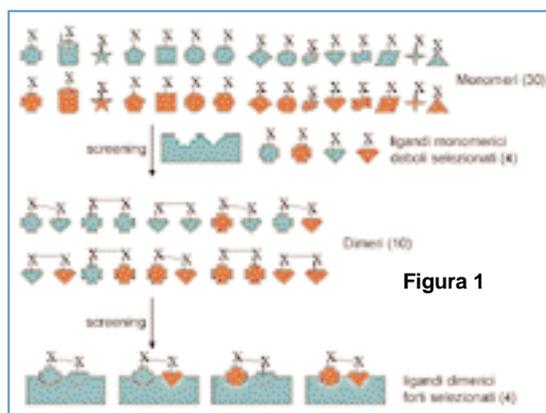




a cura di Pierfausto Seneci - Director of Chemistry, NAP AG, Monaco, Germania

Moderne tecniche di Screening in Drug Discovery (2^a parte)

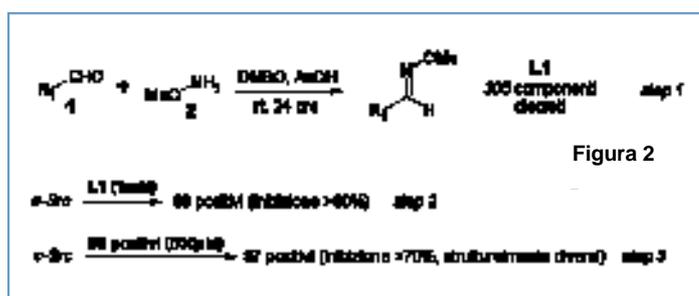
Riprendiamo qui l'argomento iniziato nell'apuntamento precedente e cioè lo screening in ricerca farmaceutica e, più precisamente, nella fase di lead discovery. Un altro approccio allo screening in lead discovery consiste nel cercare di rendere più facile la scoperta di nuovi principi attivi attraverso l'uso di elementi guida razionali, che permettono quindi di ottenere l'informazione desiderata facendo uso di un minor numero di composti analizzati. Un recente esempio proposto da Ellman a Berkeley (J.J. Maly *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 2419, USA 97), introduce l'uso di librerie di potenziali ligandi mono- e dimerici per la rapida mappazione del sito attivo di un target biologico seguendo il semplice schema stilizzato riportato in Figura 1.



In un primo momento, si prepara una libreria di composti monomerici (30 nel disegno) contenente un elemento strutturale comune X; questa libreria è sottoposta a screening e sono prescelti solo i componenti mostranti un'interazione, seppur debole, con il target (4 in Figura 1). Questi ligandi monomerici sono poi connessi attraverso il gruppo funzionale comune X a dare elementi dimerici, nell'intenzione di ottenere un effetto additivo portante a ligandi dimerici forti interagenti con due zone separate del sito attivo (4 in Figura 1). Il "filtro" iniziale permette di ridurre il numero di composti testati: se pensiamo alla prima lista di 30 monomeri, tutte le loro possibili combinazioni etero- e omodimeriche ammonterebbero a 465 composti da preparare e da analizzare. Questa strategia permette di preparare e testare solo 30 monomeri e 10 dimeri, cioè 40 composti, ottenendo lo stesso risultato finale.

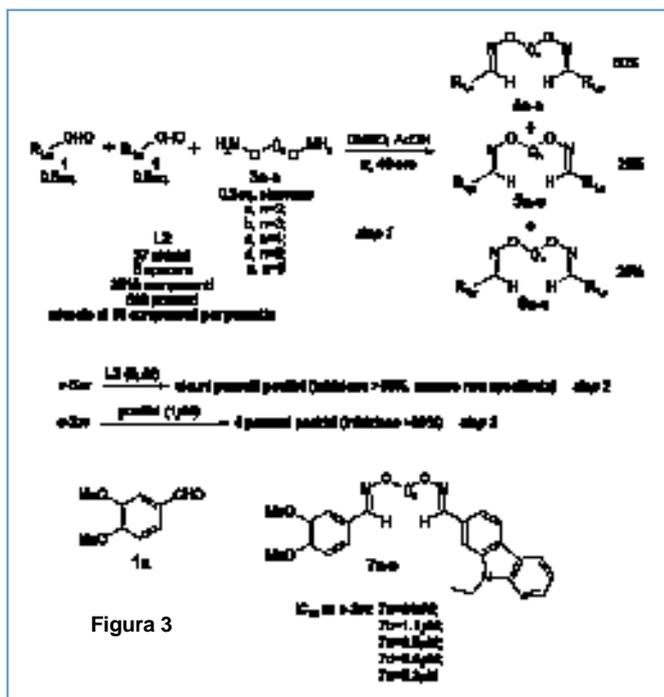
Ci sono però elementi da tenere ben precisi: questa strategia richiede l'identificazione di ligandi monomerici deboli (fino a 1 millimolare), quindi i composti preparati dovranno avere estrema solubilità in ambiente acquoso; il gruppo X deve essere facile da introdurre nella libreria, stabile nelle condizioni di saggio biologico e dimerizzabile facilmente con gli altri ligandi monomerici; il set di monomeri da funzionalizzare con il gruppo X deve essere commercialmente disponibile a prezzi ragionevoli. Considerando tutto ciò, Ellman ha costruito una prima libreria monomerica L1 composta da 305 O-metil ossime, ottenute per condensazione di 305 aldeidi commercialmente disponibili 1 con O-metil idrossilammina 2 (Figura 5, step 1). Il target biologico, prescelto in base alla nota difficoltà di trovare inibitori selettivi dello stesso, è stata una tirosina chinasi chiamata c-Src. La reazione di sintesi per L1 può essere effettuata stechiometricamente ed è sufficiente eliminare i solventi per ottenere i potenziali ligandi puri e pronti per il saggio; la formazione dell'ossima è compatibile con la presenza di un vasto gruppo di funzioni sulle aldeidi; le metilossime L1 sono stabili a pH fisiologico e possono essere considerate "drug-like" in quanto vari farmaci in commercio contengono questa funzione.

Un primo screening a concentrazione di ligando pari a 1mM ed un secondo più stringente a 500µM (steps 2, 3, Figura 2) hanno permesso di identificare 47 membri da L1 che mostravano inibizione significativa a 500µM; la similarità estrema



di alcune molecole identificate ha permesso di ridurre il numero dei ligandi deboli identificati a 37. A questo punto, si imponeva la sintesi di opportuni dimeri, realizzata come mostrato in Figura 3 (step 1): due fra le 37 aldeidi prescelte sono fatte reagire con una miscela equimolecolare di 5 diversi linker bis-idrossilamminici 3a-e in un pozzetto di una "microtiter plate" a 96 pozzetti e tutte le possibili combinazioni (666) a dare eterodimeri sono realizzate. La reazione ha prodotto 666 mi-





sce, costituenti la libreria dimerica L2, ognuna contenente un eterodimero **4** e due omodimeri **5,6** in rapporto 2:1:1. Ogni dimero a sua volta contiene una miscela approssimati-

vamente equimolecolare di cinque composti **4a-e**, **5a-e** o **6a-e** che variano solo per la lunghezza del linker bis-ossimico; ciò è importante per studiare anche l'orientazione relativa e la distanza ideale nella quale i due elementi di binding si devono trovare per un'interazione ottimale con c-Src. Ogni pozzetto conterrà quindi miscele di 15 derivati a struttura e concentrazione relative note. Ogni miscela è stata testata prima a concentrazione 5 μ M, poi a 1 μ M (step 2,3), originando quattro pozzetti estremamente attivi identificati dal numero relativo dell'aldeide; si noti come ognuno di essi contenga la stessa aldeide **1a**, accoppiata con quattro altre aldeidi. Un accurato lavoro di caratterizzazione ha poi permesso di determinare la struttura del composto più attivo (**7a**, Figura 3) e di verificare la grande dipendenza dalla lunghezza del linker dell'attività su c-Src e della selettività verso altre kinasi dei composti (vedi ad esempio **7b-e** in Figura 3).

Questo metodo appare estremamente interessante ed un'opportuna scelta delle classi di monomeri e della chimica di giunzione dovrebbe permettere una generalizzazione dell'approccio; tanto per ribadire la validità, il totale di campioni sintetizzati e testati nell'esempio è di 305x2 (primo screening a due concentrazioni) + 666x2 (secondo screening a due concentrazioni) + 60 (screening finale dove i 60 prodotti corrispondenti ai quattro pozzetti attivi sono preparati e testati individualmente)=2002 campioni; lo screening di tutte le combinazioni omo/eterodimeriche dei 305 monomeri prescelti all'inizio avrebbe richiesto la sintesi di più di 230.000 campioni, includendo anche i cinque diversi spaziatori bis-ossimici!

