

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA



**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
DIPARTIMENTO DI FARMACIA**

Corso di laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

**Sintesi di analoghi del cicloguanile quali inibitori
della pteridina reduttasi 1 (PTR1)
di *Trypanosoma Brucei***

Relatore:

Prof. Michele Tonelli

Correlatore:

Dr.ssa Valeria Francesconi

Candidata:

Silvia Marcaccini

Anno accademico 2022-2023

Sommario

1. Introduzione	1
1.1. Tripanosomiasi	2
1.1.1. Tripanosomiasi animale	2
1.1.2. Tripanosomiasi umane	3
1.1.3. Morfologia del Tripanosoma	4
1.1.4. Tripanosomiasi Africana	5
1.1.4.1. Epidemiologia.....	5
1.1.4.2. Trasmissione.....	7
1.1.4.3. Ciclo vitale del tripanosoma	8
1.1.4.4. Meccanismi di resistenza alle difese dell'ospite.....	10
1.1.4.5. Patogenesi.....	12
1.1.4.6. Diagnosi	14
1.1.5. Terapie farmacologiche per la HAT	17
1.1.5.1. Associazione dei farmaci attuali	22
1.1.6. Il metabolismo dei folati del <i>T. brucei</i>	24
1.1.6. Pteridina reduttasi 1 (PTR1).....	25
1.1.6.1 Sito catalitico della PTR1	28
1.1.6.2. Differenze e analogie dei siti catalitici di DHFR e PTR1	29
1.1.7 Sviluppo di nuovi inibitori di PTR1.....	30
1.1.7.1. Derivati del cicloguanile	35
1.1.7.2. Derivati pirrolopirimidinici	37
2. Obiettivo della Tesi.....	39
3. Risultati e discussione	41
4. Parte sperimentale chimica	43
4.1. Sintesi generale dei derivati 4,6-diammino-1,2-diidrotiazinici 1-4.....	43
4.2 Sintesi del composto (5).....	44
Bibliografia	45

1. Introduzione

Le malattie tropicali neglette (Neglected Tropical Diseases - NTDs) sono definite dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) un gruppo di malattie causate da diversi agenti eziologici quali batteri, virus, parassiti, funghi e tossine [1].

Le malattie identificate attualmente sono venti: ulcera del Buruli, malattia di Chagas (Tripanosomiasi americana), dengue, dracunculosi (malattia del verme della Guinea), echinococcosi cistica ed alveolare, trematodiasi alimentari, Tripanosomiasi africana umana (Malattia del sonno), leishmaniosi, lebbra (malattia di Hansen), filariosi linfatica, micetoma, cromoblastomicosi e altre micosi profonde, oncocercosi (cecità fluviale), rabbia, scabbia e altre ectoparassitosi, schistosomiasi (Bilharzia), elmintiasi trasmesse dal suolo, teniasi e cisticercosi, tracoma, framboesia (treponematosi endemiche), avvelenamento da morso di serpente [2].

Queste patologie affliggono oltre un miliardo di persone nel mondo, causando circa 500.000 morti l'anno. Principalmente colpiscono le popolazioni più povere e che vivono in aree lontane dai centri abitati, soprattutto dove i servizi sanitari sono scarsi ed inefficienti. Le aree maggiormente colpite sono quelle tropicali, ma la diffusione si riscontra a livello globale a causa di migrazione, commercio (in particolare di beni alimentari, animali da compagnia e bestiame), turismo che aumentano la diffusione dei vettori di queste malattie [2].

Le parassitosi rappresentano una grave causa di mortalità e morbilità nel mondo. Le parassitosi umane sono infezioni causate da diversi tipi di organismi sia unicellulari che pluricellulari. Questi sono suddivisi in endoparassiti e ectoparassiti. Tra gli ectoparassiti troviamo gli organismi pluricellulari ad esempio zecche, pidocchi e scabbia. Tra gli endoparassiti vi sono organismi sia unicellulari che pluricellulari. I pluricellulari si dividono in nematodi e

platelminti appartenenti al phylum degli elminti, gli unicellulari sono rappresentati dai protozoi. I protozoi sono microrganismi monocellulari eucarioti di dimensioni 2 – 100 micron appartenenti a quattro diversi phyla: flagellati, ciliati, amebe, coccidi.

1.1. Tripanosomiasi

Il tripanosoma è un protozoo appartenente al phylum dei flagellati del quale esistono diverse specie che possono infettare sia gli animali che l'uomo. Quando il parassita infetta l'uomo causa malattie con sintomatologia differente a seconda del tipo di tripanosoma che ha causato l'infezione. La tripanosomiasi umana è causata da due specie con diversa distribuzione geografica: il *Tripanosoma Brucei* diffuso nell'Africa Sub-Sahariana e il *Tripanosoma Cruzi* diffuso nel Sud America [3]. Il *T. brucei* può essere ulteriormente distinto in tre sottospecie: *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodesiense*.

1.1.1. Tripanosomiasi animale

Il *T. brucei brucei* è l'agente eziologico della tripanosomiasi africana animale, e non risulta essere in grado di infettare l'uomo. Le altre due sottospecie, *T.b. rhodesiense* e *T.b. gambiense* sono invece infettive per l'essere umano. Accanto al *T.b. brucei*, le altre sottospecie di tripanosoma in grado di infettare gli animali sono *T. evansi* e *T. equiperdum*. Mentre, *T.b. brucei* risulta associato prevalentemente a infezioni di diversi ungulati domestici come cavalli e cammelli, il *T. evansi* può infettare sia animali selvatici che domestici, tra cui i roditori [4].

L'infezione da *T.b. brucei* causa negli animali colpiti la Malattia Nagana che si presenta più grave negli animali domestici piuttosto che quelli selvatici dando sintomi quali febbre, perdita di pelo, stanchezza, edema, anemia e paralisi. La parola stessa “*Nagana*”, infatti, è un termine che significa letteralmente

“impotente/inutile” facendo riferimento ai sintomi che si riscontrano nell’animale [5].

1.1.2. Tripanosomiasi umane

Il *T. cruzi* è presente nell’area dell’America centro - meridionale e rappresenta l’agente eziologico della malattia di Chagas. Questo parassita è trasmesso sia direttamente dalla puntura di insetti vettori (triatominae), che indirettamente dall’ingestione di cibi contaminati da insetti infetti o dalle loro feci o, ancora, tramite i fluidi corporei di soggetti portatori (trasfusioni di sangue, via verticale, trapianto di organi). L’infezione causa lesioni cutanee nel sito di puntura (chagoma), febbre, malessere, linfadenopatia generalizzata ed epatosplenomegalia nelle prime fasi. Dopo anni dall’infezione i pazienti possono sviluppare aritmie, cardiomiopatia cronica o meno comunemente megaesofago o megacolon [6,7].

Il *T. brucei* è l’agente patogeno della cosiddetta Malattia del Sonno, patologia che, se non adeguatamente trattata, può risultare fatale. Esistono due sottospecie morfologicamente indistinguibili di *T. brucei* che causano due malattie differenti nell’ospite umano: una a progressione lenta (cronica) causata dal *T.b. gambiense* e l’altra a progressione rapida (acuta) causata dal *T.b. rhodesiense* [8].

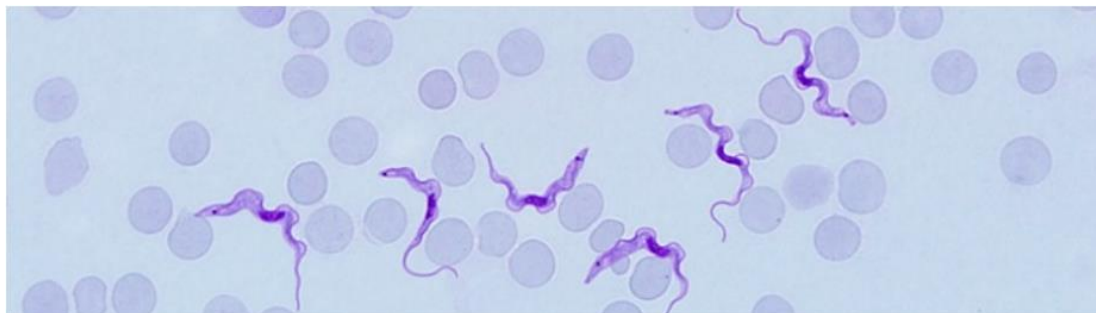


Figura 1. *Trypanosoma brucei rhodesiense* in uno striscio di sangue su vetrino visualizzato con colorazione Giemsa (Credit: DPDx)

1.1.3. Morfologia del Tripanosoma

I parassiti del genere tripanosoma hanno forma allungata, lunghezza di circa 20 micron, conferitagli dal citoscheletro. Il citoscheletro è costituito da microtubuli che presentano una polarità uniforme, ciò permette di distinguere una parte anteriore ed una posteriore del tripanosoma [9].

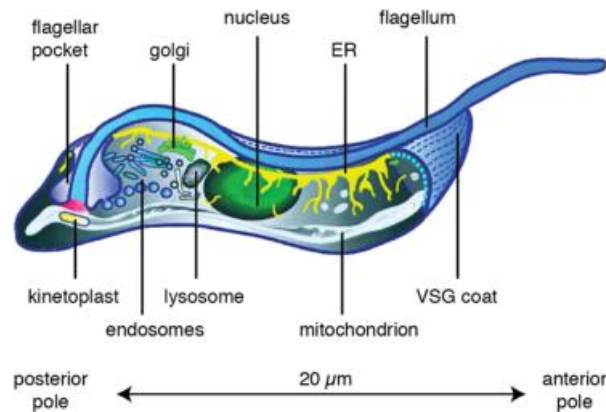


Figura 2: Morfologia generale del tripanosoma.

I microtubuli sono regolarmente distanziati, collegati tra loro e alla membrana plasmatica. Al polo posteriore della cellula si trova la tasca flagellare che è un'invaginazione della membrana plasmatica in cui si verificano endocitosi, esocitosi e uscita del flagello. Il flagello è legato al corpo della cellula e si estende dalla parte posteriore da cui emerge, sino alla parte anteriore.

La maggior parte degli organelli del tripanosoma (apparato di Golgi, apparato endosomiale) sono in singola copia nella cellula e hanno una localizzazione tra la tasca flagellare e la parte centrale del tripanosoma. Anche il nucleo è compartimentalizzato nella parte centrale della cellula eucariotica. Il mitocondrio in particolare abbraccia l'intera struttura del tripanosoma correndo lungo il suo asse longitudinale. Il cinetoplasto invece è localizzato nel polo posteriore in quanto è connesso all'origine del flagello e al corpo basale [10].

Il flagello è la parte che permette il movimento del parassita che si sviluppa lungo l'asse longitudinale del flagello stesso, quindi, il tipo di movimento del

tripanosoma può essere definito “trascinato”. La maggior parte di questo organello è ancorata al citoscheletro del corpo cellulare mentre l’estremità anteriore, invece, risulta staccata creando una sporgenza [11].

1.1.4. Tripanosomiasi Africana

1.1.4.1. Epidemiologia

La tripanosomiasi africana umana (HAT) ha un forte impatto sulla salute pubblica nelle aree coinvolte; attualmente si stima che le persone colpite dalla malattia siano da 300.000 a 500.000 [12].

Il *T.b. gambiense*, endemico in 24 paesi dell’Africa occidentale, è responsabile di circa il 95% delle infezioni di HAT in forma cronica. Un soggetto può essere portatore del patogeno per mesi senza però mostrare segni evidenti della malattia. Pertanto, quando cominciano a comparire i primi sintomi, spesso i pazienti si trovano in uno stadio già avanzato dell’infezione [13].

Il *T.b. rhodesiense* è presente in 13 paesi dell’Africa orientale e meridionale e causa il 5% delle infezioni di HAT. L’infezione porta allo sviluppo della forma acuta della malattia, in cui i primi segni si manifestano dopo che settimane o mesi dall’infezione dando sintomi di coinvolgimento del sistema nervoso centrale [13].

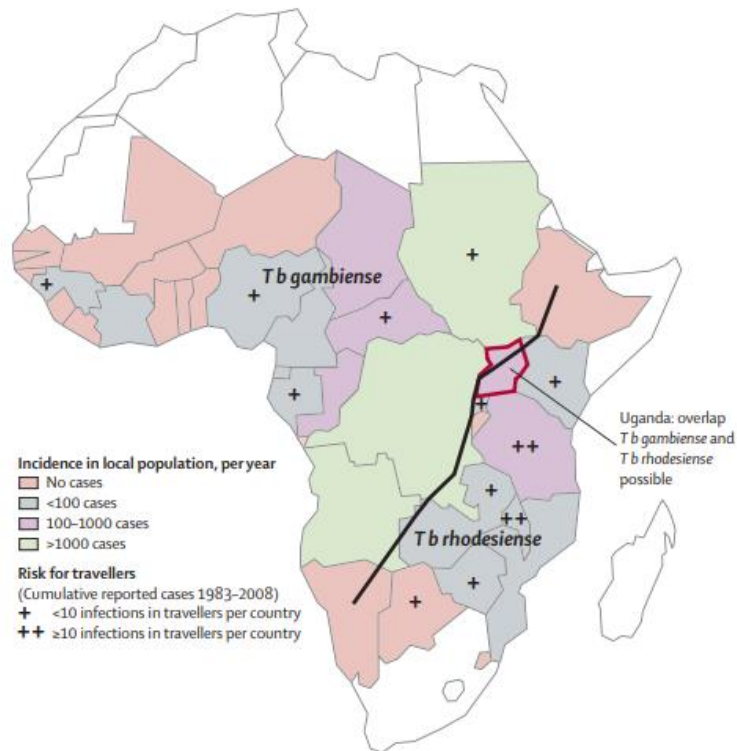


Figura 3. Distribuzione delle due specie di tripanosoma presenti nel continente africano [14].

I paesi più colpiti dalla HAT sono: Angola, Camerun, Repubblica Centrafricana, Ciad, Congo, Malawi, Guinea, Zambia Sud Sudan, Costa d’Avorio, Guinea Equatoriale, Uganda, Repubblica Unita di Tanzania, Zimbabwe e Gabon. L’Uganda è l’unico paese in cui è stata segnalata la presenza sia del *T.b. rhodesiense* che del *T.b. gambiense* [4].

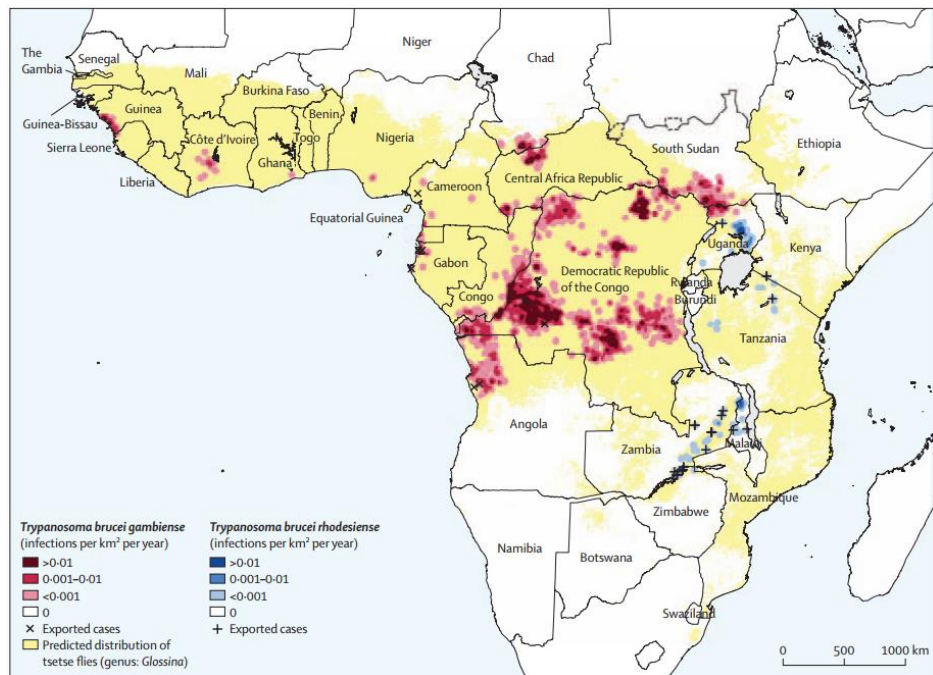


Figura 4. Distribuzione e incidenza delle infezioni da parte di *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* [8].

Tra il 1999 e il 2021, il numero segnalato di nuovi casi della forma cronica di tripanosomiasi africana umana (*T. b. gambiense*) è diminuito del 97%, da 27.862 a 747 casi registrati. Nello stesso periodo, il numero di nuovi casi segnalati della forma acuta di tripanosomiasi africana umana (*T. b. rhodesiense*) è diminuito del 91%, da 619 a 55 casi totali [15].

Questi dati rappresentano il minimo storico di casi di infezione, a tal punto che le tripanosomiasi africane umane sono state identificate dalla World Health Organization (WHO) come patologie candidate per l'eradicazione. Tuttavia, questo obiettivo è ancora lontano dall'essere raggiunto poiché in alcuni paesi la malattia persiste in forma endemica specialmente nelle aree rurali più povere [8].

1.1.4.2. Trasmissione

Il tripanosoma viene trasmesso all'uomo dal morso di un insetto vettore, la mosca *tse-tse* (specie *Glossina*) che vive nelle aree boschive e nella savana. Sia

i maschi che le femmine possono trasmettere l'infezione. Questi insetti sono vivipari e la femmina depone la larva completamente sviluppata nel terreno, si impupa per poi emergere come mosca adulta un mese dopo. Esistono 31 specie e sottospecie di mosca *tse-tse* classificate sulla base delle preferenze di habitat e differenze morfologiche. *Glossina fuscipes* e *Glossina palpalis* sono i principali vettori del *T. brucei gambiense*, mentre i principali portatori del *T. brucei rhodesiense* sono la *Glossina fuscipes* e la *Glossina pallipides*. Le popolazioni più esposte al rischio di infezione sono quelle che vivono in zone rurali in cui il sostentamento dipende da caccia, pesca, allevamento, agricoltura e dove, quindi, la probabilità di essere punti dall'insetto è più elevata. I principali portatori di infezione sono gli animali domestici (cani, gatti, capre, suini), mentre gli animali selvatici sono coinvolti nelle trasmissioni di tipo sporadico ai cacciatori o turisti di safari. L'infezione colpisce indiscriminatamente uomini e donne di tutte le età [8].

Esistono anche altre modalità di trasmissione: verticalmente tra madre e figlio, trasfusioni di sangue, trasmissione sessuale, trapianti, esposizione accidentale in laboratorio. Questi casi, tuttavia, sono molto rari e poco documentati.



Figura 5. Immagine della mosca *tse-tse* del genere *Glossina*.

1.1.4.3. Ciclo vitale del tripanosoma

Nei mammiferi: La mosca *tse-tse* punge il mammifero iniettando tripomastigoti metaciclici nel tessuto cutaneo. I parassiti da qui entrano nel sistema linfatico

per poi infiltrarsi nel flusso sanguigno. Nel sangue del mammifero il protozoo si trasforma in tripomastigote circolante. I tripomastigoti si moltiplicano per scissione binaria e nel circolo ematico incontrano le difese immunitarie dell'ospite. Gli anticorpi specifici dell'ospite riducono i livelli di parassita in modo drastico; tuttavia, esiste un sottogruppo di parassiti in grado di evadere la distruzione immuno-mediata attraverso una modifica delle sue glicoproteine in modo da sopravvivere e continuare il ciclo replicativo. La forma di tripomastigote circolante può rientrare nell'intestino della mosca e seguito della puntura dell'individuo infetto da parte dell'insetto.

Nella mosca: nell'intestino medio della mosca *tse-tse*, dopo aver punto un soggetto infetto, si insediano i parassiti nella forma di *tripomastigoti*. I tripomastigoti si dividono in due sottocategorie: lunghi e sottili (LS), che non proseguono il ciclo infettivo, e quelli tozzi e corti (ST) che invece evolvono in tripomastigoti prociclici (PT) che proliferano sempre nell'intestino medio della mosca. Proliferando, si trasformano in tripomastigoti mesociclici, che si localizzano nell'intestino anteriore della mosca e che inoltre, possedendo un flagello allungato, migrano più facilmente lungo il canale alimentare della Glossina. In questa fase si iniziano ad osservare gli epimastigoti (DE) che si dividono in: lunghi che a loro volta si dividono asimmetricamente in epimastigoti lunghi ed epimastigoti corti di cui i secondi vengono rilasciati dai primi nelle ghiandole salivari (SG) della mosca vettore. In questa sede si hanno altre divisioni cellulari che portano alla formazione di tripomastigoti progenitori dei tripomastigoti metaciclici che rappresentano la forma infettiva del parassita. A questo punto, quando la mosca si nutre di un ospite vertebrato, rilascia i tripomastigoti ciclici infettivi nell'ospite [11].

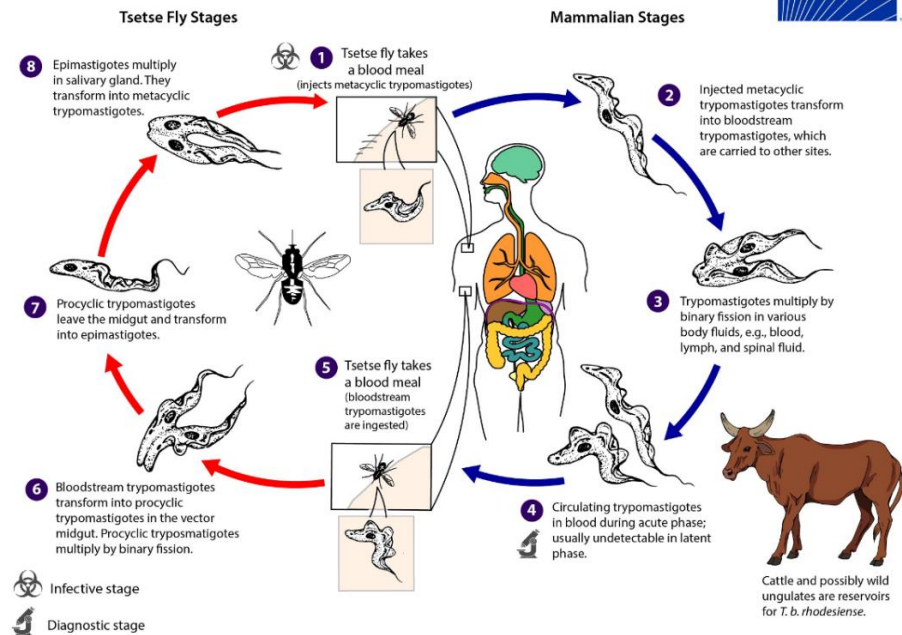


Figura 6. Ciclo vitale del *Trypanosoma brucei*.

1.1.4.4. Meccanismi di resistenza alle difese dell'ospite

La capacità del *T.b. gambiense* e del *T.b. rhodesiense* di eludere il sistema immunitario dell'ospite dipende dal fatto che essi sono resistenti all'Apolipoproteina A1 (APOL1) [8]. L'APOL1 è una sieroproteina che normalmente causa la morte dei parassiti, tra cui anche i tripanosomi, in quanto induce la formazione di pori anionici pH - dipendenti nel sistema endocitico interrompendo l'omeostasi ionica. *T.b. rhodiense* e *T.b. gambiense* per resistere all' APOL1 sfruttano rispettivamente due proteine derivanti dall'Antigene di Superficie Variabile (VSG): la proteina SRA (siero-resistenza associata) e la glicoproteina specifica (TGsGP) [16].

Le proteine di superficie variabili hanno lo scopo di mediare l'evasione immunitaria creando un mantello protettivo sulla membrana del parassita durante la fase del ciclo vitale del tripanosoma che si svolge all'interno dei mammiferi. Queste proteine sono ancorate alla membrana tramite la loro porzione C-terminale ed espongono la porzione N- terminale all'esterno

[17,18]. Le VSG sono attivate nelle ghiandole salivari della mosca vettore e inattivate al loro ritorno nell'intestino del dittero vettore. Durante un'infezione la maggior parte dei parassiti viene eliminata, ma si ha persistenza infettiva a causa della continua variazione antigenica delle VSG che permette ad alcuni parassiti di continuare a proliferare sostenendo l'infezione che cronicizza. La variazione della VSG sul rivestimento del tripanosoma è data dalla capacità di questi parassiti di passare dall'espressione di una VSG ad un'altra. L'identificazione e la purificazione delle diverse proteine di rivestimento sono state eseguite intorno agli anni '70 [19].

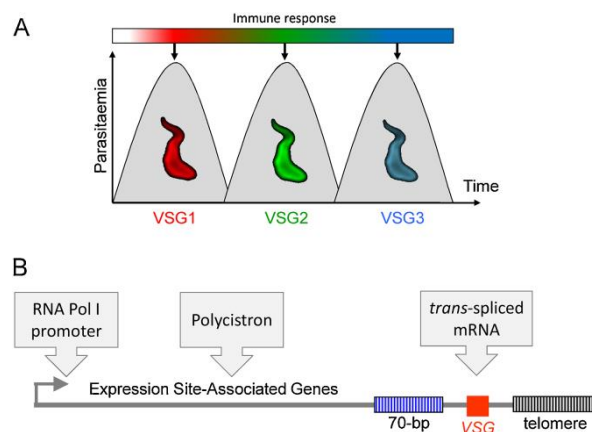


Figura 7. Espressione delle VSG del tripanosoma [19].

I geni VSG vengono espressi esclusivamente quando sono localizzati in siti di espressione sub telomerici (ES). A livello di questi siti, i geni VSG sono affiancati da ripetizioni di 70 paia di basi e ripetizioni telomeriche a valle. I geni codificanti VSG sono più di 2500 e sfruttano un meccanismo molecolare che coinvolge un *non long coding* RNA (nlcRNA, RNA non codificante) e il reclutamento di diverse proteine coinvolte nei meccanismi di ricombinazione per amplificare ulteriormente la loro variabilità. Maggiore è la variabilità genetica delle proteine VSG e maggiore è la possibilità che vengano prodotte proteine che riescono a sfuggire al sistema immunitario dell'ospite. Il meccanismo molecolare che aumenta il coefficiente di variabilità delle proteine VSG è piuttosto complesso e si basa essenzialmente sull'induzione controllata

e localizzata di *Double strand-breaks* (DSB), ossia di rotture a doppio filamento che inducono un ampliamento della variabilità genetica. I DSB sono indotti a partire dagli stessi geni delle VSG a valle del telomero, i quali vengono trascritti in un nlcRNA chiamato TERRA. Il nlcRNA TERRA, appaiandosi al DNA crea degli ibridi RNA-DNA a triplo filamento che assumono una struttura ad ansa detta R-loop. Queste strutture destabilizzano la struttura del DNA producendo DSB localizzati inducendo un meccanismo che ha, come detto precedentemente, il fine di aumentare la variabilità delle proteine VSG e produrre VSG con epitopi diversi che possono sfuggire al sistema immunitario dell'ospite [20].

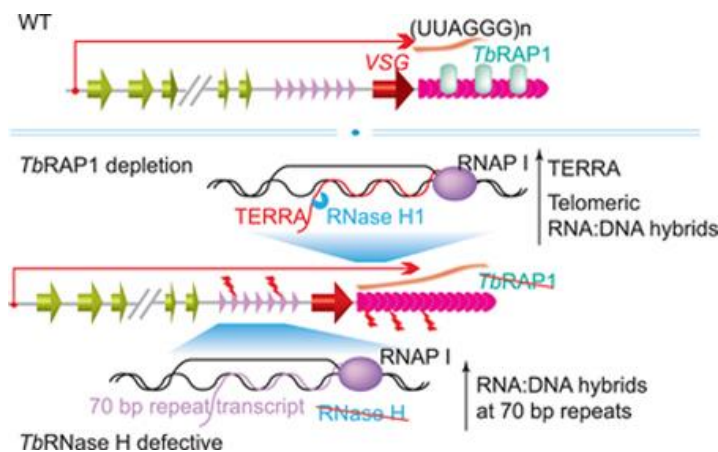


Figura 8. Sito di espressione delle VSG nel *Tripanosoma brucei* [20].

1.1.4.5. Patogenesi

L'infezione consiste in due stadi: uno stadio iniziale all'interno del circolo ematico, seguito da un secondo stadio detto meningo-encefalico in cui il tripanosoma invade il sistema nervoso centrale (SNC) dell'ospite.

L'infezione da *T.b. gambiense* dura nel complesso tre anni sviluppando la forma cronica della malattia, mentre l'infezione da *T.b. rhodesiense* si presenta in forma acuta con durata variabile di settimane o mesi [14].

Spesso i sintomi delle due forme di HAT sono molto simili nelle prime fasi della malattia e questo ne rende difficile la distinzione almeno nel primo periodo dopo l'infezione.

Entrambe le forme sono caratterizzate dalla comparsa di un sifiloma che nasce da una papula sviluppatosi dal sito di puntura della mosca tse-tse. Il sifiloma è un nodulo rosso dolente che può anche ulcerare, comparso dopo un arco di tempo compreso tra un paio di giorni e due settimane dalla puntura dell'insetto vettore. Questa manifestazione cutanea è più ricorrente nel caso di infezione da parte del *T.b. rhodesiense*.

La prima fase (ematica o emolinfatica) include sintomi non specifici che iniziano a partire da circa 20 giorni dalla puntura della mosca. I sintomi di questa fase includono: mal di testa, stanchezza, malessere, affaticamento, prurito, artralgia e rash eritematoso evanescente, più facilmente visibile nei soggetti con pelle più chiara. A questi sintomi si aggiungono epatosplenomegalia, perdita di peso, febbre intermittente (i cui intervalli possono durare da giorni a mesi), linfadenopatia generalizzata (principalmente a livello cervicale e in alcuni casi anche ascellare, inguinale o epitrocleare). Gli stati febbrili intermittenti di questa fase della malattia sono associati all'attivazione dei macrofagi, interferone γ , TNF, metaboliti ed intermedi reattivi dell'ossigeno e monossido d'azoto [14]. In particolare, la linfadenopatia cervicale del triangolo posteriore (detto segno di Winterbottom) è comunemente osservata nell'infezione di *T.b. gambiense* [21].

L'infezione da *T.b. gambiense* evolve in una seconda fase nei 300 – 500 giorni successivi l'infezione mentre la malattia da *T.b. rhodesiense* entra nella seconda fase dopo circa 21 – 60 giorni.

In entrambi i casi il secondo stadio della malattia è determinato dall'analisi del liquido cefalorachidiano in cui si osserva la presenza di tripomastigoti, per i quali il meccanismo preciso di passaggio della Barriera Ematoencefalica (BEE)

risulta tuttora oggetto di studio [21]. Studi in vitro hanno evidenziato come il parassita riesca ad attraversare le cellule endoteliali microvascolari della barriera, dando una transitoria perdita di integrità che porterebbe ad una maggiore permeabilità della BEE [22].

L'invasione del parassita nel sistema nervoso centrale causa una serie di sintomi neuropsichiatrici in aggiunta ai sintomi del primo stadio della malattia. Il ritmo circadiano si inverte (da qui, infatti, deriva il nome della malattia "malattia del sonno Africana"), infatti i pazienti presentano sonnolenza diurna e insonnia notturna con improvvisi impulsi di sonnolenza; accompagnano lo sfasamento del ritmo circadiano anche altri sintomi psichiatrici quali: allucinazioni, delirio, ansia, labilità emotiva, deficit dell'attenzione, apatia, aggressività, stati maniacali. A questi si accompagnano anche sintomi motori come: debolezza muscolare, tono muscolare anormale, disturbi nella deambulazione, atassia, tremore, disturbi del linguaggio; sono stati osservati anche sintomi sensitivi come parestesia, iperestesia, anestesia, prurito e problemi alla vista e sintomi neurologici quali riflessi anomali, convulsioni e coma.

Il *T.b. rhodesiense* in particolare sembra essere associato anche ad alcune anomalie endocrine, tra cui l'insufficienza surrenalica, disfunzioni tiroidee, ipogonadismo e inoltre coinvolge anche il sistema cardiocircolatorio portando nei casi più gravi anche a miocardite [14].

1.1.4.6. Diagnosi

La diagnosi della Tripanosomiasi Africana viene effettuata attraverso l'analisi di un campione prelevato dal paziente, questo può essere sangue o altri fluidi corporei derivanti da linfonodi, midollo, liquido cerebrospinale (LCS).

Per i due parassiti la sensibilità diagnostica varia a seconda del fluido osservato: per il *T.b. gambiense* il campione migliore è l'aspirato linfonodale, mentre per il *T.b. rhodesiense* è il sangue.

In *T.b. rhodesiense* il livello di parassitemia nei primi stadi della malattia è elevato, quindi, la rivelazione di tripanosomi nel sangue è la più accurata. Per l'analisi il sangue viene centrifugato e i parassiti si depositano in questa fase sui globuli bianchi, da ciò risulta quindi che l'analisi del *buffy coat* sia la più adatta per avere una maggiore sensibilità. I tripanosomi possono anche essere rilevati negli aspirati linfonodali [3].

L'infezione da *T.b. gambiense* è più difficile da diagnosticare, il percorso da seguire è composto da quattro fasi: screening, conferma, diagnosi e stadiazione [23]. Si usa un test di agglutinazione su carta per la tripanosomiasi/*T.b. gambiense* (CATT), un test sierologico sviluppato negli anni '70 che può essere applicato su siero e sangue capillare ottenuti dalla puntura di un dito del paziente. Il test è utilizzato per la conferma nei casi sospetti di malattia e quindi è utilizzato come screening nelle aree endemiche dell'Africa. Il tripanosoma può essere rilevato anche attraverso esame microscopico del liquido linfonodale e del sangue, ma le rese sono molto variabili nel primo caso e scarse per il secondo. Per migliorare l'affidabilità del test, sono necessari sia le tecniche di concentrazione che analisi seriali nei giorni seguenti alla prima analisi; sono state sviluppate tecniche di concentrazione dei campioni in modo da aumentare la sensibilità delle analisi, queste tecniche constano di centrifugazione, sedimentazione e realizzazione di strisci più o meno sottili su cui si causa la rottura dei globuli rossi per aumentare la visibilità dei parassiti alla microscopia LED e a fluorescenza [14,24].

Nei paesi non endemici la diagnosi viene effettuata in modo differente; prima si effettuano test sierologici che non sono sensibili al 100%, come immunofluorescenza e immunoassorbimento enzimatico; se risultano negativi

viene richiesta l'analisi microscopica dei fluidi per avere conferma dell'infezione [14].

È stato sviluppato un test rapido per rilevare l'infezione di *T.b. gambiense*, chiamato SD BIOLINE HAT, che riconosce gli anticorpi prodotti in risposta al contatto con le VSG; per questo può essere usato come metodo alternativo alla CATT, avendo il vantaggio di non necessitare di corrente elettrica per l'esecuzione, essendo quest'ultima non sempre disponibile nelle aree endemiche [25].

Nei pazienti che hanno ricevuto la diagnosi della tripanosomiasi africana viene effettuata una puntura lombare; il liquido cerebrospinale prelevato presenta un incremento di numero dei linfociti, proteine totali e IgM non specifici. In base ai valori e alla presenza o meno di tripomastigoti mobili nel LCS si identificano gli stadi della malattia:

- Se nel liquido cefalorachidiano sono presenti cinque o meno globuli bianchi per microlitro e non vi sono tripomastigoti, si è nella prima fase della malattia in cui il SNC non è stato intaccato, quindi nella fase emolinfatica.
- Se nel liquido cefalorachidiano sono presenti sia più di cinque globuli bianchi o tripomastigoti, si è nel secondo stadio della malattia ciò significa che i parassiti hanno passato la barriera ematoencefalica [3,8].

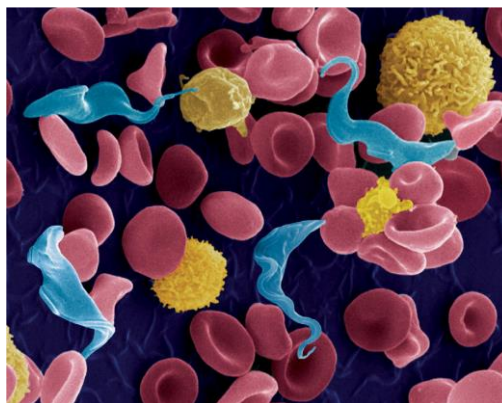


Figura 9. Tripanosomi in presenza di cellule ematiche [14].

Step in the diagnostic chain:	Techniques / action:
Out Negative Clinical symptoms Serological examination Positive	Palpation for enlarged neck lymph nodes Neurological suspicion CATT/ <i>T.b. gambiense</i> (mass screening) Latex/ <i>T.b. gambiense</i> (experimental) Immunofluorescence ELISA (specialised laboratories)
Out unless high suspicion for HAT Negative Parasitological examination Positive	Lymph aspirate examination Wet blood film Thick blood film Micro-hematocrite centrifugation Mini anion exchange centrifugation
Stage determination Positive	CSF cell count Presence of trypanosomes in CSF CSF total protein concentration
Treatment Positive	CSF normal (1 st stage): Pentamidine Suramine CSF abnormal (2 nd stage): Melarsoprol Eflornithine Nifurtimox
Follow-up (2 years): Parasitological examination CSF examination	Normal: Successful treatment Abnormal: Relapse & retreatment

Figura 10. Diagramma di flusso per la diagnosi, stadiazione, trattamento e follow up di pazienti con tripanosomiasi [26].

1.1.5. Terapie farmacologiche per la HAT

Ad oggi non esiste un vaccino per la prevenzione della tripanosomiasi africana umana, pertanto le uniche possibilità di cura e prevenzione sono l'impiego in terapia di farmaci chemioterapici e la messa in atto di strategie di controllo sui vettori che trasmettono la malattia [27].

I farmaci attualmente disponibili per il trattamento della HAT presentano molte controindicazioni tra cui: tossicità, scarsa efficacia, costi elevati, impossibilità di somministrazione orale e farmacoresistenza. Vi è quindi la necessità di individuare nuove possibili terapie e sviluppare farmaci innovativi per far fronte a queste problematiche [4,27,28].

I farmaci disponibili vengono classificati in base alla fase della malattia in cui agiscono: ematica o meningoencefalica [14].

Nella fase ematica si il trattamento prevede l'impiego di pentamidina e suramina; tali farmaci non sono efficaci nella fase meningoencefalica della malattia perché queste molecole non sono in grado di passare la BEE. Il trattamento indicato nella fase meningoencefalica prevede, invece, l'impiego di eflornitina e melarsoprolo.

La pentamidina (Figura 11) è il trattamento di scelta per la prima fase dell'infezione da *T.b. gambiense*, ed è un farmaco in genere ben tollerato dai pazienti. Agisce interrompendo la sintesi di DNA, RNA, proteine e fosfolipidi nel parassita: interagisce con gli acidi nucleici creando legami crociati tra due adenine a cinque paia di basi di distanza in regioni ricche di dimeri adenina-timina e inibisce le topoisomerasi II dei mitocondri. La via di somministrazione è di tipo parenterale o intramuscolo per terapie di durata settimanale o un'infusione con soluzione salina della durata di due ore. La somministrazione intramuscolo genera come effetti collaterali dolore e gonfiore nel sito di iniezione. Gli effetti collaterali del farmaco più comuni sono: dolore addominale, ipoglicemia, problemi all'apparato gastro-intestinale. Altri effetti collaterali meno comuni sono leucopenia, ipercalcemia, trombocitopenia e prolungamento del tratto QT [4,14,29,30].

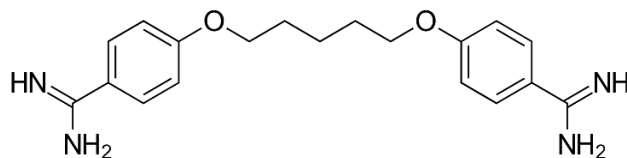


Figura 11. Struttura chimica della pentamidina.

La suramina è una molecola naftilamminica polianionica simmetrica utilizzata nella malattia causata dal *T.b. rhodesiense*. Il suo meccanismo d'azione è la

soppressione dei livelli di ATP nel parassita bloccando la glicerolo-3-fosfato ossidasi e la glicerolo-3-fosfato deidrogenasi NADH dipendente (enzimi della via glicolitica) [4]. La terapia ha durata di circa 30 giorni. Il farmaco è molto sensibile all'ossidazione quindi deve essere preparato in situ attraverso diluizione in acqua distillata e utilizzato subito dopo la preparazione. Le reazioni avverse sono solitamente reversibili e tra queste troviamo: nefrotossicità, agranulocitosi, trombocitopenia. Un effetto collaterale più raro è l'ipersensibilità tardiva. L'uso di questo farmaco nell'Africa occidentale è impedito dal fatto che in questa zona è endemico anche l'*Onchocera volvulus* e la coinfezione porterebbe ad un'ipersensibilità al farmaco tale per cui i rischi dell'utilizzo in terapia supererebbero i benefici.

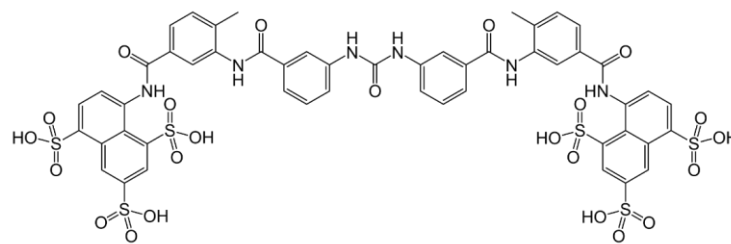


Figura 12. Struttura chimica della suramina.

Il melarsoprolo è un farmaco appartenente alla famiglia delle triazine che presenta un atomo di arsenico nella sua struttura chimica. È un profarmaco che viene convertito nella sua forma attiva quando entra nel parassita e, una volta entrato, lega irreversibilmente i gruppi sulfidrilici della Piruvato Chinasi (PK), enzima essenziale per la via glicolitica del tripanosoma. Inoltre, la forma ossidata del farmaco (melarsenossido) è in grado di inibire anche la tripanotione reduttasi del parassita, provocandone la morte [4]. È il farmaco più utilizzato per la cura dell'infezione da *T.b. gambiense* ma a differenza della pentamidina, si utilizza per il trattamento del secondo stadio della malattia in paesi dove non è disponibile l'eflornitina. Il trattamento dura dieci giorni e il farmaco viene somministrato per via endovenosa, una volta al giorno. Le

reazioni avverse sono frequenti e possono risultare anche gravi o addirittura letali, tra queste la più importante è la sindrome encefalica; si possono riscontrare anche neuropatie motorie che portano a paralisi e sensoriali. Altre reazioni sono di tipo cutaneo, come il prurito, eruzioni cutanee, dermatite esfoliativa. Nel sito di iniezione facilmente si può avere tromboflebite, quindi è necessaria una buona tecnica per ridurre questo effetto al minimo. Quasi tutte le reazioni avverse sono connesse alla presenza di arsenico all'interno della struttura [31,32].

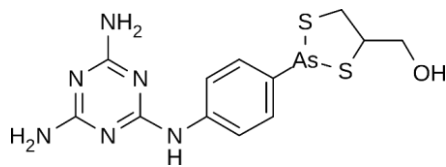


Figura 13. Sstruttura chimica del melarsoprolo

L'eflornitina è un farmaco utilizzato per il trattamento del secondo stadio di malattia del *T.b. gambiense*. Non è indicato per il trattamento dell'infezione da *T.b. rhodesiense*, che risulta essere meno suscettibile al farmaco. L'eflornitina agisce inibendo l'ornitina decarbossilasi, un enzima che catalizza la formazione di sostanze chimiche importanti nella divisione e differenziazione cellulare. La cura dura due settimane ma, avendo emivita molto breve, le somministrazioni vanno effettuate quattro volte al giorno. Gli effetti collaterali sono simili ad altri farmaci citostatici: anemia per tossicità verso il midollo osseo, sintomi gastrointestinali, convulsioni, infezioni nel sito di inserimento del catetere [4].

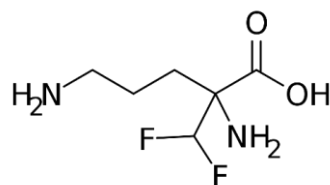


Figura 14. Struttura chimica dell'eflornitina.

Stage	Route of application	Dosing	Main adverse drug reactions	
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>				
Pentamidine*	First	Intramuscular	4 mg/kg bodyweight at 24 h intervals for 7 days	Hypoglycaemia, injection site pain, diarrhoea, nausea, vomiting
Eflornithine	Second	Intravenous Infusion of >30 min	100 mg/kg bodyweight at 6 h intervals for 14 days	Diarrhoea, nausea, vomiting, convulsions; anaemia, leucopenia, and thrombocytopenia
Melarsoprol†	Second	Intravenous	2.2 mg/kg bodyweight at 24 h intervals for 10 days	Encephalopathic syndromes, skin reactions (pruritus, maculopapular eruptions), peripheral motoric (palsy) or sensorial (paraesthesia) neuropathies, thrombophlebitis
<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>				
Suramin*	First	Intravenous	Test dose of 4-5 mg/kg bodyweight at day 1, then five injections of 20 mg/kg bodyweight every 7 days (eg, day 3, 10, 17, 24, 31); maximum dose per injection 1 g	Hypersensitivity reactions (acute, late); albuminuria, cylinduria, haematuria, peripheral neuropathy
Melarsoprol*	Second	Intravenous	Three series of 3.6, 3.6, 3.6 mg/kg bodyweight, the series spaced by intervals of 7 days; maximum dose per day 180 mg	Encephalopathic syndromes, skin reactions (pruritus, maculopapular eruptions), peripheral motoric (palsy) or sensorial (paraesthesia) neuropathies, thrombophlebitis
*Endemic countries: according to national legislature or guidelines. †Only where eflornithine is not available or where melarsoprol is first-line treatment according to national guidelines.				
Table: Standard treatments for human African trypanosomiasis and main adverse reactions				

Figura 15. Tabella dei farmaci di prima e seconda scelta per la tripanosomiasi africana, posologia e principali reazioni avverse [14].

Il nifurtimox è un farmaco che può essere usato in combinazione con eflornitina in casi di recidiva o nel secondo stadio della patologia. Il regime di combinazione nifurtimox ed eflornitina porta a dimezzare la dose di quest'ultima e quindi ad un diminuito effetto neutropenico rispetto a quello che si registrerebbe con la monoterapia. La diminuzione di questo effetto collaterale riduce il rischio di infezioni opportunistiche [33]. Il meccanismo d'azione del farmaco non è ancora stato completamente chiaro ma sembra possa causare danni da stress ossidativo nel tripanosoma [4].

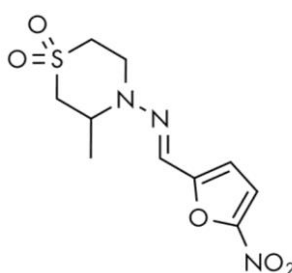


Figura 15. Struttura chimica del nifurtimox.

Il fexinidazolo è un inibitore della sintesi del DNA, utilizzato sia per la HAT che per la malattia di Chagas. Risulta efficace sia contro il *T.b. rhodesiense* che verso il *T.b. gambiense* e si può utilizzare nel trattare la malattia sia nello stadio emolinfatico che in quello meningoencefalico. Il grande vantaggio è

rappresentato dalla via di somministrazione, poiché può essere assunto per via orale [34]. A seguito del metabolismo del farmaco si generano dei metaboliti, anche essi attivi, che contribuiscono a danneggiare il DNA e le proteine del parassita [4]. Il fexinidazolo è particolarmente efficace nel trattare la malattia allo stadio emolinfatico con una percentuale di successo del 98% [28].

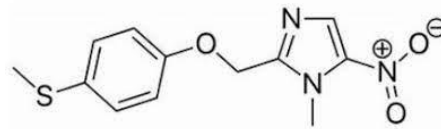


Figura 16. Struttura chimica del fexinidazolo.

1.1.5.1. Associazione dei farmaci attuali

I farmaci approvati per il trattamento della HAT sono pochi, spesso difficili da somministrare, tossici e inducono facilmente fenomeni di resistenza. Sono stati condotti studi sulle molecole a disposizione per poter creare associazioni farmacologiche che fossero più efficaci e meno impattanti per i pazienti.

Una terapia combinata spesso impiegata è quella di Nifurtimox + Eflornitina (NECT), che oltre ad essersi dimostrata ugualmente efficace al trattamento con solo nifurtimox, ha riscontrato minori effetti collaterali e la possibilità di diminuire la dose del nifurtimox. Inoltre la somministrazione risulta più semplice perché la terapia con solo nifurtimox necessita di 56 infusioni totali, mentre con l'associazione si riducono a 14 infusioni lente ogni 12 ore, cioè una settimana di trattamento.

Drug class	Drug name	Molecular targets	Disease form	Disease stage	Drug form	Dosage	Major limitations and side effects	Year of discovery	References
Human African trypanosomiasis (HAT)									
Diamidine	Pentamidine	Binds to parasite DNA, inhibits type II topoisomerase, and disrupts mitochondrial DNA	Effective against <i>T. b. gambiense</i> infection; most used drug for early HAT	First stage	Colorless powder	4 mg/kg/day IM or IV (diluted in saline in 2-h infusions) × 7 d (67–69)	Hypoglycemia, hypotension, drug resistance, reasonably tolerable, yet do not permeate through the BBB (therefore only used for treating stage 1 HAT), highly polar and these drugs are available in powder form for parenteral use during treatment of the early stage of disease	1940	(4, 70, 71)
Polysulfonated naphthyl amine	Suramin	Non-specifically binds to L-α-glycerophosphate oxidase	<i>T. b. rhodesiense</i>	First stage	Powder and ready-to-use solution	IM or intravenous (IV) route Test dose of 4–5 mg/kg (Day 0) slowly IV, then 20 mg/kg IV (max 1 gm/injection) over several hours on Days 1, 3, 7, 14, and 21 For children, 10–20 mg/kg of Suramin is given, and maximum of 1 g at times considered. In situations of renal toxicity, daily dose and the interval between doses should be adjusted accordingly (67, 68)	Toxicity, e.g., nephrotoxicity, allergic reaction, although reasonably tolerable, but unable to cross BBB (therefore only used for treating stage 1 of the disease), highly polar, has a short half-life, and is available in ready-to-use solution or powder form for parenteral use during treatment of the early phase of the disease	1920	(72–77)
Melaminophenyl arsenical (MPA)	Melarsoprol	Inhibition of trypanothine reductase	Both gambiense and rhodesiense infections (<i>T. b. gambiense</i> and <i>T. b. rhodesiense</i> infections); currently recommended as first-line treatment for the rhodesiense form, rarely used in the gambiense form	Second stage	Ready-to-use solution in propylene glycol	IV route 2.2 mg/kg per day (max 180–200 mg/day) IV × 10 d Likely chance of developing encephalopathic reaction to melarsoprol can be avoided by considering pretreatment with corticosteroid drugs (67, 68, 78–80)	Narrow therapeutic index, highly toxic, reactive encephalopathy Can cross the BBB, has a long half-life of 35 hours, therefore is widely used during treatment of late stages of the disease, but the associated encephalopathy and drug resistance limit its use	1949	(71, 72, 81–86)
Ornithine analog	Eflornithine	Inhibits ornithine decarboxylase	This drug is much less toxic than melarsoprol but is only effective against <i>T. b. gambiense</i> ; it is generally used in combination with nifurtimox (as part of the nifurtimox-eflornithine combination therapy, NECT) but can also be used as monotherapy	Second stage	IV infusion	IV route	Large doses (400 mg/kg), the regimen is complex and cumbersome to apply, has a short half-life, and these drugs are available in ready-to-use solution for parenteral use during treatment of the early stage of disease	Registered in 1990	(81, 82, 84, 87–91)
NECT	Nifurtimox-eflornithine combination therapy	Synergistic effect of individual drugs	Effective replacement of toxic melarsoprol in stage 2 <i>T. b. gambiense</i> infection; simplifies the use of eflornithine by reducing the duration of treatment and the number of IV perfusions	Second stage	Nifurtimox tablets and eflornithine IV infusion	Oral route (nifurtimox) and IV route (eflornithine) Nifurtimox 15 mg/kg per day orally in 3 doses for 10 d, and eflornithine 400 mg/kg/day IV in two 2-h infusions (each dose diluted in 250 mL of water for injection) × 7 d For children weighing below 10 kg, eflornithine should be diluted in 50 mL of water for injection while those with body weights of 10–25 kg, this drug should be diluted in 100 mL of water for injection. If water for injection is unavailable, eflornithine can be diluted in 5% dextrose or saline (67–69) Eflornithine might not be effective in immunosuppressed patients because it is trypanostatic and not trypanocidal	Less effective against <i>T. b. rhodesiense</i>	Introduced in 2009	
Nitroimidazole	Fexinidazole	The precise mechanism of action of this drug remains unknown. However, it is suggested that bacterial-like nitroreductases encoded by trypanosomes activate fexinidazole and its M1/M2 metabolites through reduction to form reactive intermediates capable of damaging DNA and proteins (metabolic activation by a bacteria-like nitroreductase)	<i>T. brucei</i> , i.e., <i>T. b. gambiense</i> and <i>T. b. rhodesiense</i>	First and second stage; it is indicated as the first line for the first stage and non-severe second stage.	Oral tablets	Oral route	There is decreased efficacy in patients with severe stage 2 HAT), therefore it should be used in case of no other available treatment options	It is a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical trials for the treatment of sleeping sickness, has recently been identified as a promising new drug for HAT; delivered in 2018; is included in 2019 in the WHO essential medicines list and WHO HAT treatment guidelines.	(71, 87, 92–95)

Figura 17. Terapie approvate per la tripanosomiasi umana [4].

1.1.6. Il metabolismo dei folati del *T. brucei*

I folati e derivati sono cofattori essenziali per la sopravvivenza di un'ampia varietà di organismi poiché sono essenziali per la biosintesi di timidina, amminoacidi come serina e metionina e le purine. Molti organismi sintetizzano i folati ex-novo, come ad esempio il protozoo della malaria, buona parte dei batteri, funghi e piante. I tripanosomatidi non sono invece in grado di sintetizzare autonomamente pteridina e folati [35,36].

La diidrofolato reduttasi (DHFR) è un enzima chiave nel metabolismo dei folati e quindi per la sopravvivenza del parassita. L'enzima è NAPH dipendente e catalizza le riduzioni da folato a diidrofolato e da qui a tetraidrofolato.

Nel momento in cui si riduce il diidrofolato a tetraidrofolato questo viene successivamente metilato a dare il metilene-tetraidrofolato che metila la desossiidridina monofosfato (dUMP) per ottenere timidina monofosfato (TMP) nella reazione catalizzata dall'enzima timidilato sintasi. Durante questa metilazione il metilene tetraidrofolato si ossida a diidrofolato [37].

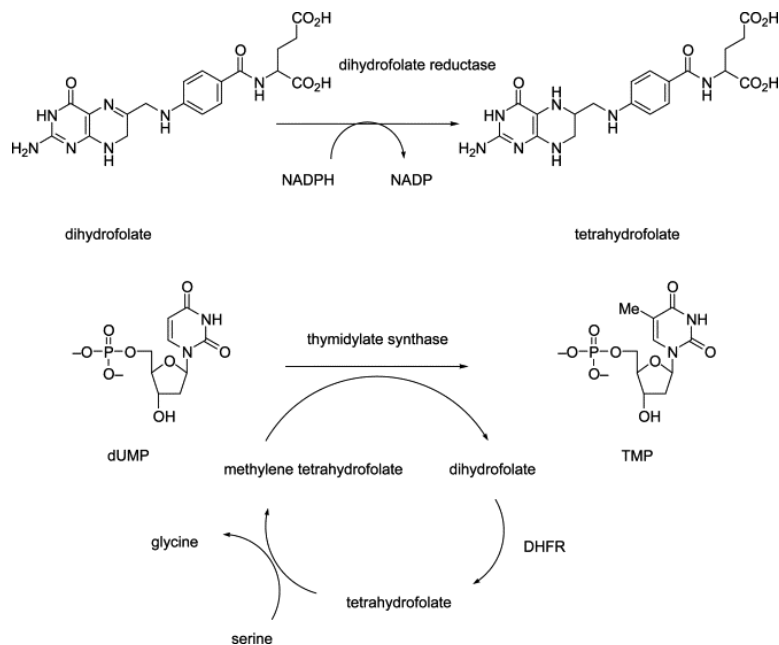


Figura 18. Reazione catalizzata dalla DHFR, riduzione di diidrofolato a tetraidrofolato e il suo coinvolgimento nella produzione di TMP a partire da dUMP [37].

Nei tripanosomatidi l'enzima DHFR forma un dimero con la timidilato sintasi (DHFR-TS) e questo differenzia l'enzima dei protozoi rispetto alle isoforme di mammiferi e batteri, in cui gli enzimi sono monomeri distinti.

Data la sua importanza per la vita del parassita, l'enzima diidrofolato reduttasi è un potenziale target sfruttato per lo sviluppo di nuovi antiparassitari. Esistono però, meccanismi di resistenza contro gli inibitori di DHFR quali: sovra espressione di DHFR; sovra espressione dell'enzima Pteridina reduttasi 1 (PTR1) [37].

1.1.6. Pteridina reduttasi 1 (PTR1)

La pteridina reduttasi 1 (PTR1) è un enzima della famiglia delle aldochetoreduccasi ed è una deidrogenasi NADPH-dipendente a catena corta che insieme alla diidrofoloreduccasi (DHFR) si occupa del metabolismo delle pteridine e dei folati, essenziali per la vita del parassita [38,39]. La diidrofoloreduccasi riduce il folato a diidrofolato e quest'ultimo a tetraidrofolato, catalizzando quindi due reazioni, mentre la PTR1 è un enzima che riduce le pterine in generale. Infatti, i folati sono delle pterine coniugate a acido paramminobenzoico (PABA) e acido glutammico [40]. Per garantirsi la sopravvivenza i tripanosomi assimilano i precursori della pteridina dai loro ospiti, cioè dall'esterno [39].

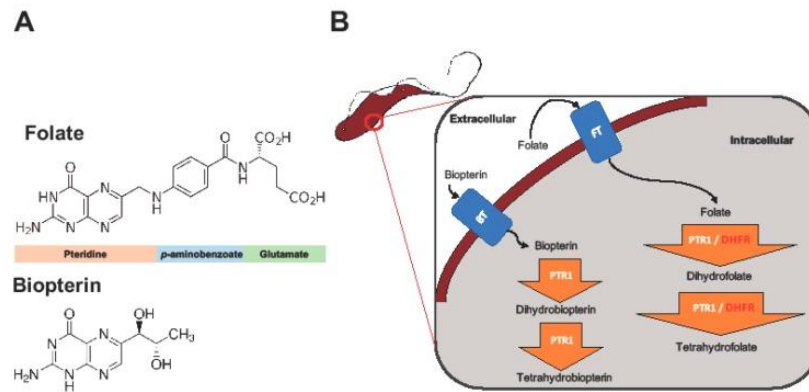


Figura 19. A) le strutture chimiche di folato e biopterina. B) I trasportatori delle due molecole presenti nella membrana del parassita fanno entrare i precursori dei folati per poi ridurli, non essendo auxotrofi per i folati (trasportatore biopterina 1 BT1 e trasportatore di folato 1 FT1) [39].

La pteridina reduttasi ha un'attività più ampia rispetto a DHFR nei confronti di pterine e folati fornendo quindi un bypass metabolico nel momento in cui la diidrofolato reduttasi viene inibita [41]. La PTR1 è una proteina che catalizza diverse reazioni di ossidoriduzione: da folato (FOL) a 7,8-diidrofolato (DHF) e da qui a 5,6,7,8-tetraidrofolato (THF); da biopterina (DHB) a diidrobiopterina (THB) e da qui a tetraidrobiopterina [35].

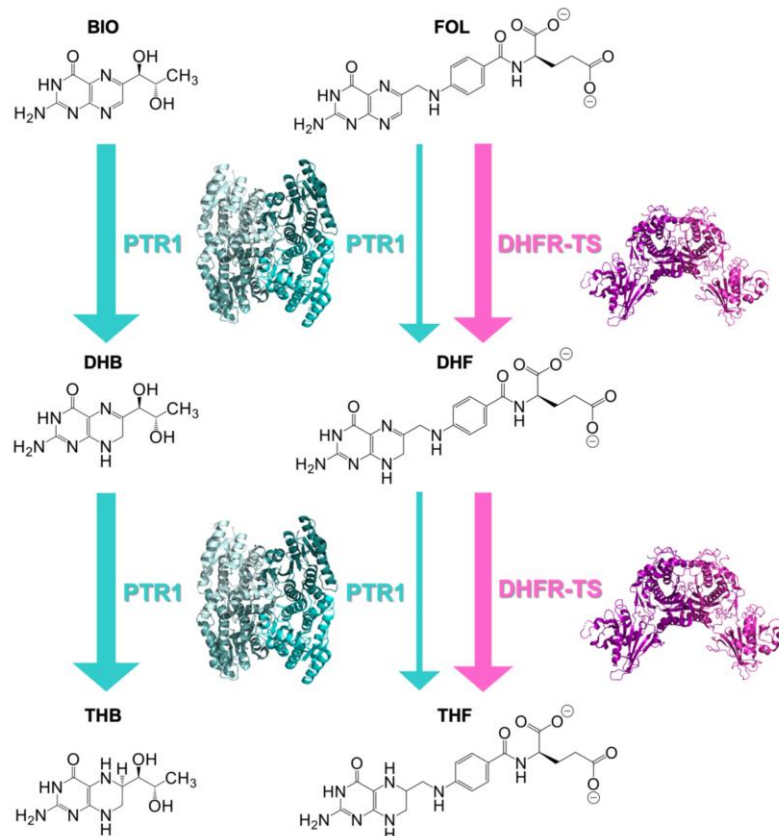


Figura 20. La PTR1 catalizza più reazioni: Riduzione in due fasi della biopterina (BIO) a 7,8-diidrobiopterina (DHB) e 5,6,7,8-tetraidrobiopterina (THB) catalizzata da PTR1 e del folato (FOL) a 7,8-diidrofolato (DHF) e 5,6,7,8-tetraidrofolato (THF) catalizzato sia dalla diidrofolato reductasi che dalla timidilato sintasi (DHFR-TS) e PTR1. Gli enzimi sono mostrati accanto alle reazioni che catalizzano. Le frecce più spesse indicano che l'enzima può contribuire alla fase metabolica solo in determinate condizioni metaboliche. DHFR-TS è responsabile del percorso di riduzione dei folati, mentre PTR1 è responsabile quella della biopterina, e viene coinvolta nella riduzione dei folati successivamente all'inibizione della DHFR [35].

La PTR1 in caso di inibizione della DHFR può fare da bypass metabolico: infatti se si somministrano inibitori DHFR come il metotressato (MTX), è la PTR1 a trasformare i folati al posto dell'enzima bloccato [42].

Questi studi pongono in evidenza come sia necessaria l'inibizione di entrambi gli enzimi di *T.b.* contemporaneamente per ottenere una cura efficace contro la tripanosomiasi umana africana [37].

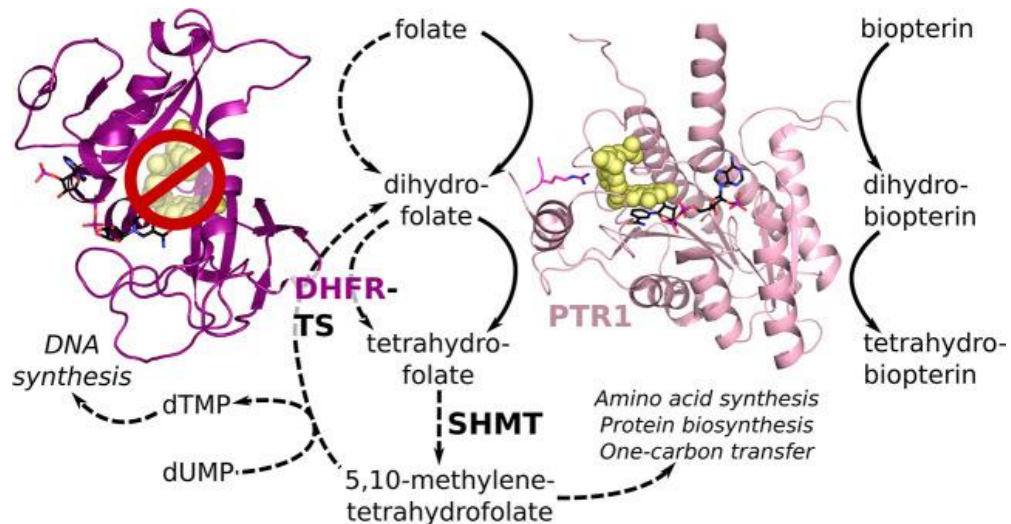


Figura 21. Nelle normali condizioni (linee tratteggiate) DHFR riduce i folati a tetraidrofolato. La serina idrossimetil transferasi converte THF in 5,10-metilen THF che è fondamentale per sintesi di amminoacidi e di conseguenza proteine. Il dominio timidilato sintasi converte dUDP a dTMP fondamentale per la sintesi del DNA. PTR1 catalizza la riduzione delle pterine non coniugate ed entra in gioco quando DHFR viene inibita agendo da bypass metabolico [43].

1.1.6.1 Sito catalitico della PTR1

Il sito attivo dell'enzima PTR1 è stato mappato grazie alla cristallografia a raggi X ed è stato studiato sfruttando due molecole già note: metotressato (MTX) e pirimetamina (PYR) [35].

Il sito catalitico dell'enzima è a forma di L, costituito da una singola catena di amminoacidi, e dentro ad essa risiede il NADPH che è il cofattore enzimatico. Il cofattore è legato al sito attivo tramite legami H altamente conservati [41]. Gli studi di cristallografia a raggi X hanno consentito di mappare le interazioni che PYR instaura nel sito attivo della PTR1:

- PYR instaura due interazioni di legame π tra l'anello aromatico della Phe97 e la porzione nicotinamidica del cofattore NADH.
- Legami a idrogeno: la PYR fa da accettore di legami a H con un OH del ribosio e con il fosfato del cofattore. Mentre si comporta da donatore di legami a H instaurando interazioni con Ser95, Tyr174
- Interazioni di Van-der-Waals tra Phe97 e Pro210 e la porzione etilica in posizione 6 di PYR.

- Un legame alogeno, dove il cloro di PYR si lega con il Trp221 [41].

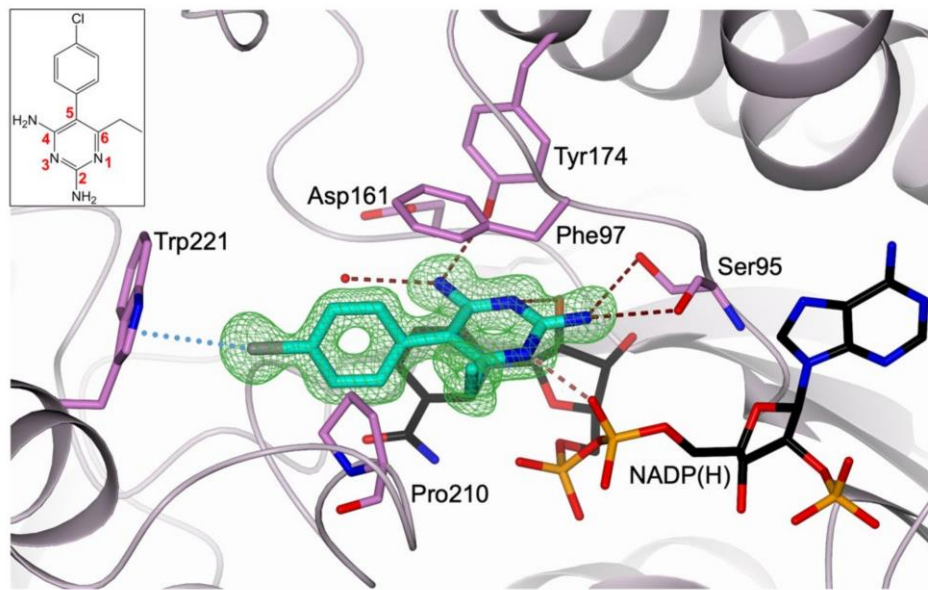


Figura 22. sito attivo di PTR1, struttura di PYR in verde con numerazione indicata nel riquadro in alto a sinistra [41].

1.1.6.2. Differenze e analogie dei siti catalitici di DHFR e PTR1

I due enzimi catalizzano entrambi la reazione di riduzione dei folati, essenziali per il parassita. È stato necessario quindi, confrontare i due siti attivi per poi sviluppare degli inibitori efficaci. Si è effettuato il confronto tra l'interazione dei due siti attivi con PYR mediante cristallografia a raggi X

Per quanto riguarda le analogie, il gruppo amminico in posizione 2 instaura legami H, nel caso di DHFR con Val33 e Asp54 e in PTR1 con Ser95. Il gruppo amminico in 4 anche lui instaura legami H, con PTR1 con Tyr174 e in DHFR con Val32 e Ile160. Il gruppo etile in 6 dà interazioni di Van-Der-Waals con Phe97 e Pro210 in PTR1, mentre in DHFR con Phe58 e Met55. N(3) forma legami H in entrambi gli enzimi: in PTR1 con il cofattore NADPH mentre in DHFR con Asp54. In entrambi i siti attivi la porzione del 4-clorofenile è circondata a una regione idrofobica e il Cl è impegnato in un legame alogeno.

Per quanto riguarda invece i punti di differenza, N(1) non dà interazioni in DHFR mentre crea legami H con la porzione nicotinammidica del cofattore di

PTR1. L'orientazione della molecola delle due tasche è differente, in PTR1 è visibile come gli anelli di NADPH e pirimetamina sono paralleli dando interazioni π con Phe97 e il cofattore NADPH mentre in DHFR non si osserva questo tipo di orientamento nel sito di legame [41].

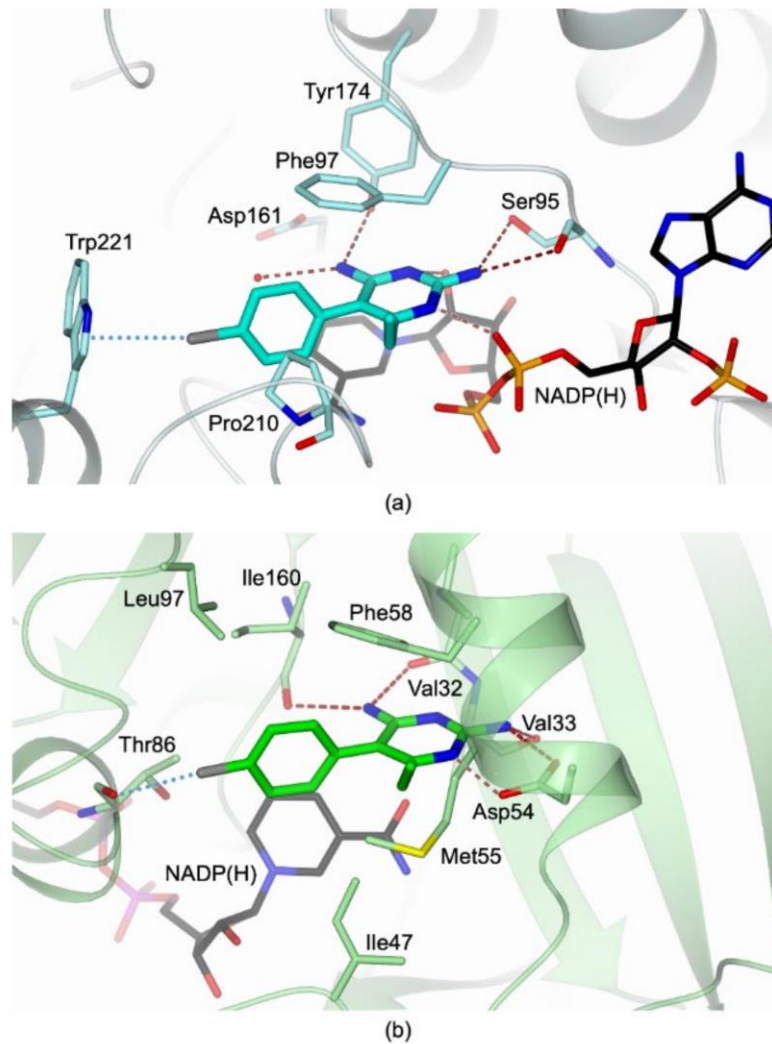


Figura 23. (a) *TbPTR1* in complesso con NADP(H) e PYR, (b) *TbDHFR* in complesso con NADP(H) e PYR [41].

1.1.7 Sviluppo di nuovi inibitori di PTR1

I tripanosomi non sono auxotrofi per la produzione dei folati che sono tuttavia essenziali al loro metabolismo, per la sintesi di basi azotate e proteine. Quindi, gli enzimi che riducono i folati risultano essere target significativi per la cura delle tripanosomiasi [44].

Gli enzimi coinvolti nella fornitura e uso di cofattori di folati ridotti come DHFR e TS sono stati spesso scelti come target per il trattamento di infezioni batteriche, cancro e malattie parassitarie, in particolare la malaria [45].

La DHFR è un enzima che è presente anche nelle cellule umane, di conseguenza è importante negli studi di docking, valutare che i farmaci non siano inibitori anche della forma umana oltre che di quella del parassita. La DHFR compie il 90% delle riduzioni a carico dei folati, mentre la PTR il 10%, ma se DHFR viene inibita (es. metotressato) l'espressione di PTR1 aumenta e TR1 compensa la carenza di DHFR [38].

Kimuda *et al.* hanno analizzato una banca dati di circa 5000 composti di cui sono stati selezionati 18 candidati promettenti, di questi, cinque composti sono stati utilizzati per gli studi *in vitro* (Figura 24). Quattro di questi derivati **RUBi004**, **RUBi007**, **RUBi014**, and **RUBi018**, hanno mostrato un'attività inibitoria moderata nei confronti di *T. brucei*, probabilmente legata all'inibizione di entrambi gli enzimi *TbPTR1* e *TbDHFR*. Infatti, tutti e cinque i composti, eccetto **RUBi016**, se usati in associazione con un inibitore di DHFR (WR99210 nello studio) mostrano attività antagonista, questo indica che le molecole in questione legano non solo PTR1 ma anche DHFR, quindi si crea competizione. In modo diverso rispetto alle altre molecole **RUBi016** ha mostrato invece un effetto additivo con l'inibitore DHFR; ciò sembra sia dovuto al fatto che il composto possa legare in maniera più selettiva PTR1 rispetto a DHFR, non generando competizione [40].

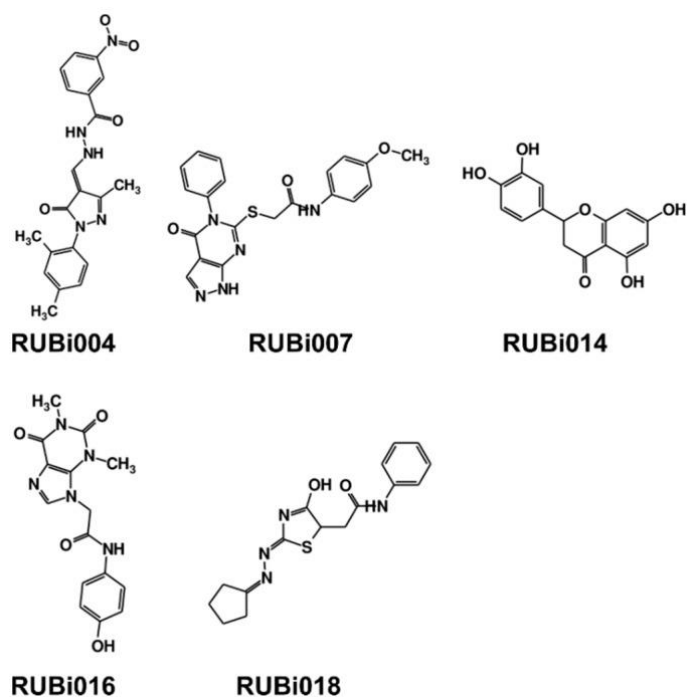


Figura 24. I cinque composti selezionati nella banca dati da Kimuda et al. [40].

Pöhner *et al.* hanno pubblicato uno studio in cui sono stati sviluppati una serie di composti strutturalmente correlati al metotressato dotati di attività antiparassitaria. Dei diversi composti presentati (Figura 25) **1b** e **1c** hanno presentato attività inibitoria sub-micromolare su PTR1 di *Leishmania major*. Il composto **1c** è risultato anche un inibitore di DHFR selettivo verso la forma parassitaria. I composti **1b-1h** si sono inoltre rivelati potenti inibitori dell'enzima PTR1 di *Trypanosoma brucei* [43].

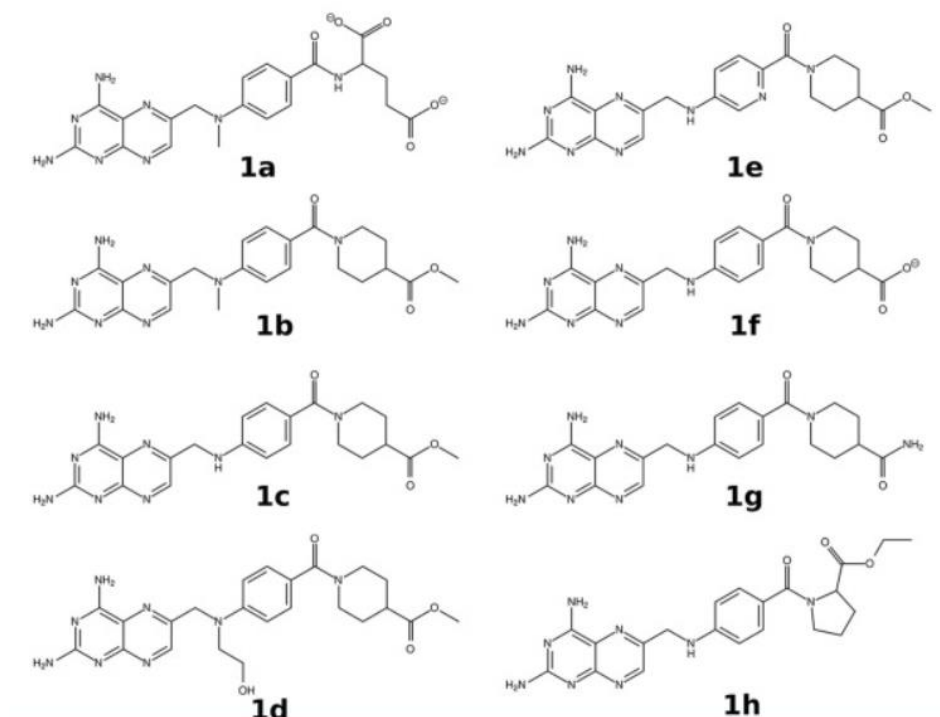


Figura 25. Strutture chimiche dei composti 1a-1h; 1a = metotressato [43].

Partendo dal composto **1b** è stata progettata una seconda serie di composti, sfruttando la variazione di 3 diverse porzioni della molecola, mantenendo invariato il nucleo pterinico:

- Variazione dei sostituenti in N10: sostituenti più ingombranti del metile riescono ad alloggiare in entrambe le tasche di DHFR e PTR1 mantenendo selettività verso DHFR parassitarie, in quanto la tasca idrofobica che ospita il sostituito N10 di DHFR umano è più piccola. Quindi aumentare le dimensioni, ad esempio con un benzile, porta maggiore selettività verso l'isoforma parassitaria dell'enzima. DHFR del parassita preferisce gruppi accettori di legami H rispetto all'isoforma umana che preferisce i donatori, quindi, anche usare gruppi accettori di legami H fa aumentare la selettività.
- Sostituzioni sul PABA: per avere nuovi gruppi accettori legami H è stato sostituito il PABA con un anello piridinico. È stato messo un benzile al posto di anello benzenico e l'acido meta-amminobenzoico. L'acido meta-

amminobenzoico aumenta la distanza tra i gruppi sostituenti e ciò aumenta di conseguenza la selettività. Inserendo un naftalene ingombrante aumenta la selettività di verso PTR1 di *Leishmania* piuttosto che di *T. brucei*, dunque il PABA, se sostituito, porta ad una maggiore selettività specie-specifica.

- Sostituzioni sul glutammato: il glutammato è la coda della molecola, presenta molti residui idrofili. Sono stati inseriti sostituenti ciclici e più idrofobici tipo piperidina e benzene che formano relazioni idrofobiche più estese con la tasca enzimatica, questo perché le dimensioni delle tasche sono diverse, conseguentemente questi sostituenti interagiscono meglio con gli enzimi parassitari.

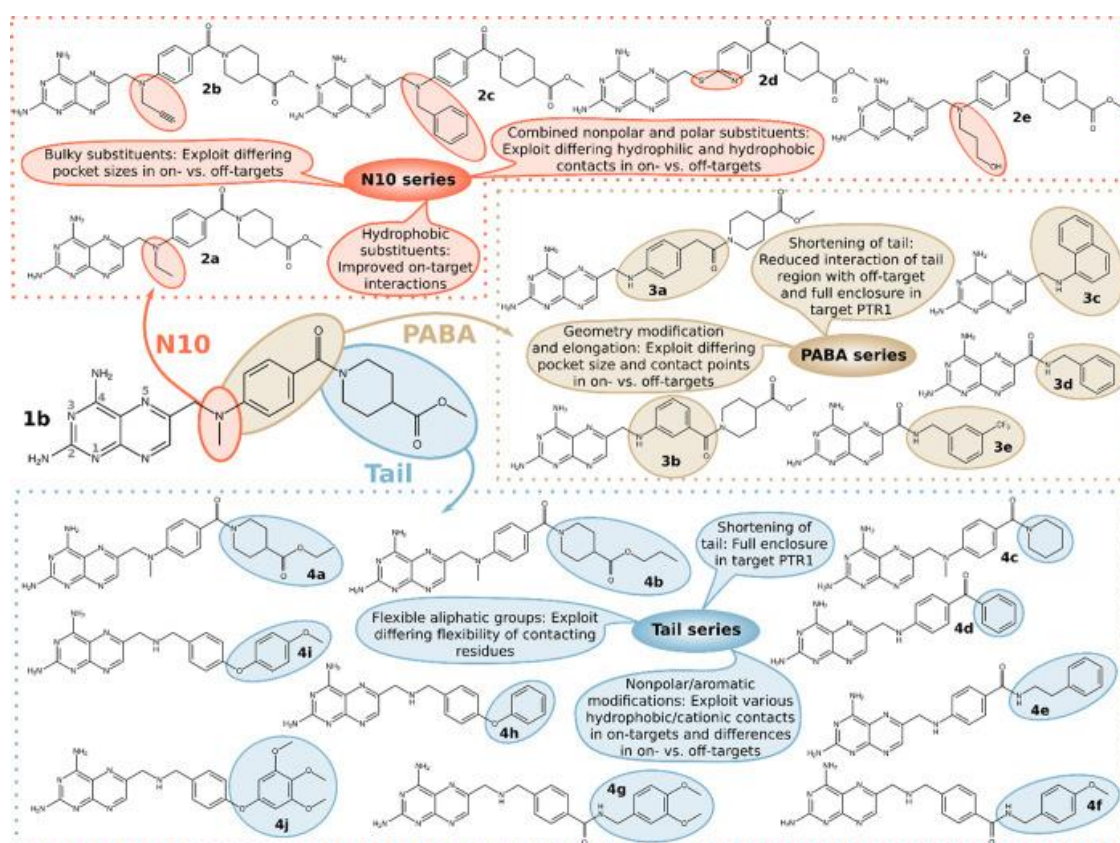


Figura 26. Panoramica delle modifiche effettuate in N10 e sul PABA partendo dal composto 1b [43].

Tutte queste modifiche sono state poi sfruttate per creare molecole più lipofile e si è visto che queste portano ad una inibizione preferenziale di PTR1 di *T.*

brucei. La lipofilia aumenta la specificità verso il parassita. I composti più promettenti in questo caso sono stati i tre rappresentati sotto.

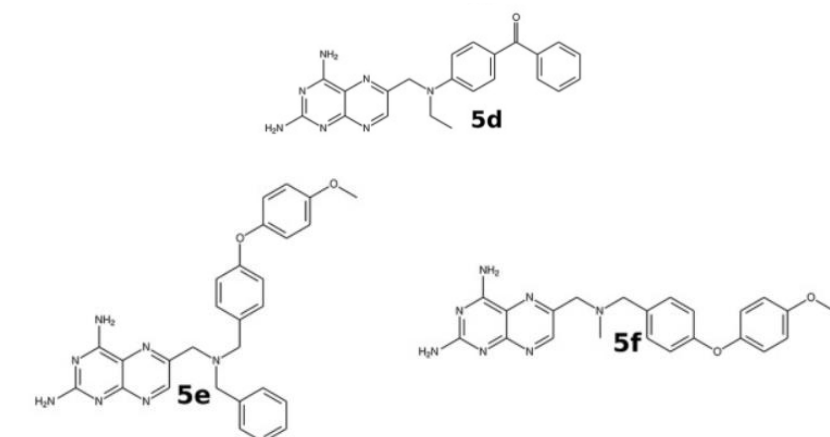


Figura 27. strutture chimiche dei tre composti più promettenti come inibitori di *TbPTR1* **5d-5f** [43].

1.1.7.1. Derivati del cicloguanile

Negli anni sono state sintetizzate numerose molecole nel tentativo di riuscire ad inibire entrambi gli enzimi della via dei folati di *T. brucei*. Solo poche di queste hanno effettivamente presentato attività *in vitro* simile per entrambi gli enzimi. Spesso le molecole ottenute non sono in grado di inibire le due proteine con la stessa potenza.

Una delle molecole che ha mostrato duplice inibizione di DHFR e PTR1 è la pirimetamina (PYR). PYR è stata confrontata con il cicloguanile (CYC) per l'attività inibitoria su *TbPTR1* e, nonostante la loro somiglianza strutturale, CYC si dimostra un inibitore meno potente rispetto a PYR [35].

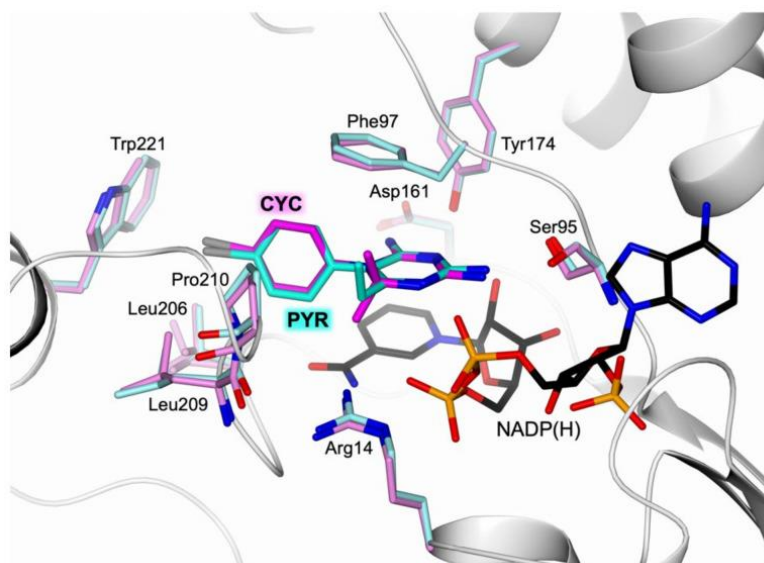


Figura 28: CYC e PYR nella tasca enzimatica di *TbPTR1* [35].

Nonostante ciò, CYC è stato scelto come prototipo per sintetizzare analoghi strutturali al fine di valutare come varia, a seconda dei sostituenti, il potere inibitorio dei derivati di CYC sia verso *TbDHFR* che *TbPTR1* [27].

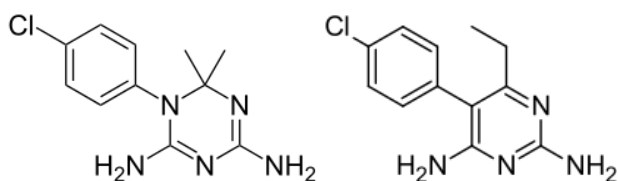


Figura 29. In ordine, da sinistra verso destra, struttura chimica di cicloguanile e pirimetamina.

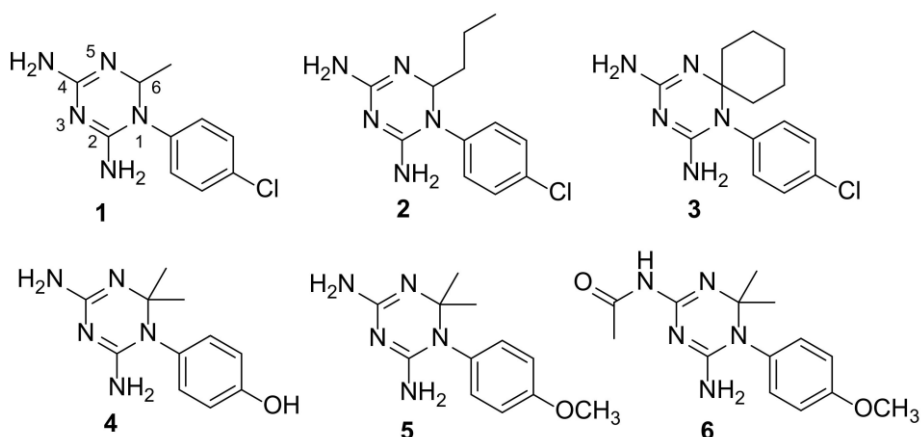


Figura 30. Molecole analoghe del cicloguanile: 1-aryl-2,4-diammino-1,6-diidrotiazine, sintetizzate e saggate come inibitori di *TbPTR1* e *TbDHFR* [35].

Tutti gli analoghi di CYC sintetizzati da Tassone *et al.*, ad eccezione del composto **2** (Figura 30), hanno mostrato maggiore attività inibitoria nei confronti della PTR1 rispetto al prototipo [35].

1.1.7.2. Derivati pirrolopirimidinici

Un altro nucleo sfruttato per sviluppare nuovi inibitori di *Tb*PTR1 è lo scaffold pirrolo pirimidinico.

All'interno di PTR1 esistono due possibili orientamenti delle molecole nel sito attivo: substrato-like e metotressato-like (inibitore). Nel legame di tipo inibitorio la pteridina è ruotata di 180° lungo l'asse N2-N5, questo per massimizzare le possibilità di legame idrogeno nel sito attivo [46].

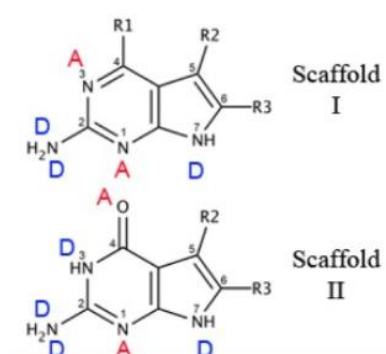


Figura 31. Scaffold pirrolo-pirimidinico, con D si indicano le parti della molecola Hydrogen bond donors mentre con A sono indicate le posizioni Hydrogen bond acceptors [46].

Partendo dai due scaffold sono stati sintetizzati diversi analoghi divisibili in classi: le tre classi principali sono le 4-osso, le 2,4-diammino e le 4-dimetilammino pirrolo-pirimidine. Di queste 3 classi, la seconda in particolare ha dato vita alle molecole più potenti come inibitori di *Tb*PTR1.

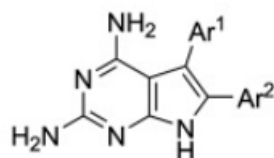


Figura 32. Struttura chimica generale delle molecole con scaffold 2,4-diamminico.

Della classe diammino, due sono i composti che hanno dimostrato maggiore attività inibitoria di *TbPTR1*: **35b** (5-fenil-6-(4-fluorofenil)pirrolopirimidina) e **35c** (5,6-di(4-fluorofenil)pirrolopirimidina) [46].

2. Obiettivo della Tesi

Il presente lavoro costituisce la prosecuzione di una tesi precedente in cui una serie di composti strutturalmente correlati al cicloguanile, avevano dimostrato la capacità di inibire l'enzima PTR1 della via dei folati di *T. brucei* (IC_{50} *TbPTR1* in the range 10.8-23.7, Figura 30). Il cicloguanile e quattro analoghi strutturali già precedentemente sintetizzati presso il laboratorio dove ho svolto il mio progetto di tesi, già testati precedentemente per la loro attività antivirale [47], sono stati ripreparati e saggiati *in vitro* per determinarne l'attività inibitoria nei confronti di *TbPTR1* (Figura 34).

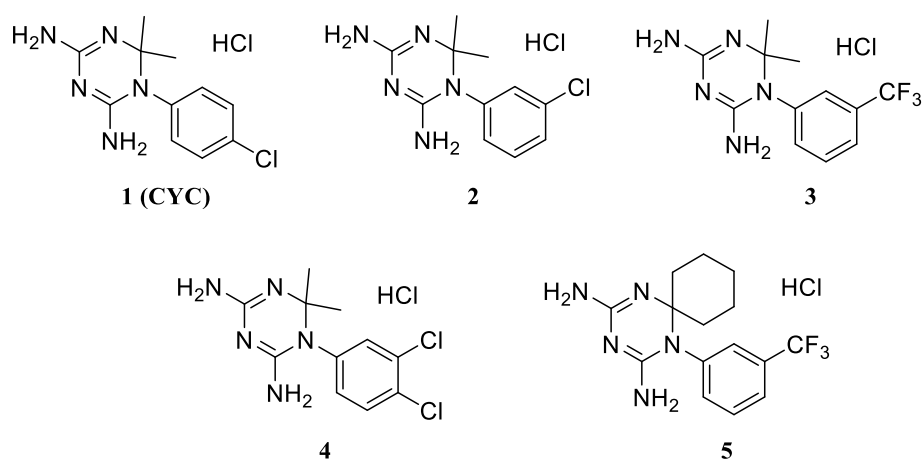
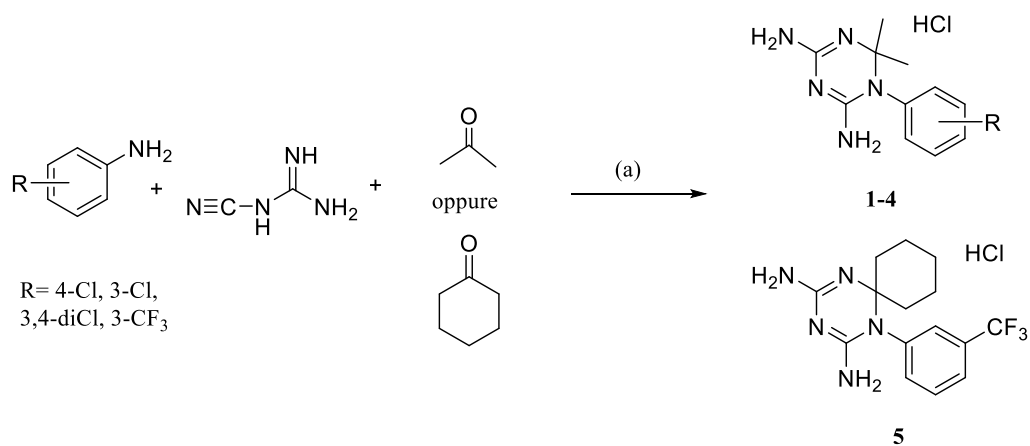


Figura 34. Struttura chimica dei composti sintetizzati 1-5.

I composti sono stati sintetizzati impiegando il metodo sintetico a tre componenti, descritto da Modest *et al.* [48] Facendo reagire l'opportuna anilina con la cianoguanidina e un derivato carbonilico in ambiente acido, a temperatura ambiente (Schema 1).



Schema 1. Sintesi a tre componenti dei composti 1-5. Reagenti e condizioni: (a) HCl conc., MeOH or EtOH, 24h, r.t.

La reazione è stata condotta in un appropriato solvente che può essere il reagente carbonilico stesso con l'aggiunta di qualche mL di metanolo per favorire la solubilizzazione dei reattivi o in etanolo. I prodotti di reazione cristallizzano direttamente dalla miscela di reazione come cloridrati in forma pura.

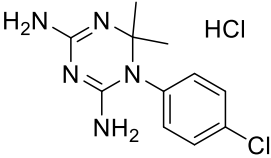
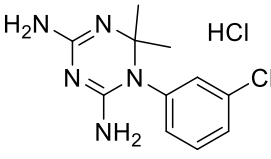
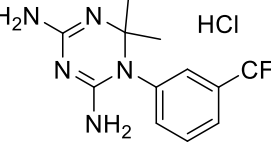
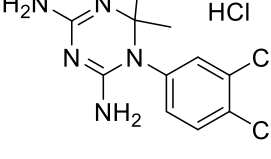
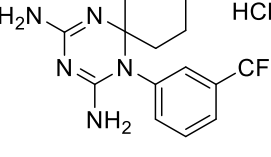
La struttura dei composti è stata confermata mediante analisi elementare; essendo composti già precedentemente pubblicati si rimanda, inoltre, alle indicazioni in letteratura.

3. Risultati e discussione

I test di inibizione enzimatica sono stati effettuati dal gruppo di ricerca della Professoressa Paola Costi dell'Università di Modena e Reggio-Emilia.

I saggi cellulari per la valutazione del profilo di tossicità e di attività nei confronti di *Trypanosoma brucei* sono attualmente oggetto di valutazione presso il gruppo di ricerca della Professoressa Anabela Cordeiro da Silva dell'Università di Porto.

Tabella 1. Valori di inibizione^a dei composti **1-5** nei confronti di *TbPTR1*. ai valori di IC₅₀ sono la media di tre esperimenti indipendenti ± SD.

Composto	Struttura	Attività inibitoria verso
		<i>TbPTR1</i> IC ₅₀ (μM)
1 (CYC)		27.2
2		4.14
3		23.1
4		9.4
5		4.3
MTX	-	0.801

Dai dati sinora ottenuti i composti hanno confermato la capacità di inibire l'enzima PTR1 di *T. brucei*. In particolare, i composti **2**, **4** e **5** si sono dimostrati inibitori più potenti del prototipo CYC, con valori di IC₅₀ compresi tra 4.14 e 9.4 μM. Tutti e tre i composti presentano la posizione meta dell'anello aromatico occupata da sostituenti lipofili. Nel caso del composto **5**, la sostituzione dei sostituenti dimetilici del composto **3** con una porzione spirocicloesamica, mantenendo invariato il sostituente *m*-CF₃ sul fenile in N(1), ha portato un notevole miglioramento della potenza inibitoria. Tale comportamento può essere motivato dalla possibilità di instaurare contatti di van der Waals aggiuntivi con la tasca idrofobica di *Tb*PTR1 costituita dai residui Phe97, Val206, Leu209 e Pro210. Studi successivi di modellistica molecolare permetteranno di comprendere meglio il ruolo di queste sostituzioni nel favorire la stabilità del complesso enzima-inibitore.

Attualmente è in corso anche la valutazione dell'inibizione dell'enzima *Tb*DHFR e la valutazione dell'inibizione della DHFR umana (*h*DHFR) per delineare il profilo di specie-selettività di questa serie di molecole.

4. Parte sperimentale chimica

I solventi e i reagenti usati per le sintesi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. I punti di fusione sono stati effettuati con apparecchio Büchi e non sono corretti. Le analisi elementari sono state eseguite con lo strumento Flash 2000 CHNS (Thermo Scientific) nel Laboratorio di Microanalisi del Dipartimento di Farmacia dell'Università di Genova. I risultati analitici sono entro $\pm 0,4\%$ dei valori calcolati.

4.1. Sintesi generale dei derivati 4,6-diammino-1,2-diidrotriazinici 1-4

Ad una soluzione dell'opportuna anilina (4.36 mmol) in 40mL di acetone e 5mL di MeOH viene aggiunto HCl conc. (4.36 mmol, 1eq.) e la cianoguanidina (4.58 mmol, 1.05 eq.) e si lascia a reagire r.t. per 24h. Al termine, si osserva la formazione di un precipitato bianco che viene filtrato, lavato con acetone e ricristallizzato da EtOH/Et₂O.

1-(4-Clorofenil)-4,5-diammino-1,2-diidro-2,2-dimetil-1,3,5-triazina

cloridrato (1) Resa: 75%. P.f. 228-231°C (acetone). Analisi Elementare per C₁₁H₁₄ClN₅ · HCl, valori calcolati: C, 45.85; H, 5.25; N, 24.07. Valori trovati: C, 45.91; H, 5.24; N, 24.30 [48].

1-(3-Clorofenil)-4,5-diammino-1,2-diidro-2,2-dimetil-1,3,5-triazina

cloridrato (2) Resa: 73%. P.f. 195-198°C (acetone). Analisi Elementare per C₁₁H₁₄ClN₅ · HCl, valori calcolati: C, 45.85; H, 5.25; N, 24.07. Valori trovati: C, 45.96; H, 5.11; N, 24.33 [48].

4,5-diammino-1,2-diidro-2,2-dimetil-1-(3-trifluorometilfenil)-1,3,5-triazina cloridrato (3) Resa: 71.4%. P.f. 183-185°C (acetone). Analisi Elementare per $C_{12}H_{14}F_3N_5 \cdot HCl$, valori calcolati: C, 44.80; H, 4.70; N, 21.77. Valori trovati: C, 44.67; H, 4.84; N, 21.91 [49].

1-(3,4-Clorofenil)-4,5-diammino-1,2-diidro-2,2-dimetil-1,3,5-triazina cloridrato (4) Resa: 72%. P.f. 209-210°C (acetone). Analisi Elementare per $C_{11}H_{13}Cl_2N_5 \cdot HCl$, valori calcolati: C, 40.95; H, 4.37; N, 21.71. Valori trovati: C, 41.02; H, 4.25; N, 21.87 [48].

4.2 Sintesi del 2,2-ciclopentametilene-4,6-diammino-1,2-diidro-1-(3-trifluorometilfenil)-1,3,5-triazina cloridrato (5)

Una soluzione di derivato anilिनico (4.0 mmol) più 0.33 mL (1.05 equiv) di HCl conc. e di un derivato carbonilico (8.0 mmol) sciolti in 15 mL di EtOH assoluto vengono fatti reagire con 4.1 mmol (1.05 equiv.) di cianoguanidina. Si lascia a reagire r.t. per 24h con agitazione e.m. A temperatura ambiente si osserva la formazione di un precipitato cristallino che viene filtrato su setto poroso s.v. e lavato con una miscela 2:1 di acetone ed Et₂O an.

Resa 34%. P.f. 225-226 °C. Analisi Elementare per $C_{15}H_{18}F_3N_5 \cdot HCl$, valori calcolati: C, 49.80; H, 5.29; N, 19.36. Valori trovati: C, 49.89; H, 5.48; N, 19.52 [47].

Bibliografia

- [1] World Neglected Tropical Diseases Day: WHO calls for equitable health services for all, <https://www.who.int/news/item/30-01-2022-world-neglected-tropical-diseases-day-who-calls-for-equitable-health-services-for-all> (accessed July 17, 2023).
- [2] EpiCentro, Giornata mondiale per le Malattie Tropicali Neglette 2021, (n.d.). <https://www.epicentro.iss.it/infettive/giornata-mondiale-malattie-tropicali-neglette-2021> (accessed July 17, 2023).
- [3] CDC - DPDx - Trypanosomiasis, African, (2019). <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisafrican/index.html> (accessed July 17, 2023).
- [4] K.I. Kasozi, E.T. MacLeod, I. Ntulume, S.C. Welburn, An Update on African Trypanocide Pharmaceutics and Resistance, *Frontiers in Veterinary Science*. 9 (2022), 828111. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.828111> (accessed July 17, 2023).
- [5] D. Steverding, The history of African trypanosomiasis, *Parasites & Vectors*. 1 (2008), 3. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-3>
- [6] A.R. Vago, L.O. Andrade, A.A. Leite, D. d'Avila Reis, A.M. Macedo, S.J. Adad, S. Tostes, M.C. Moreira, G.B. Filho, S.D. Pena, Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs, *Am. J. Pathol.* 156 (2000), 1805–1809. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65052-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65052-3).
- [7] H.B. Tanowitz, L.V. Kirchhoff, D. Simon, S.A. Morris, L.M. Weiss, M. Wittner, Chagas' disease, *Clinical Microbiology Reviews*. 5 (1992), 400–419. <https://doi.org/10.1128/cmr.5.4.400>
- [8] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, Human African trypanosomiasis, *The Lancet*. 390 (2017), 2397–2409. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31510-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6)
- [9] K.R. Matthews, The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*, *J. Cell. Sci.* 118 (2005), 283–290. <https://doi.org/10.1242/jcs.01649>
- [10] H. Zimmermann, Antigenic variation and stumpy development in *Trypanosoma brucei*, Universität Würzburg, 2020, PhD Thesis. <https://doi.org/10.25972/OPUS-14690>
- [11] C.-P. Ooi, P. Bastin, More than meets the eye: understanding *Trypanosoma brucei* morphology in the tsetse, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3 (2013). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00071>
- [12] F. Courtin, V. Jamonneau, E. Oké, B. Coulibaly, Y. Oswald, S. Dupont, G. Cuny, J.-P. Doumenge, P. Solano, Towards understanding the presence/absence of Human African Trypanosomiasis in a focus of Côte d'Ivoire: a spatial analysis of the pathogenic system, *International Journal of Health Geographics*. 4 (2005), 27. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-4-27>
- [13] https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1693_allegato.pdf, (accessed July 17, 2023).
- [14] R. Brun, J. Blum, F. Chappuis, C. Burri, Human African trypanosomiasis, *Lancet*. 375 (2010), 148–159. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60829-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60829-1)
- [15] Human African trypanosomiasis (sleeping sickness), <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/human-african-trypanosomiasis> (accessed July 17, 2023).
- [16] E. Pays, B. Vanhollenbeke, P. Uzureau, L. Lecordier, D. Pérez-Morga, The molecular arms race between African trypanosomes and humans, *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (2014), 575–584. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3298>
- [17] E. Pays, H. Coquelet, A. Pays, P. Tebabi, M. Steinert, *Trypanosoma brucei*: posttranscriptional control of the variable surface glycoprotein gene expression site, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989), 4018–4021. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.9.4018-4021.1989>
- [18] T. Bartossek, N.G. Jones, C. Schäfer, M. Cvitković, M. Glogger, H.R. Mott, J. Kuper, M. Brennich, M. Carrington, A.-S. Smith, S. Fenz, C. Kisker, M. Engstler, Structural basis for the shielding function of the dynamic trypanosome variant surface glycoprotein coat, *Nat. Microbiol.* 2 (2017), 1523–1532. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0013-6>

- [19] D. Horn, Antigenic variation in African trypanosomes, *Mol. Biochem. Parasitol.* 195 (2014), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.05.001>
- [20] A. Saha, V.P. Nanavaty, B. Li, Telomere and Subtelomere R-loops and Antigenic Variation in Trypanosomes, *J. Mol. Biol.* 432 (2020), 4167–4185. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.025>
- [21] A. Stich, P.M. Abel, S. Krishna, Human African trypanosomiasis, *BMJ.* 325 (2002) 203–206 <https://doi.org/10.1136/bmj.325.7357.203>
- [22] D.J. Grab, J.C. Garcia-Garcia, O.V. Nikolskaia, Y.V. Kim, A. Brown, C.A. Pardo, Y. Zhang, K.G. Becker, B.A. Wilson, A.P.C. de A Lima, J. Scharfstein, J.S. Dumler, Protease activated receptor signaling is required for African trypanosome traversal of human brain microvascular endothelial cells, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009), e479. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000479>
- [23] F. Chappuis, L. Loutan, P. Simarro, V. Lejon, P. Büscher, Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis, *Clin. Microbiol. Rev.* 18 (2005), 133–146. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.1.133-146.2005>
- [24] S. Biéler, E. Matovu, P. Mitashi, E. Ssewanyana, S.K. Bi Shamamba, P.R. Bessell, J.M. Ndung'u, Improved detection of *Trypanosoma brucei* by lysis of red blood cells, concentration and LED fluorescence microscopy, *Acta Trop.* 121 (2012) 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.016>
- [25] P.G.E. Kennedy, J. Rodgers, Clinical and Neuropathogenetic Aspects of Human African Trypanosomiasis, *Front. Immunol.* 10 (2019), 39. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00039>
- [26] V. Lejon, P. Büscher, Review Article: cerebrospinal fluid in human African trypanosomiasis: a key to diagnosis, therapeutic decision and post-treatment follow-up, *Trop. Med. Int. Health.* 10 (2005), 395–403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2005.01403.x>
- [27] G. Landi, P. Linciano, C. Borsari, C.P. Bertolacini, C.B. Moraes, A. Cordeiro-da-Silva, S. Gul, G. Witt, M. Kuzikov, M.P. Costi, C. Pozzi, S. Mangani, Structural Insights into the Development of Cycloguanil Derivatives as *Trypanosoma brucei* Pteridine-Reductase-1 Inhibitors, *ACS Infect. Dis.* 5 (2019), 1105–1114. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00358>
- [28] J. Hidalgo, J.F. Ortiz, S.P. Fabara, A. Eissa-Garcés, D. Reddy, K.D. Collins, R. Tirupathi, Efficacy and Toxicity of Fexinidazole and Nifurtimox Plus Eflornithine in the Treatment of African Trypanosomiasis: A Systematic Review, *Cureus.* 13 (2021), e16881. <https://doi.org/10.7759/cureus.16881>
- [29] F. Doua, T.W. Miezán, J.R. Sanon Singaro, F. Boa Yapo, T. Baltz, The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55 (1996), 586–588. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.586>
- [30] T.P.C. Dorlo, P.A. Kager, Pentamidine dosage: a base/salt confusion, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (2008), e225. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000225>
- [31] C. Schmid, M. Richer, C.M.M. Bilenge, T. Josenando, F. Chappuis, C.R. Manthelot, A. Nangouma, F. Doua, P.N. Asumu, P.P. Simarro, C. Burri, Effectiveness of a 10-day melarsoprol schedule for the treatment of late-stage human African trypanosomiasis: confirmation from a multinational study (IMPAMEL II), *J. Infect. Dis.* 191 (2005), 1922–1931. <https://doi.org/10.1086/429929>
- [32] J. Blum, S. Nkunku, C. Burri, Clinical description of encephalopathic syndromes and risk factors for their occurrence and outcome during melarsoprol treatment of human African trypanosomiasis, *Trop. Med. Int. Health.* 6 (2001), 390–400. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00710.x>
- [33] F. Checchi, P. Piola, H. Ayikoru, F. Thomas, D. Legros, G. Priotto, Nifurtimox plus Eflornithine for Late-Stage Sleeping Sickness in Uganda: A Case Series, *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 1 (2007), e64. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000064>
- [34] E.D. Deeks, Fexinidazole: First Global Approval, *Drugs.* 79 (2019), 215–220. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-1051-6>
- [35] G. Tassone, G. Landi, P. Linciano, V. Francesconi, M. Tonelli, L. Tagliazucchi, M.P. Costi, S. Mangani, C. Pozzi, Evidence of Pyrimethamine and Cycloguanil Analogues as Dual Inhibitors of *Trypanosoma brucei* Pteridine Reductase and Dihydrofolate Reductase, *Pharmaceuticals.* 14 (2021), 636. <https://doi.org/10.3390/ph14070636>

- [36] N. Sienkiewicz, S. Jarosławski, S. Wyllie, A.H. Fairlamb, Chemical and genetic validation of dihydrofolate reductase–thymidylate synthase as a drug target in African trypanosomes, *Molecular Microbiology*. 69 (2008), 520–533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06305.x>
- [37] I.H. Gilbert, Inhibitors of dihydrofolate reductase in Leishmania and trypanosomes, *Biochim. Biophys. Acta*. 1587 (2002), 249–257. [https://doi.org/10.1016/s0925-4439\(02\)00088-1](https://doi.org/10.1016/s0925-4439(02)00088-1)
- [38] B. Nare, L.W. Hardy, S.M. Beverley, The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductase–thymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997), 13883–13891. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13883>
- [39] A.R. Bello, B. Nare, D. Freedman, L. Hardy, S.M. Beverley, PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91 (1994), 11442–11446. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11442>
- [40] M.P. Kimuda, D. Laming, H.C. Hoppe, Ö. Tastan Bishop, Identification of Novel Potential Inhibitors of Pteridine Reductase 1 in *Trypanosoma brucei* via Computational Structure-Based Approaches and in Vitro Inhibition Assays, *Molecules*. 24 (2019), 142. <https://doi.org/10.3390/molecules24010142>
- [41] A. Dawson, F. Gibellini, N. Sienkiewicz, L.B. Tulloch, P.K. Fyfe, K. McLuskey, A.H. Fairlamb, W.N. Hunter, Structure and reactivity of *Trypanosoma brucei* pteridine reductase: inhibition by the archetypal antifolate methotrexate, *Mol. Microbiol.* 61 (2006), 1457–1468. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05332.x>
- [42] J. Wang, É. Leblanc, C.-F. Chang, B. Papadopoulou, T. Bray, J.M. Whiteley, S.-X. Lin, M. Ouellette, Pterin and Folate Reduction by the *Leishmania tarentolae* H Locus Short-Chain Dehydrogenase/Reductase PTR1, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 342 (1997), 197–202. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0126>
- [43] I. Pöhner, A. Quotadamo, J. Panecka-Hofman, R. Luciani, M. Santucci, P. Linciano, G. Landi, F. Di Pisa, L. Dello Iacono, C. Pozzi, S. Mangani, S. Gul, G. Witt, B. Ellinger, M. Kuzikov, N. Santarem, A. Cordeiro-da-Silva, M.P. Costi, A. Venturelli, R.C. Wade, Multitarget, Selective Compound Design Yields Potent Inhibitors of a Kinetoplastid Pteridine Reductase 1, *J. Med. Chem.* 65 (2022), 9011–9033. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00232>
- [44] M.P. Barrett, I.H. Gilbert, Targeting of Toxic Compounds to the Trypanosome’s Interior, in: J.R. Baker, R. Muller, D. Rollinson (Eds.), *Advances in Parasitology*, Academic Press, 2006: pp. 125–183. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)63002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)63002-9)
- [45] A. Cavazzuti, G. Paglietti, W.N. Hunter, F. Gamarro, S. Piras, M. Loriga, S. Allecca, P. Corona, K. McLuskey, L. Tulloch, F. Gibellini, S. Ferrari, M.P. Costi, Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105 (2008), 1448–1453. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704384105>
- [46] A.I. Khalaf, J.K. Huggan, C.J. Suckling, C.L. Gibson, K. Stewart, F. Giordani, M.P. Barrett, P.E. Wong, K.L. Barrack, W.N. Hunter, Structure-based design and synthesis of antiparasitic pyrolopyrimidines targeting pteridine reductase 1, *J. Med. Chem.* 57 (2014), 6479–6494. <https://doi.org/10.1021/jm500483b>
- [47] M. Tonelli, L. Naesens, S. Gazzarrini, M. Santucci, E. Cichero, B. Tasso, A. Moroni, M.P. Costi, R. Loddo, Host dihydrofolate reductase (DHFR)-directed cycloguanil analogues endowed with activity against influenza virus and respiratory syncytial virus, *European Journal of Medicinal Chemistry*. 135 (2017), 467–478. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.070>
- [48] E.J. Modest, Chemical and Biological Studies on 1,2-Dihydro-s-triazines. II. Three-Component Synthesis I, *J. Org. Chem.* 21 (1956), 1–13. <https://doi.org/10.1021/jo01107a001>
- [49] M.W. Fisher, 1-m-Trifluoromethylphenyl-4,5-diamino-1,2-dihydro-2,2-dimethyl-1,3,5-triazine, Patent DE 1118790, 1961.