

● **Ci siamo spesso occupati** in questa rubrica di progetti integrati per la scoperta di nuovi principi attivi. Molto spesso, il campo di applicazione prescelto è stato la ricerca farmaceutica, dove metodi innovativi nella sintesi di diversità chimica (soprattutto chimica combinatoriale), metodi innovativi nella determinazione dell'attività biologica di questa diversità (sviluppo di saggi e high throughput screening) e metodi innovativi nella determinazione analitica di composti attivi in miscele più o meno complesse sono stati più volte presentati e discussi. Più in dettaglio, tempo fa avevamo discusso di un approccio utilizzando spettroscopia Nmr e metodi computazionali per l'identificazione di leganti deboli (passibili poi di ottimizzazione strutturale per aumentarne l'attività) attraverso l'uso di una ridottissima libreria di "frameworks" o "scaffolds" ad alta rilevanza farmacologia (J.M. Moore *et al.*, *Chemistry and Biology*, 1999, **6**, 755).

Oggi ci occuperemo di un altro lavoro dove la spettroscopia Nmr serve da cardine per l'identificazione di principi attivi. Uno dei gruppi leader nell'uso di tecniche di Nmr screening farmaceutiche, guidato da Fesik e operante in Abbott, ha riportato un interessante esempio di scoperta di analoghi di antibiotici aminoglicosidici a partire da una collezione di composti ed analizzandone il loro spettro Nmr in presenza di una sequenza di Rna nota per il suo legame con aminoglicosidi (Yu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4444). Questa classe di antibiotici è da tempo nota per la sua potenza e rilevanza, ma ha purtroppo anche molti problemi legati a tossicità e a resistenza di ceppi batterici; analoghi privi delle suddette limitazioni, ma

capaci di esercitare attività antibatterica attraverso lo stesso meccanismo d'azione sarebbero particolarmente importanti. La strategia di lavoro adottata dal gruppo in questione è riportata in Figura 1. I 10.000 composti "proprietary" scelti, o collezione C1 (Figura 1), contengono probabilmente molecole piccole e passibili di ottimizzazione strutturale semplice, cioè a dire rappresentanti di scaffolds la cui sintesi (o addirittura l'acquisto di analoghi commercialmente disponibili) è semplice. C1 è poi raggruppata



Figura 1

a: miscelazione di C1 (10 composti per campione, 1.000 miscele per screening);  
b: screening (0,5 M per composto in miscela, 50  $\mu$ M RNA 29-mero,  $^1$ H-NMR 2D-NOESY);  
c: screening individuale dei componenti nelle miscele attive;  
d: ottimizzazione strutturale (sintesi classica o combinatoriale di analoghi)

in 1.000 miscele di 10 composti cadauna (a, Figura 1) e sottoposta a screening di attività. Quest'ultimo (b, Figura 1) avviene incubando ogni miscela di C1 con un 29-mero di Rna corrispondente ad uno dei motivi di binding più importanti e conosciuti degli antibiotici aminoglicosidici, il cosiddetto A-site Rna di *E. coli* (bacterial ribosome 16S decoding region aminoacyl-tRna site). La regione dei protoni ammidici di questo 29-mero è stata caratterizzata totalmente, ed ognuno dei segnali ammidici dei 14 residui G od U (effettivamente contenenti un residuo ammidico) è stato attribuito. Per questa ragione, se nessuna variazione di chemical shift immidico è osservata in presenza di una miscela se ne deduce che nessun componente della miscela stessa interagisce con l'Rna e perciò la miscela è scartata; se, al contrario, lo shift di alcuni fra i protoni ammidici del 29-mero è modificato la miscela contiene almeno un composto interagente con l'A-site Rna. I dieci membri della miscela vengono quindi analizzati singolarmente (c, Figura 1) e il composto attivo viene identificato. Tra gli altri hits identificati in prima battuta le strutture 1 e 2 (Figura 2) meritano un poco d'attenzione. La loro affinità è misurata in termini di costante di dissociazione dall'oligomero di

Rna, osservata attraverso la riduzione e la scomparsa dell'effetto di shift sui protoni ammidici. Entrambe le strutture sono semplici e rappresentano dei chemotipi molto flessibili, la cui decorazione (d, Figura 1) può teoricamente portare a prodotti più potenti ed in grado di rivaleggiare con gli aminoglicosidi in termini di efficacia. La sintesi di alcuni semplici derivati aminochinolinici ha portato alle due strutture chiave aminiche 3 e 4 (Figura 3), poi ulteriormente "raffinate" attraverso la sintesi di piccole librerie di ammidi derivate dagli stessi composti 3 e 4. Fra queste ammidi, i composti 5 e 6 (Figura 3) si sono rilevati essere gli analoghi più attivi. Nel caso della 2-aminopiridina 2 la semplice sintesi di 6 analoghi molto simili ha identificato i composti 7 e, soprattutto, 8 come potenti leganti dell'A-site Rna da *E. coli* (Figura 4). L'analogo 8 è stato caratterizzato a fondo ed ha dimostrato una specificità elevata per lo stesso sito di legame degli antibiotici aminoglicosidici neamina e paromomicina, rispetto ai quali una potenza almeno eguale, se non superiore, è stata osservata.



Figura 2

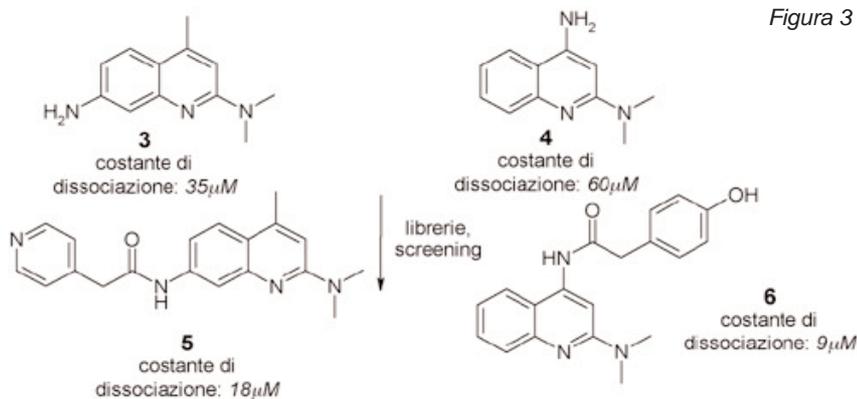


Figura 3

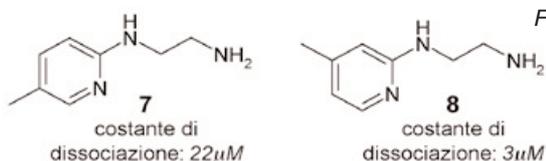


Figura 4