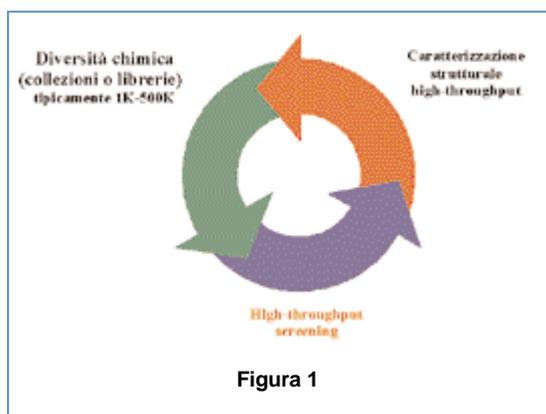




a cura di Pierfausto Seneci - Director of Chemistry, NAP AG, Monaco, Germania

Moderne tecniche di Screening in Drug Discovery

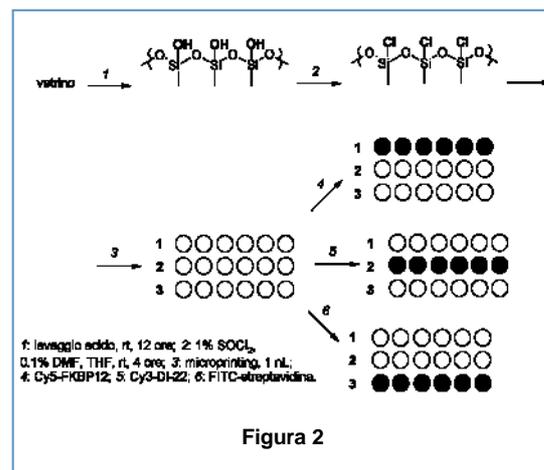
Questa Rubrica si propone, ormai da quasi un biennio, di fare una sorta di *zapping* all'interno delle novità più salienti nel mondo chimico, privilegiando ciò che combina un alto grado di innovazione scientifica e tecnologica con evidenti possibilità applicative in ambito accademico od industriale. L'aspetto a mio parere principale è di differenziazione fra la ricerca cosiddetta "classica" e l'approccio moderno al disegno e alla realizzazione con successo di progetti di ricerca scientifica è l'introduzione ormai diffusa di metodi e tecnologie *high-throughput*, o ad alta velocità; questo cambiamento è evidenziato graficamente in Figura 1. Per accelerare significativamente la scoperta di principi attivi in qualsiasi area di applicazione (ricerca farmaceutica, catalisi, nuovi materiali e via di seguito) è necessario avere accesso a diversità chimica, cioè a collezioni di composti e/o a librerie sintetiche, a metodi ad alta velocità per la determinazione della loro attività e a metodi di determinazione strutturale dei composti attivi pure ad alta velocità. La bassa capacità o velocità (*low throughput*) anche di uno solo dei tre componenti riconduce l'intero processo alla stessa bassa velocità ed alla capacità nel fornire risultati in termini di prodotti da sfruttare per applicazioni di vario tipo.



In questa Rubrica abbiamo spesso trattato della componente sintetica e per certi versi anche di problematiche legate alla determinazione di strutture attive. Solo di sfuggita abbiamo accennato alla componente *screening*, che riguarda la determinazione dell'attività di collezioni o librerie di composti in un saggio specifico legato all'applicazione pratica ricercata; a partire da oggi, intervallandoli con altri argomenti, cercherò di illustrare alcuni esempi incentrati su strategie di *screening* applicate a diversi settori. In questo e nel prossimo appuntamento parleremo di *screening* in ricer-

ca farmaceutica e più precisamente di due approcci moderni alla valutazione biologica di composti chimici nella fase cosiddetta di *lead discovery*: in questa fase non sono conosciuti composti interagenti con il *target* biologico di interesse e per l'appunto si tratta di scoprire almeno una struttura che possa poi fungere da modello per un approccio di ottimizzazione strutturale (*lead optimization*) più razionale.

Un modo di accelerare la scoperta di nuovi *lead* è quello di aumentare il *throughput* dell'intero processo di *drug discovery*, ciò significa sintetizzare librerie combinatoriali e testarle in saggi biologici rapidi ed automatizzati, possibilmente mantenendo un alto livello qualitativo (nella sintesi, nella caratterizzazione analitica e nello *screening*) e miniaturizzando l'intero processo, cioè facendo sì che solo minime quantità di reagenti chimici e biologici siano utilizzati per ridurre i costi, gli spazi e lo smaltimento dei materiali una volta ultimata la campagna di *screening*. Il gruppo di Schreiber ad Harvard (*Hergenrother, P. J. et al., J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7849) ha messo a punto un sistema miniaturizzato di *screening* basato sull'utilizzo di semplici vetrini da microscopio trattati con soluzione fortemente acida (*Step 1*, Figura 2) a dare la liberazione della funzione Si-OH, poi convertita con cloruro di tionile in funzione attivata Si-Cl (*Step 2*).

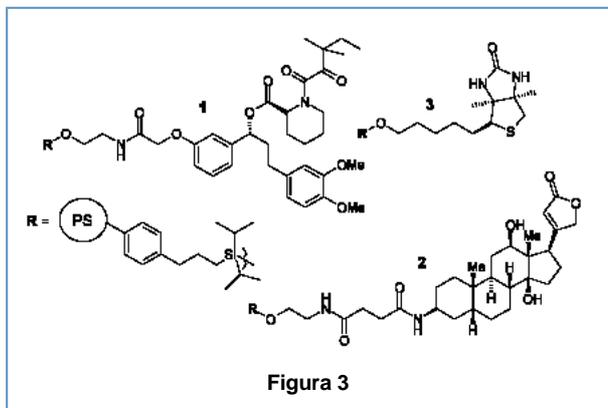


L'obiettivo era quello di mettere a punto una metodica di *screening* miniaturizzata per librerie in fase solida allo scopo di testare con accuratezza soluzioni derivanti da singole biglie di resina, usando le soluzioni possibilmente in più saggi diversi e potendo determinare univocamente l'identità dei componenti la libreria. *In primis* è stata effettuata una validazione del sistema: tre composti





idrossilici sono stati supportati su una macroresina particolare (circa 500 μ m di diametro per biglia), recante un silil-*linker* F⁻ labile, a dare tre costrutti supportati (**1-3**, Figura 3).



Una volta liberato con F⁻ da una singola biglia ognuno dei tre composti, esso è stato ridisciolti in 5 μ l di DMF per dare soluzioni a concentrazione circa 5mM; un pipettatore robotico miniaturizzato (*microprinter*) ha permesso di prelevare con accuratezza 1nl (!!!) di soluzione per volta e di depositarlo (stamparlo) in zone predefinite del vetrino da microscopio, ottenendo diametri medi di 300 μ m spaziate l'uno dall'altro di 100 μ m, quindi identificabili e separati (*Step 3*, Figura 2). Ogni soluzione contiene l'alcoole rilasciato, che reagisce con il silil-cloruro ed è quindi supportato sul vetrino stesso. Trattando il vetrino, dopo lavaggi ad eliminare la soluzione di DMF, con la proteina FKBP12 (*Step 4*), o con l'anticorpo DI-22 (*Step 5*), o con streptavidina (*Step 6*, Figura 2) si sono complessati i suddetti reagenti biologici rispettivamente con **1**, **2** e **3**; ognuno dei tre reagenti biologici era fluorescente in quanto funzionalizzato con opportuni *marker*, quindi una semplice lettura di fluorescenza ha permesso di identificare gli *spot* di deposizione dove è contenuto il derivato interagente con il reagente marcato (*spot* neri in Figura 2). Il sistema è stato poi testato con una piccola libreria di 80 alcoli ed ha dato risultati altrettanto positivi in termini di sensibilità.

Questo metodo è concettualmente semplice e prevede l'utilizzo di reagenti e tecnologie semplici: perfino i pipettatori sono derivati dai comuni *inkjet printer* in commercio. La soluzione proveniente da una singola biglia di resina può essere stampata 5.000 volte in una miriade di saggi diversi e la sensibilità del metodo usando *target* opportunamente funzionalizzati (saggi colorimetrici, di fluorescenza ecc.) è elevatissima.

Il processo di *microprinting* è estremamente rapido: circa 130 vetrini possono essere funzionalizzati con 96 *spot* ciascuno in pochi minuti. La modifica del vetrino con un protocollo diverso (ad esempio in MacBeath, G. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 7967 per funzioni SH) permette di ancorare librerie recanti funzioni diverse e non solo ossidriliche. In una parola, il cosiddetto *microprinting screening*, unito a metodi efficaci di sintesi combinatoriale in fase solida usando macrosupporti, promette di essere un metodo molto efficace per il processo di *lead discovery*.

