3455.
- Hodel A.E., Gershon P.D., Quioco F.A.** (1998). Structural basis for sequence-nonspecific recognition of 5'-capped mRNA by a cap-modifying enzyme. *Mol Cell*, **1**, 443-447.
- Honda A., Uéda K., Nagata K., Ishihama A.** (1988). RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem*, **104**, 1021-1026.
- Hopkins K., Cherry S.** (2013). Bunyaviral cap-snatching vs. decapping: Recycling cell cycle mRNAs. *Cell Cycle*, **12**, 3711-3712.

Huang T.S., Palese P., Krystal M. (1990). Determination of Influenza Virus Proteins Required for Genome Replication. *Virology*, **64**, 5669-5673.

Hui E.K., Barman S., Tang D.H., France B., Nayak D.P. (2006). YRKL sequence of influenza virus M1 functions as the L domain motif and interacts with VPS28 and Cdc42. *J Virol*, **80**, 2291-2308.

Hutchinson E.C., von Kirchbach J.C., Gog J.R., Digard P. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol*, **91**, 313-28.

Hutchinson E.C., Orr O.E., Man Liu S., Engelhardt O.G. and Fodor E. (2011). Characterization of the interaction between the influenza A virus polymerase subunit PB1 and the host nuclear import factor Ran-binding protein 5. *J Gen Virol*, **92**, 1859-1869.

Hutchinson E.C., Fodor E. (2012). Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. *Vaccine*, **30**, 7353–7358.

Jackson D.A., Caton A.J., McCready S.J., Cook P.R. (1982). Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature*, **296**, 366-8.

Jagger B.W., Wise H.M., Kash J.C., Walters K.A., Wills N.M., Xiao Y.L., Dunfee R.L., Schwartzman L.M., Ozinsky A., Bell G.L., Dalton R.M., Lo A., Efstathiou S., Atkins J.F., Firth A.E., Taubenberger J.K. and Digard P. (2012). An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, **337**, 199 –204.

Jorba N., Coloma R., Ortín J. (2009). Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog*, **5**, e1000462.

Karlas A., Machuy N., Shin Y., Pleissner K.P., Artarini A., Heuer D., Becker D., Khalil H., Ogilvie L.A., Hess S., Maurer A.P., Muller E., Wolff T., Rudel T., Meyer T.F. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, **463**, 818-822.

Kashiwagi T., Leung W., Deng T., Chen H., Brownlee G.G. (2009). The N-Terminal Region of the PA Subunit of the RNA Polymerase of Influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) Influences Promoter Binding. *PLoS One*, **5**, 1-11.

- Kawaguchi A., Naito T., Nagata K.** (2005). Involvement of Influenza Virus PA Subunit in Assembly of Functional RNA Polymerase Complexes. *J Virol*, **79**, 732–744.
- Kerry P., Willsher N., Fodor E.** (2008). A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminus of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. *Virology*, **373**, 202–210.
- Kessler U., Castagnolo D., Pagano M., Deodato D., Bernardini M., Pilger B., Ranadheera C. and Botta M.** (2013). Bioorg. Discovery and synthesis of novel benzofurazan derivatives as inhibitors of influenza A virus. *Med. Chem. Lett*, **2013**, *23*, 5575–5577.
- Kingsbury D.W.** (1970). Replication and functions of myxovirus ribonucleic acids. *Prog Med Virol*, **12**, 49-77.
- Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y., Shinya K., Sakabe S., Le Q.M., Ozawa M., Furuta Y., Kawaoka Y.** (2010). T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 882-887.
- Klumpp K., Ruigrok R.W., Baudin F.** (1997). Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J*, **16**, 1248-1257
- Kohno S., Kida H., Mizuguchi M., Hirotsu N., Ishida T., Kadota J., Shimada J.** (2011). Intravenous peramivir for treatment of influenza A and B virus infection in high-risk patients. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**, 2803-2812..
- Konig R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H.H., Bhattacharyya S., Alamares J.G., Tscherne D.M., Ortigoza M.B., Liang Y., Gao Q., Andrews S.E., Bandyopadhyay S., De Jesus P., Tu B.P., Pache L., Shih C., Orth A., Bonamy G., Miraglia L., Ideker T., Garcia-Sastre A., Young J.A., Palese P., Shaw M.L., Chanda S.K.** (2010). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*, **463**, 813-817.
- Korteweg C. and Gu J.** (2008). Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) infection in humans. *Am J Pathol*, **172**, 1155–1170.
- Koyama K., Takahashi M., Oitate M., Nakai N., Takakusa H., Miura S., Okazaki O.** (2009). CS-8958, a prodrug of the novel neuraminidase inhibitor R-125489, demonstrates a

favorable long-retention profile in the mouse respiratory tract. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 4845-4851.

Krug R.M., Broni B.A., Bouloy M. (1979). Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell*, **18**, 329-334.

Lamb R.A., Choppin P.W., Chanock R.M., Lai C.J. (1980). Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1857-1861.

Lee M.T.M., Bishop K., Medcalf L., Elton D., Digard P., Tiley L. (2002). Definition of the minimal components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **20**, 429-438.

Li C., Ba Q., Wu A., Zhang H., Deng T., Jiang T. (2013). A peptide derived from the C-terminus of PB1 inhibits influenza virus replication by interfering with viral polymerase assembly. *FEBS J*, **280**, 1139-1149.

Li M.L., Rao P., Krug R.M. (2001). The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J*, **20**, 2078-2086.

Liao T.L., Wu C.Y., Su W.C., Jeng K.S., Lai M.M. (2010). Ubiquitination and deubiquitination of NP protein regulates influenza A virus RNA replication. *EMBO J*, **29**, 3879-3890.

Liu H. and Yao X. (2010). Molecular basis of the interaction for an essential subunit PA-PB1 in influenza virus RNA polymerase: Insights from molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Mol Pharm*, **7**, 75-85.

Londo D.R., Davis A.R., Nayak D.P. (1983). Complete nucleotide sequence of the nucleoprotein gene of influenza B virus. *J Virol*, **47**, 642-648.

Loregian A., Marsden H.S., Palù G. (2002). Protein-protein interactions as targets for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol*, **12**, 239-262.

Loregian A., Appleton B.A., Hogle J., Coen D.M. (2004a). Residues of human cytomegalovirus DNA polymerase catalytic subunit UL54 that are necessary and sufficient for interaction with the accessory protein UL44. *J Virol*, **78**, 158-167.

Loregian A., Appleton B., Hogle J.M., Coen D.M. (2004b). Specific Residues in the Connector Loop of the Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Accessory Protein UL44 Are Crucial for Interaction with the UL54 Catalytic Subunit. *J Viro.*, **78**, 1-9.

Loregian A., Palù G. (2005a). Disruption of the interactions between the subunits of herpesvirus DNA polymerases as a novel antiviral strategy. *Clin Microbiol Infect*, **11**, 437-446.

Loregian A., Palù G. (2005b). Disruption of protein-protein interactions: towards new targets for chemotherapy. *J Cell Physiol*, **204**, 750-762.

Loregian A., Coen D.M. (2006). Selective anti-cytomegalovirus compounds discovered by screening for inhibitors of subunit interactions of the viral polymerase. *Chem Biol*, **13**, 191-200.

Lu Y., Qian X.Y., Krug R.M. (1994). The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, **8**, 1817-1828.

Luo G.X., Luytjes W., Enami M., Palese P. (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol*, **65**, 2861-2867.

Malakhov M.P., Aschenbrenner L.M., Smee D.F., Wandersee M.K., Sidwell R.W., Gubareva L.V., Mishin V.P., Hayden F.G., Kim D.H., Ing A., Campbell E.R., Yu M., Fang F. (2006). Sialidase fusion protein as a novel broad-spectrum inhibitor of influenza virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 1470-1479.

Mänz B., Brunotte L., Reuther P. and Schwemmler M. (2012). Adaptive mutations in NEP compensate for defective H5N1 RNA replication in cultured human cells. *Nat Commun*, **3**, 64-74.

Marcotrigiano J., Gingras A.C., Sonenberg N., Burley S.K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell*, **89**, 951-961.

Massari S., Nannetti G., Goracci L., Sancineto L., Muratore G., Sabatini S., Manfroni G., Mercorelli B., Cecchetti V., Facchini M., Palù G., Cruciani G., Loregian A. and Tabarrini O. (2013). Structural Investigation of Cycloheptathiophene-3-carboxamide

Derivatives Targeting Influenza Virus Polymerase Assembly. *J. Med. Chem*, **56**, 10118-10131.

Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.D. (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **10**,14620-4624.

Moeller A., Kirchdoerfer R.N., Potter C.S., Carragher B. and Wilson I.A. (2012). Organization of the influenza virus replication machinery. *Science*, **338**, 1631-1634.

Momose F., Basler C.F., O'Neill R.E., Iwamatsu A., Palese P., Nagata K. (2001). Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol*, **75**, 1899-1908.

Monto A.S. (2006). Vaccines and antiviral drugs in pandemic preparedness. *Emerg Infect Dis*, **12**, 55–60.

Moscona A. (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*, **353**, 1363-1373.

Moya A., Holmes E.C., González-Candelas F. (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 279-288.

Muller K.H., Kakkola L., Nagaraj A.S., Cheltsov A.V., Anastasina M., Kainov D.E. (2012). Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. *Trends Pharmacol Sci*, **33**, 89-99.

Muramoto Y., Noda T., Kawakami E., Akkina R., Kawaoka Y. (2013). Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol*, **87**, 2455-2562.

Muratore G., Goracci L., Mercorelli B., Foeglein Á., Digard P., Cruciani G., Palù G. and Loregian, A. (2012)a. Small molecule inhibitors of influenza A and B viruses that act by disrupting subunit interactions of the viral polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **109**, 6247–6252.

Muratore G., Mercorelli B.; Goracci L., Cruciani G., Digard P., Palù G., Loregian A. (2012)b. The human cytomegalovirus inhibitor AL18 also possesses activity against influenza A and B viruses. *Antimicrob. Agents Chemother*, **56**, 6009–6013.

- Murti K.G., Webster R.G., Jones I.M.** (1988). Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology*, **164**, 562-566.
- Nelson M. I. and Holmes E. C.** (2007). The evolution of epidemic influenza. *Nature Reviews Genetics*, **8**, 196-205.
- Neumann G., Castrucci M.R., Kawaoka Y.** (1997). Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol*, **71**, 9690-9700.
- Neumann G., Brownlee G.G., Fodor E., Kawaoka Y.** (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, **283**, 121-143.
- Neumann G., Noda T. and Kawaoka Y.** (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, **459**, 931-939.
- Newcomb L.L., Kuo R., Ye Q., Jiang Y., Tao Y.J., Krug R.M.** (2008) Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol*, **83**, 29-36.
- Ng A.K., Zhang H., Tan K., Li Z., Liu J.H., Chan P.K., Li S.M., Chan W.Y., Au S.W., Joachimiak A., Walz T., Wang J.H. and Shaw P.C.** (2008). Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *FASEB J*, **22**, 3638–3647.
- Nieto A., de la Luna S., Bfircena J., Portela A., Ortin J.** (1994). Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol*, **75**, 29-36.
- Obayashi E., Yoshida H., Kawai F., Shibayama N., Kawaguchi A., Nagata K., Tame J.R., Park S.Y.** (2008) The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature*, **454**, 1127-1131.
- Ohtsu Y., Honda Y., Sakata Y., Kato H., Toyoda T.** (2001). Fine mapping of the subunit binding site of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol*, **46**, 167-175.
- O’Keefe B.R., Smee D.F., Turpin J.A., Saucedo C.J., Gustafson K.R., Mori T., Blakeslee D., Buckheit R., Boyd M.R.** (2003). Potent anti-influenza activity of cyanovirin-N and interactions with viral hemagglutinin. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2518–2525.

O'Neill R.E. and Palese P. (1995). NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology*, **206**, 116-125.

Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A. (2000). Influenza B virus in seals. *Science*, **288**, 1051-1053.

Pagano M., Castagnolo D., Bernardini M., Fallacara A.L., Laurenzana I., Deodato D., Kessler U., Pilger B., Stergiou L., Strunze S., Tintori C. and Botta M. (2014). The Fight against the Influenza A Virus H1N1: Synthesis, Molecular Modeling, and Biological Evaluation of Benzofurazan Derivatives as Viral RNA Polymerase Inhibitors. *ChemMedChem*, **9**, 129-50.

Palese P., Compans R.W. (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol*, **33**, 159-163.

Palese P. (2007). Orthomyxoviridae. *Fields Virology*, (4th edition) (Knipe, D.M. and Howley, P.M., eds), pp. 1647-1689, Lippincott Williams & Wilkins.

Palù G. and Loregian A. (2013). Inhibition of herpesvirus and influenza virus replication by blocking polymerase subunit interactions. *Antiviral Res*, **99**, 318-327.

Parkes K.E., Ermert P., Fassler J., Ives J., Martin J.A., Merrett J.H., Obrecht D., Williams G., Klumpp K. (2003). Use of a pharmacophore model to discover a new class of influenza endonuclease inhibitors. *J Med Chem*, **46**, 1153-1164.

Paterson D and Fodor E. (2012). Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS Pathog*, **8**, e1003019.

Peiris, J.S. Yu W.C., Leung C.W., Cheung C.Y., Ng W.F., Nicholls J.M., Ng T.K., Chan K.H., Lai S.T., Lim W.L., Yuen K.Y., Guan Y. (2004). Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet*, **363**, 617–619.

Perales B., de la Luna S., Palacios I., Ortin J. (1996). Mutational Analysis Identifies functional Domains in the Influenza A Virus PB2 Polymerase Subunit. *J Virol*, **70**, 1678–1686.

- Perez D.R., Donis R.O.** (1995). A 48-Amino-Acid Region of Influenza A Virus PB1 Protein Is Sufficient for Complex Formation with PA. *J Virol*, **69**, 6932-6939.
- Perruccio F., Mason J. S., Sciabola S., Baroni M.** (2006). FLAP: 4-Point Pharmacophore Fingerprints from GRID. *Molecular Interaction Fields*. (Cruciani G., Ed), pp. 83-102, Wiley-VCH: Weinheim, Germany.
- Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A.** (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.
- Pinto L.H., Lamb R.A.** (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem*. **281**, 8997-9000.
- Pleschka S., Jaskunas S.R., Engelhardt O. G., Zurcher T., Palese P., Garsia-Sastre A.** (1996). A Plasmid-Based Reverse Genetics System for Influenza A Virus. *J Virol*, **70**, 4188-4192.
- Plotch S.J., Tomasz J., Krug R.M.** (1978). Absence of detectable capping and methylating enzymes in influenza virions. *J Virol*, **28**, 75-83.
- Poch O., Sauvaget I., Delarue M., Tordo N.** (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*, **8**, 3867-3874.
- Poole E.L., Elton D., Medcalf L., Digard P.** (2004). Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*, **321**, 120–133.
- Poole E.L., Medcalf L., Elton D., Digard P.** (2007). Evidence that the C-terminal PB2-binding region of the influenza A virus PB1 protein is a discrete α -helical domain. *FEBS Lett*, **581**, 5300–5306.
- Poon L.L., Pritlove D.C., Sharps J., Brownlee G.G.** (1998). The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol*, **72**, 8214-8219.
- Qi X., Jiang D., Wang H., Zhuang D., Ma J., Fu J., Qu J., Sun Y., Yu S., Meng Y., Huang Y., Xia L., Li Y., Wang Y., Wang G., Xu K., Zhang Q., Wan M., Su X., Fu G. and Gao G.F.** (2014). Calculating the burden of disease of avian-origin H7N9 infections in China. *BMJ Open*, **4**, e004189.

- Reid, A.H., Taubenberger J.K., Fanning T.G.** (2001). The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology. *Microbes Infect*, **3**, 81–87.
- Resa-Infante P., Jorba N., Coloma R., Ortin J.** (2011) The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol*, **8**, 207-215.
- Robertson J.S.** (1979). 5' and 3' terminal nucleotide sequence of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res*, **6**, 3745-3757.
- Robertson J.S., Schubert M., Lazzarini R.A.** (1981). Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *J Virol*, **38**, 157-163.
- Ruigrok R.W., Baudin F.** (1995). Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol*, **76**, 1009-1104.
- Russel R.J. Kerry P.S., Stevens D.J., Steinhauer D.A., Martin S.R., Gamblin S.J., Skehel J.J.** (2008). Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *PNAS* **105**, 17736-17741.
- Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G.** (2013). Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res*, **98**, 174-185.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sanz-Ezquerro J.J., Zurcher T., de la Luna S., Ortin J., Nieto A.** (1996). The Amino-Terminal One-Third of the Influenza Virus PA Protein Is responsible for the Induction of Proteolysis. *J Virol*, **70**, 1905-1911.
- Sanz-Ezquerro J.J., Santaren J.F., Sierra T., Aragon T., Ortega J., Ortin J., Smith G.L., Nieto A.** (1998). The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol*, **79**, 471-478.
- Scholtissek C., Becht H.** (1971). Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *J Gen Virol*, **10**, 11-16.

Skehel J.J., Bayley P.M., Brown E.B., Martin S.R., Waterfield M.D., White J.M., Wilson I.A., Wiley D.C. (1982). Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 968-972.

Skehel J.J., Wiley D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, **69**, 31-69.

Sidorenko Y., Reichl U. (2003). Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotec Bioeng*, **88**, 1-14.

Sidwell R.W., Huffman J.H., Khare G.P., Allen L.B., Witkowski J.T., Robins R.K. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of virazole. *Science*, **177**, 705-706.

Sidwell R.W., Robins R.K., Hillyard I.W. (1979). Ribavirin: an antiviral agent. *Pharmacol Ther*, **6**, 123-146.

Sidwell R.W., Bailey K.W., Wong M.H., Barnard D.L., Smee D.F. (2005). In vitro and in vivo influenza virus-inhibitory effects of viraclidine. *Antiviral Res*, **68**, 10-17.

Smee D.F., Bailey K.W., Wong M.H., O'Keefe B.R., Gustafson K.R., Mishin V.P., Gubareva L.V. (2008). Treatment of influenza A (H1N1) virus infections in mice and ferrets with cyanovirin-N. *Antiviral Res*, **80**, 266-271.

Steinhauer D.A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, **258**, 1-20.

Su C.Y., Cheng T.J., Lin M.I., Wang S.Y., Huang W.I., Lin-Chu S.Y., Chen Y.H., Wu C.Y., Lai M.M., Cheng W.C., Wu Y.T., Tsai M.D., Cheng Y.S., Wong C.H. (2010). High-throughput identification of compounds targeting influenza RNA-dependent RNA polymerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 19151-19156.

Subbarao, K. Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K., Cox N. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, **279**, 393-396.

Sugiyama K., Obayashi E., Kawaguchi A., Suzuki Y., Tame J.R., Nagata K., Park S.Y. (2009). Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *EMBO J*, **28**, 1803-11.

Tarendeau F., Boudet J., Guilligay D., Mas P.J., Bougault C.M., Boulo S., Baudin F., Ruigrok R.W.H., Daigle N., Ellenberg J., Cusack S., Simorre J.P., Hart D.J. (2007). Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 229-233.

Tarendeau F., Crepin T., Guilligay D., Ruigrok R.W.H., Cusack S., Hart D.J. (2008). Host determinant Residue Lysine 627 Lies on the Surface of a Discrete, Folded Domain of Influenza Virus Polymerase PB2 Subunit. *PLoS Pathog*, **4**, 1-8.

Tintori C., Laurenzana I., Fallacara A.L., Kessler U., Pilger B., Stergiou L. and Botta M. (2014). High-throughput docking for the identification of new influenza A virus polymerase inhibitors targeting the PA-PB1 protein-protein interaction. High-throughput docking for the identification of new influenza A virus polymerase inhibitors targeting the PA-PB1 protein-protein interaction. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **24**, 280-282.

Tomassini J., Selnick H., Davies M.E., Armstrong M.E., Baldwin J., Bourgeois M., Hastings J., Hazuda D., Lewis J., McClements W., Ponticello G., Radzilowski E., Smith G., Tebben A. and Wolfe A. (1994). Inhibition of cap (m7GpppXm)-dependent endonuclease of influenza virus by 4-substituted 2,4-dioxobutanoic acid compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, **38**, 2827-2837.

Tomassini J.E., Davies M.E., Hastings J.C., Lingham R., Mojena M., Raghoobar S.L., Singh S.B., Tkacz J.S., Goetz M.A. (1996). A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 1189-1193.

Toyoda T., Adyshev D.M., Kobayashi M., Iwata A., Ishihama A. (1996). Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol*, **77**, 2149-2157.

Triana-Baltzer G.B., Gubareva L.V., Klimov A.I., Wurtman D.F., Moss R.B., Hedlund M., Larson J.L., Belshe R.B., Fang F. (2009). Inhibition of Neuraminidase Inhibitor-Resistant Influenza Virus by DAS181, a Novel Sialidase Fusion Protein. *PLoS One*, **4**, e7838.

Tsang K.W., Eng P., Liam C.K., Shim Y.S., Lam W.K. (2005). H5N1 influenza pandemic: contingency plans. *Lancet*, **366**, 533-534.

Van Hoeven N., Pappas C., Belser J.A., Maines T.R., Zeng H., García-Sastre A., Sasisekharan R., Katz J.M., Tumpey T.M. (2009). Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 3366-3371.

Wandinger-Ness A., Bennett M.K., Antony C., Simons K. (1990). Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J Cell Biol*, **111**, 987-1000.

Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Pinto L.H., Lamb R.A., Klein M.L. and Degrado W.F. (2013). Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 1315-1320.

Webster R.G., Rott R. (1987). Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell*, **50**, 665-666.

Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, **56**, 152-179.

Wilson N., Barker M.G. (2009). The emerging influenza pandemic: estimating the case fatality ratio. *European communicable disease bulletin*, **14**, 11-14.

Wise H., Foeglein A., Sun J., Dalton R.M., Patel S., Howard W., Anderson E.C., Barclay W.S., Digard P. (2009). A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. *J Virol*, **83**:8021–8031.

Wise H.M., Hutchinson E.C., Jagger B.W., Stuart A.D., Kang Z.H., Robb N., Schwartzman L.M., Kash J.C., Fodor E., Firth A.E., Gog J.R., Taubenberger J.K. and Digard P. (2012). Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog*, **8**, 246-259.

Wiwanitkit V. (2013). H7N9 Influenza: The Emerging Infectious Disease. *N Am J Med Sci*, **5**, 395-398.

Wright, P.F., Webster, R.G. (2001) Orthomyxoviruses. In *Fields Virology* (4th edition) (Knipe, D.M. and Howley, P.M., eds), pp. 1533–1579, Lippincott Williams & Wilkins.

Wunderlich K., Mayer D., Ranadheera C., Holler A.S., Manz B., Martin A., Chase G., Tegge W., Frank R., Kessler U., Schwemmler M. (2009). Identification of a PA-Binding Peptide with Inhibitory Activity against Influenza A and B Virus Replication. *PLoS One*, **4**, 1-10.

Yamashita M., Tomozawa T., Kakuta M., Tokumitsu A., Nasu H., and Kubo S. (2009). CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 186-192.

Ye Q., Krug R.M., Tao Y.J. (2006). The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, **444**: 1078-1082.

Yuan P., Bartlam M., Lou Z., Chen S., Zhou J., He X., Lv Z., Ge R., Li X., Deng T., Fodor, Zihao E., Liu Y. (2009). Crystal structure of an avian influenza polymerase PAN reveals an endonuclease active site. *Nature*, **458**, 909-913.

Zamarin D., Ortigoza M. B., Palese P. (2006). Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol*, **80**, 7976–7983.

Zhang H., Hale B.G., Xu K. and Sun B. (2013). Viral and Host Factors Required for Avian H5N1 Influenza A Virus Replication in Mammalian Cells. *Viruses*, **5**, 1431-1446.

Zhang W., Wang C.Y., Yang S.T., Qin C., Hu J.L., Xia X.Z. (2009). Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication by the small interfering RNA targeting polymerase A gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **390**, 421-426.

Zhao H., Ekström M., Garoff H. (1998). The M1 and NP proteins of influenza A virus form homo- but not heterooligomeric complexes when coexpressed in BHK-21 cells. *J Gen Virol*, **79**, 2435-2446.

Zheng W., Olson J., Vakharia V., Tao Y.J. (2013). The crystal structure and RNA-binding of an orthomyxovirus nucleoprotein. *PLoS Pathog*, **9**, e1003624.

Zurcher T., de la Luna S., Sanz-Ezquerro J.J., Nieto A., Ortin J. (1996). Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J Gen Virol*, **77**, 1745-1749.

Zvonarjev A.Y., Ghendon Y.Z. (1980). Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine. *J Virol*, **33**, 583-586.

7. Ringraziamenti

Giunto al termine di questo percorso, desidero ringraziare tutte le persone che hanno lavorato con me in questi anni.

Prima di tutto voglio ringraziare il Prof. Giorgio Palù, per avermi dato la possibilità di svolgere il dottorato presso il Dipartimento di Medicina Molecolare.

Un ringraziamento particolare è rivolto al mio supervisore, la Prof.ssa Arianna Loregian, per la sua competenza e professionalità con cui mi ha guidato in questi tre anni, ma anche per la fiducia e l'immane sostegno dimostratomi.

Ringrazio tutte le mie colleghe con cui ho condiviso quotidianamente questa esperienza, in particolar modo Giulia, Beatrice, Chiara, Elisa, Silvana e Teresa, per i loro fondamentali consigli nello sviluppo di questo progetto ed il supporto che mi hanno fornito.

Infine desidero ringraziare tutte le persone dell'Università di Perugia con cui ho collaborato in questi anni, per il loro prezioso contributo alla realizzazione di questo lavoro.