

In memoria di Lorenzo Seneci, 1924-2003

● **A tutti noi è sicuramente capitato** di vedere ogni tanto titoli di lavori scientifici che catturano l'attenzione, non necessariamente perché proiettino l'immagine di un contenuto scientifico di particolare rilevanza od interesse, ma anche perché risultano piuttosto evidenziare elementi contraddittori che ci aspettiamo essere razionalizzati nel corpo del lavoro. Pochi giorni fa mi sono imbattuto in un lavoro (McGovern *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 4265) che mi ha colpito sia per il suo titolo provocatorio ("A specific mechanism of nonspecific inhibition") sia per la sua rilevanza. È chiaro infatti a noi operatori farmaceutici come sia difficile prevedere aspetti aspecifici/negativi di potenziali inibitori, che ne compromettono l'utilizzo per

scopi farmaceutici, spesso senza permettere una "razionalizzazione" del problema incontrato che permetta di evitarlo in futuro per altri composti a potenziale attività farmacologica. Tutto ciò è di estrema attualità nello screening ad alta capacità (high-throughput screening, HTS), dove collezioni/librerie di composti sono ripetutamente testate per la loro attività biologica su un gran numero di target a rilevanza terapeutica: la possibilità di "ripulire" a priori queste librerie da composti aspecifici non sviluppabili permetterebbe di focalizzare dall'inizio l'attenzione su composti "drug-like", e di direzionare gli sforzi sintetici per l'arricchimento della collezione/libreria di composti verso strutture sviluppabili come farmaci. È possibile, quindi, determinare un meccanismo specifico che renda un composto chimico, o una classe strutturale, aspecificamente attivo su una vasta

gamma di bersagli biologici, e quindi non adatto per essere utilizzato come inibitore specifico? A giudicare dal primo lavoro pubblicato dagli stessi autori (McGovern *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1712) si direbbe di sì. Per dimostrarlo, hanno selezionato una lista di 15 composti accomunati da un'inibizione micromolare aspecifica di target non correlati fra loro, quali la β -lattamasi, la chimotripsina, la deidrofollato reductasi e la β -galattosidasi. Queste 15 strutture furono scelte in modo da rappresentare classi strutturali molto diverse (vedi Figura 1 per alcuni esempi). Queste molecole hanno dimostrato di possedere alcune caratteristiche comuni, precisamente:

- un'inibizione time-dependent. Infatti, quando l'inibitore e un enzima sono preincubati prima dell'avvio della reazione enzimatica la potenza dell'inibitore aumenta fino a 50 volte il valore senza preincubazione. Queste condizioni non provocano alcun effetto su inibitori specifici;
- un'inibizione dipendente dal fattore di diluizione. Diluizione della miscela biologica contenente l'inibitore e l'enzima attivo provoca il peggioramento e in ultima analisi la cancellazione dell'effetto inibitorio. Queste condizioni non provocano alcun effetto su inibitori specifici;
- un'inibizione non legata alla denaturazione dei target proteici. Agenti denaturanti (temperatura, urea ecc.), infatti, non aumentano l'effetto di questi inibitori;

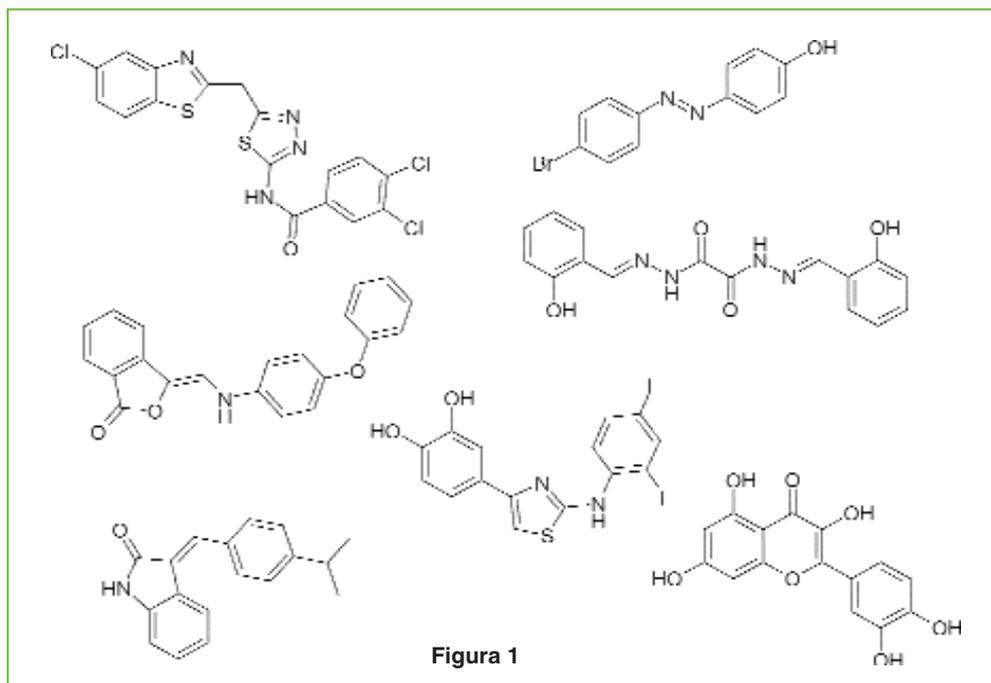


Figura 1

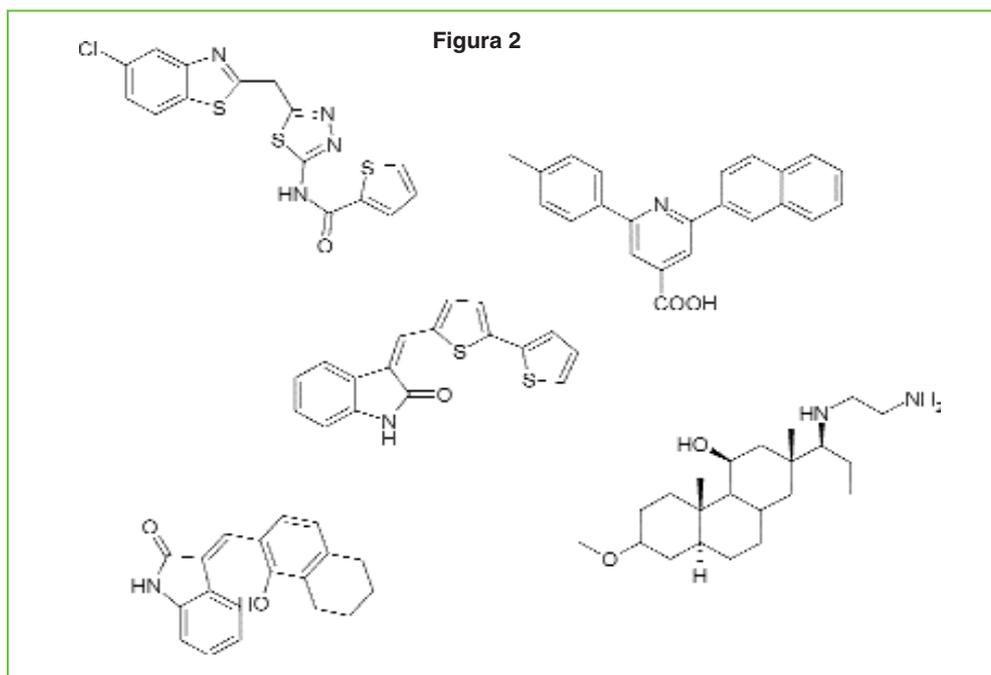


Figura 2

- un'inibizione dipendente dalla concentrazione del target biologico. Incrementando la concentrazione del target da 1 nM a 10 nM in presenza di inibitore aspecifico a concentrazioni micromolari produce una riduzione fino a 50 volte dell'effetto inibitore. Queste condizioni non provocano alcun effetto su inibitori specifici.

Specialmente l'ultima caratteristica ha convinto gli autori che fenomeni di aggregazione molecolare potessero essere responsabili del fenomeno. Infatti, un tipico rapporto inibitore/enzima in un esperimento biologico è di circa 10.000 molecole di inibitore per singola molecola di enzima: è facile capire come pur incrementando di 10 volte la concentrazione dell'enzima l'eccesso molare di inibitore resti sempre notevole. Se invece l'inibitore tendesse a determinate concentrazioni ad aggregarsi in agglomerati contenenti migliaia di molecole, lo stesso incremento di concentrazione dell'enzima provocherebbe una variazione significativa della stechiometria enzima-inibitore e, quindi, un calo dell'attività inibente.

Come, quindi, determinare la presenza di questi presunti aggregati? Gli autori sono ricorsi alla dispersione della luce causata da particelle (dynamic light scattering, DLS) ed hanno per l'appunto verificato che per tutti i 15 prodotti sopracitati si osservano, in soluzione acquosa a concentrazione micromolare, particelle ad attività disperdente sulla luce aventi diametro variabile fra i 100 e i 400 nanometri. Se consideriamo le dimensioni di un enzima target (ad esempio, 6,6 nanometri di diametro per la β -lattamasi e 18,5 nanometri per la β -galattosidasi) ci rendiamo conto di come si abbia a che fare con interazioni macromolecolari di potenza moderata (l'aggregazione non avviene a concentrazioni sub-micromolecolari) e di natura aspecifica, visto che l'interazione fra una macromolecola proteica e l'aggregato avviene come media di numerose interazioni sulle due estese superfici molecolari che si verificano in maniera sufficiente per molti target biologici a struttura anche significativamente diversa. Da ultimo, gli autori hanno "validato" ulteriormente l'ipotesi scegliendo 30 composti dalla collezione di screening di Pharmacia Corporation (multinazionale farmaceutica) sulla base, ancora una volta, della loro aspecifica attività inibitoria su enzimi non strutturalmente correlati (ma non includenti i 4 enzimi/target usati in questo lavoro).

Fra questi 30 composti, 20 hanno chiaramente mostrato attività micromolare su β -lattamasi, chimotripsina, deidrofolato reductasi e β -galattosidasi hanno evidenziato maggior potenza quando preincubati con β -lattamasi e β -galattosidasi e minore attività dopo decuplicazione della concentrazione dell'enzima. In più questi 20 prodotti (vedi Figura 2 per alcune strutture rappresentative) hanno tutti evidenziato la presenza di aggregati macromolecolari (diametro 100-400 nm) tramite misurazioni DLS a concentrazione micromolare dell'inibitore.

Ed ora eccoci alla domanda più importante: come passare da un'osservazione alla predizione della capacità aggregante (quindi, negativa per applicazioni farmaceutiche) di molecole a potenziale attività farmacologica? Chi di voi vuole saperlo subito, può fare riferimento ad altre pubblicazioni degli stessi autori. Chi, al contrario, ha più pazienza può attendere questa rubrica il mese prossimo e lì troverà la seconda puntata di questa storia (corredata da lavori di altri gruppi aventi un simile argomento).

Convenzioni per i soci della Società Chimica Italiana

Sconti con catene alberghiere

- *Best Western Hotels Italia - Estero*
Sconto del 20% (circa).
Centro di prenotazione: Best Western "Top Line" 800 820080.
Convenzione 01215650.
- *Bettoja Hotels*
Sconto del 20% (circa).
Centro di prenotazione: 800 860004.
Convenzione Bettoja Hotels/Società Chimica Italiana.
- *Viva Hotels - Firenze*
Sconto del 20% (circa).
Centro di prenotazione: 055 284722/294687.
Convenzione Viva Hotels/Società Chimica Italiana.

Sconti con case editrici

- *Licosa Libreria Commissionaria Sansoni SpA*
Sconto 20% sui soli testi stranieri.
Convenzione 001700/PG.
Tel. 055 645415 (FI) e 02 3272513 (MI).
- *Piccin Nuova Libreria SpA*
Sconto 20% presentando la tessera di socio Sci.
Tel. 049 655566 (PD).

Riviste della biblioteca Sci "Francesco Selmi"

Ricordiamo ai soci che è possibile, facendone richiesta alla Sci, ricevere le fotocopie degli articoli delle riviste sotto elencate con il solo addebito delle spese:

- *Soviet Journal of Coordination Chemistry* *
 - *Journal of Organic Chemistry of the USSR* *
 - *Journal of General Chemistry of the USSR* *
 - *Journal of Analytical Chemistry of the USSR* *
 - *Kinetics and Catalysis* *
 - *Doklady Chemistry* *
 - *Bulletin of the Academy of Sciences of USSR Division of Chemical Sciences* *
 - *Biochemistry* *
 - *Journal Prikladnoj Chimii* **
 - *Chimija Gheterociklicheskich Soedinenij* **
 - *Polish Journal of Chemistry* °
 - *Latvijas PSR Zinatnu Akademijas Vestis* °°
 - *Latvijas Zinatnu Akamemijas Vestis - Fizikas un Tehnisko Zinatnu Serija* °°
 - *Latvijas PSR Zinatnu Akademijas Vestis - Kimijas Serija* °°
- * traduzione in inglese dal russo; ** edizione in lingua russa; ° edizione in lingua inglese; °° edizione in cirillico.

Tutte le informazioni relative alle convenzioni

possono essere richieste a:

Società Chimica Italiana - Ufficio Soci

Viale Liegi, 48/c - 00198 Roma.

Tel. 06 8549691 - Fax 06 8548734