



Unione Europea



*Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca*



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dottorato di ricerca in
Biologia dei Sistemi
XI ciclo nuova serie
2009-2012

Nuove strategie per l'identificazione di molecole ad attività antifungina

Dottoranda

Elena Concetta Calabrese

Tutor

Ch.mo Prof. Bruno Maresca

Coordinatore

Ch.mo Prof. Antonietta Leone

Riassunto

Con l'incremento del numero di persone affette da sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), dell'uso di terapie immunosoppressive e del numero di pazienti affetti da varie forme di cancro e, dunque, fortemente debilitati si è avuto un concomitante incremento delle infezioni opportunistiche sorrette da funghi. Alcune di queste infezioni, come quelle causate da *Candida albicans*, sono malattie generalmente non letali, ma croniche e persistenti, che riducono notevolmente la qualità della vita dei pazienti. Queste malattie sono difficilmente curabili con gli attuali presidi terapeutici, i quali, la maggior parte delle volte, sono di per sé tossici nel caso di prolungato e massivo utilizzo. Negli ultimi anni si è presentata, dunque, sempre più l'esigenza di trovare nuove ed efficaci strategie terapeutiche per debellare queste patologie.

In questo progetto di tesi l'attenzione è stata focalizzata sull'individuazione di nuovi composti azolici in grado di diminuire o abolire specificamente la capacità germinativa ed infettiva di *C. albicans*.

Le sostanze in esame sono state, quindi, analizzate per determinarne l'attività antimicotica correlata alla capacità del fungo di invadere i macrofagi, nei quali manifesta la sua resistenza a fattori antimicrobici (defensine, basso valore di pH, metaboliti reattivi dell'ossigeno ed altri metaboliti tossici) ed a stress fisici (temperatura) eludendo, in tal modo, i meccanismi di difesa primari dell'ospite.

I test di suscettibilità sono stati svolti attraverso il metodo delle microdiluizioni in brodo, seguendo le linee guida suggerite dalla CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), utilizzando come farmaci di riferimento il fluconazolo ed il miconazolo. In particolare, le sostanze AF13 e AF23 hanno mostrato una forte attività antimicotica che si manifesta con la comparsa di un fenotipo particolarmente alterato di *C.albicans*. Il fungo, infatti, non solo non riesce a germinare, ma non porta a termine il processo di gemmazione, poiché non si ha la formazione del setto di divisione tra la cellula madre e le gemme che quindi non riescono a separarsi.

Inoltre è stata dimostrata la selettività di queste nuove molecole che non risultano essere citotossiche per cellule di mammifero quali macrofagi murini. Infatti durante un'infezione "in vitro" le sostanze in esame inibiscono totalmente la germinazione dei lieviti ma non danneggiano i macrofagi che svolgono la loro attività di fagocitosi,

con formazione del fagolisosoma e digestione delle cellule di *Candida*.

L'inibizione totale del processo di germinazione è stata messa in evidenza mediante esperimenti con il Filipin, un colorante specifico per gli steroli di membrana: le molecole in esame impediscono la formazione dei domini ricchi in steroli, fondamentali per lo sviluppo del tubo germinativo.

A questo punto, è stata indagata la capacità di tali molecole di inibire ERG11p, l'enzima che catalizza la rimozione del gruppo metilico in posizione 14- α del lanosterolo, passaggio chiave per ottenere l'ergosterolo. Esperimenti di *Binding*, hanno dimostrato che gli azoli di nuova sintesi si legano all'enzima con un livello di affinità paragonabile a quello riscontrato per il fluconazolo.

Esperimenti di "*Time Killing*" hanno dimostrato che, a differenza del fluconazolo ad attività fungistatica, le sostanze in esame esplicano un'azione fungicida su *C.albicans*.

L'insieme di questi risultati ha permesso di ipotizzare la presenza di un meccanismo d'azione aggiuntivo rispetto a quello dei classici azoli, che è alla base dell'effetto fungicida da parte di questi composti.

Per confermare la presenza di tale meccanismo d'azione addizionale sono stati effettuati esperimenti di sinergismo, i quali hanno dimostrato che il trattamento con le molecole AF13 o AF23 in combinazione con il fluconazolo dà luogo ad una maggiore inibizione della crescita cellulare rispetto a quando gli azoli sono utilizzati singolarmente. Questi risultati sono di fondamentale importanza, poiché la possibilità di effettuare una terapia di due farmaci in combinazione significa poter ridurre le dosi di entrambi i farmaci, rendendo la terapia delle micosi molto più breve ed efficace con conseguente riduzione sia degli effetti collaterali che del manifestarsi di fenomeni di resistenza e, quindi, consente di migliorare la qualità della vita del paziente.

Infine, in questo progetto di tesi è stata anche valutata l'attività dei composti in esame su due ceppi di *Candida albicans* resistenti al trattamento con il fluconazolo per la presenza di una *up*-regolazione delle pompe di efflusso o per modifiche a carico del target (*ERG11*). I risultati ottenuti sono stati molto incoraggianti, in quanto gli azoli in studio sono attivi su entrambi i ceppi; questo vuol dire avere a disposizione molecole da utilizzare quando le terapie con i classici azoli risultano fallimentari.

Abstract

Disseminated candidiasis is a serious life-threatening infection that causes significant mortality and morbidity in critically ill patients. In particular, oropharyngeal infection is very common in immunodrepressed individuals, particularly in patients with AIDS, while deep-seated infections are frequent in neutropenic patients. The incidence of candidiasis has increased 5-fold over the past ten years due to the widespread use of broad-spectrum antibiotics to the growing population of immunocompromised patients, as a consequence of immunosuppressive agents, radiotherapy and antitumoral drugs.

The current guidelines for treating invasive candidiasis by the Infectious Diseases Society of America recommend the use of an azole derivative (fluconazole, miconazole). Concentrations of these drugs (or active metabolites) in cerebrospinal fluid (CSF) and urine are minimal, thus limit their clinical utility in treating urinary and CSF infections. In addition, the high cost of these drugs cannot be ignored. Although not devoid of side effects and drug–drug interactions, azole antifungal agents, particularly fluconazole, exhibit a good profile of tolerance in the range of doses recommended in invasive candidiasis and are still considered the drug of choice to treat most *Candida* infections due to their broad-spectrum activities and improved safety profiles.

Azole antifungals competitively inhibit the activity of sterol 14 α -demethylase (ERG11p), the key enzyme in sterol biosynthesis in yeast and fungi. Since ergosterol maintains the integrity and fluidity of cell membranes, inhibition of ERG11p would cause depletion of ergosterol and accumulation of lanosterol and other 14-methyl sterols resulting in the growth inhibition of fungal cells. Azole antifungals are generally fungistatic and their intensive clinical use for both therapy and prophylaxis has favored the emergence of resistant strains. Several mechanisms govern resistance to azole antifungal agents in *C. albicans* and the over-expression of the gene encoding efflux pumps and/or upregulation or amino acid substitutions of *ERG11* are among the most significant and intensively studied.

In light of these findings, there is an urgent need for new antifungal agents exhibiting broad-spectrum activities, low toxicity and different mechanisms of action. In particular, identification of new therapeutically useful azoles that have a synergic effect and that do not exhibit cross-resistance with current antifungals might

overcome antifungal drug resistance and/or reduce side effects associated with high doses of drugs.

We selected compounds from our chemical library based on their *in vitro* antifungal potential. After a preliminary screening, we chosen two compounds, 1-(1-(biphenyl-4-yl)-3-(4-fluorophenyl)propan-2-yl)-1*H*-imidazole (AF13) and 1-(1-(biphenyl-4-yl)-3-(5-chlorothiophen-2-yl)propan-2-yl)-1*H*-imidazole (AF23).

In this study, the antifungal activity of twoazole compounds was examined alone and in combination with fluconazole. We investigated their effect on membrane lipid composition and fungal morphology. Our findings suggest that the activity of fluconazole against *C.albicans* can be enhanced by these compounds. Thus AF13 and AF23 can be further studied for their potential role in combination therapy with other azoles.

