

# Molecole di sintesi e metaboliti microbici

## Orientamenti nella ricerca farmaceutica



di Enrico Selva

*La ricerca di nuovi farmaci basata sull'High Throughput Screening (Hts) si è orientata verso prodotti di sintesi combinatoriale, generati con criteri di diversità, di analogia con farmacofori noti e di potenziale assorbimento orale. I metaboliti microbici in passato hanno generato farmaci in diverse aree terapeutiche. La loro diversità chimica, che è distinta e complementare a quella dei prodotti sintetici, viene oggi sviluppata in alcune aziende prevalentemente biotecnologiche.*

Verso la fine degli anni Ottanta è diventato tecnicamente possibile saggiare l'attività in vitro di centinaia di migliaia di composti Hts (High Throughput Screening) e si sono diffuse tecniche di chimica combinatoriale capaci di fornire un numero di molecole adeguato alla capacità dell'Hts.

Inoltre gli sviluppi della biologia molecolare e della genomica hanno moltiplicato il numero di potenziali bersagli molecolari. Per sfruttare tutte queste opportunità, si è ampiamente adottato il processo riportato in Figura 1.

i crescenti investimenti in ricerca e sviluppo (R&D). Considerando, infatti, i costi diretti di R&D di un nuovo farmaco, e quelli delle molecole che non hanno raggiunto il mercato (*attrition rate*), le stime [1] degli investimenti necessari per generare un farmaco innovativo (*blockbuster*) sono attualmente superiori a 800 M\$ [1]. Recenti analisi mostrano inoltre che, a fronte di investimenti crescenti, il numero di nuovi farmaci lanciati sul mercato è rimasto sostanzialmente invariato nell'ultimo decennio [1]. Considerando le tipiche frequenze di succes-

gli archivi aziendali, oppure molecole sintetizzate con varie metodiche di chimica combinatoriale. In questo ambito si è assistito ad una progressiva evoluzione. Inizialmente la chimica combinatoriale ha sfruttato la sua capacità di produrre un enorme numero di molecole. In seguito, di fronte ad evidenti ridondanze nelle collezioni così generate, l'obiettivo si è spostato progressivamente verso la generazione di una maggior diversità chimica. Più recentemente si sono aggiunti criteri di *drugability*, cioè la valutazione della possibilità di trasformare la molecola selezionata nello screening Hts in un farmaco dotato di un buon assorbimento orale e una buona distribuzione nell'organismo. In questo contesto, Lipinski *et al.* hanno descritto [2] nel 1977 gli orientamenti di Pfizer. Altri modelli sono stati sviluppati in seguito [3]. Lipinski ha analizzato i dati di numerosi farmaci noti, per evidenziarne proprietà chimico-fisiche e strutturali comuni. Ha trovato che la maggior parte delle molecole divenute farmaci hanno le seguenti caratteristiche, chiamate *rules of five*, in quanto i valori soglia sono multipli di 5:

- peso molecolare inferiore a 500 Da;
- Log P (log coefficiente di ripartizione fra *n*-ottanolo e acqua) inferiore a 5;
- numero di donatori di legame idrogeno (espresso come numero di NH e OH) inferiore a 5;
- numero di accettori di legame idrogeno (espresso come numero di N e O) inferiore a 10.

Sono parametri che possono essere desunti dalla struttura con metodi computazionali e che pertanto si prestano ad orientare sia la raccolta di molecole per



### Lo screening Hts

Il composto attivo sul target viene selezionato da un'ampia collezione di molecole. Questo (hit/lead) diviene quindi la base per la sintesi di analoghi ottimizzati nelle diverse caratteristiche necessarie per generare un farmaco.

Nel periodo in cui l'Hts veniva sviluppato, il settore farmaceutico ha visto numerose fusioni e acquisizioni aziendali, finalizzate ad economie di scala, a mantenere un adeguato portafoglio di nuovi prodotti e dimensioni adatte a sostenere

so, le maggiori aziende farmaceutiche attualmente stimano che ogni anno occorrono 300 programmi di Hts per generare un portafoglio di nuovi prodotti adeguato a sostenere il loro sviluppo. Un tipico programma Hts processa collezioni di almeno 500 mila molecole.

### Caratteristiche delle molecole sottoposte a Hts

Esaminiamo da dove vengono e che caratteristiche hanno le molecole che fanno parte di queste collezioni. L'orientamento dominante è verso molecole di sintesi. Tipicamente sono composti prodotti per scopi eterogenei e raccolti ne-

E. Selva, Vicuron Pharmaceuticals - Gerenzano (VA). eselva@vicuron.it

l'Hts sia l'ottimizzazione dell'hit/lead. In pratica, molecole che non soddisfano due o più caratteristiche della *rule of five* vengono valutate negativamente dalla Pfizer [4]. Prima di queste linee guida, le molecole selezionate dall'Hts in Pfizer tendevano ad avere pesi molecolari e valori di Log P troppo elevati. Lipinski osserva infatti che gli incrementi in affinità al target vengono generalmente ottenuti mediante inserimento di gruppi lipofili correttamente posizionati

di screening nell'area antinfettiva e antitumorale. A questa categoria appartengono inoltre farmaci affermati in altre aree terapeutiche come lovastatina (ipocolesterolemico), tacrolimus, ciclosporina, sirolimus (immunosoppressori), acarbose (metabolismo), che sono metaboliti microbici divenuti farmaci affermati. È stato inoltre riportato che il 40% delle strutture di base presenti nei prodotti naturali sono assenti nell'attuale chimica medicinale [8].

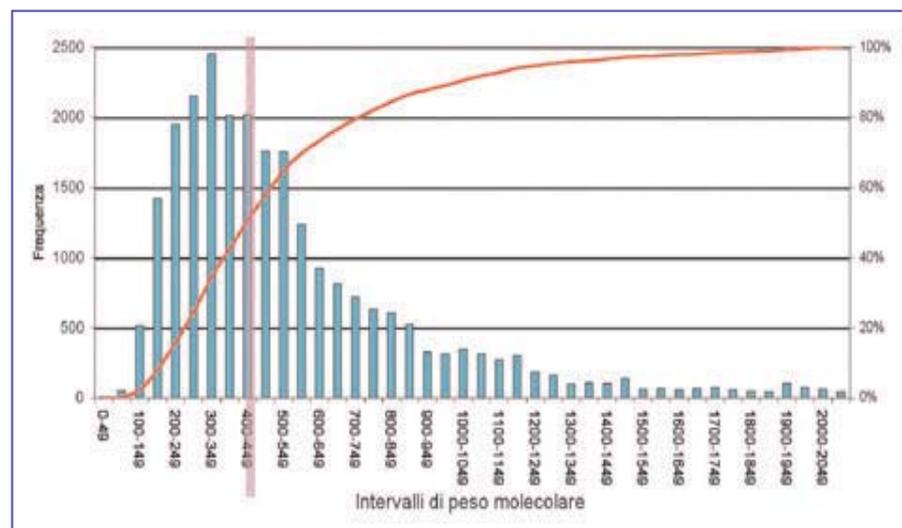


Figura 2 - Pesì molecolari dei metaboliti microbici conosciuti

per occupare le tasche recettoriali [2]. Le molecole così disegnate tendono inevitabilmente a scostarsi dai limiti di Log P e peso molecolare della *rule of five*. Recenti approcci di screening si dirigono su strutture con peso molecolare basso (intorno 200 Da) da ottimizzare con un successivo lavoro chimico. Queste strutture "privilegiate" sono selezionate sulla base dell'attitudine di *binding* a proteine o come frammenti ricorrenti in farmaci noti [5, 6].

Il futuro indicherà quali di questi approcci sarà più produttivo. È da rilevare tuttavia che recenti analisi sulle cause di insuccesso nei progetti Hts indicano nel 49-75% dei casi la mancata identificazione di un lead promettente [5, 7] e questo sembra evidenziare la necessità di miglioramenti nelle collezioni di molecole da sottoporre ad Hts.

### I metaboliti microbici

Un'alternativa ai prodotti della chimica combinatoriale è rappresentata dai metaboliti microbici che, fin dagli anni Cinquanta, sono stati con successo ogget-

Per la loro origine biosintetica, infatti, i metaboliti secondari frequentemente contengono centri di asimmetria, hanno strutture macrocicliche e sono densi di gruppi funzionali.

La loro diversità strutturale deriva dalla biochimica combinatoriale operata durante 3 miliardi di anni di evoluzione dei microrganismi sulla terra.

Possiamo confrontare alcune caratteristiche dei metaboliti microbici alla luce della *rule of five*. Esaminando un database (Vicuron Pharm.) di più di 31 mila metaboliti microbici con attività biologica descritti in letteratura, risulta che il 50% delle molecole note ha peso molecolare inferiore a 450 Da (Figura 2).

Nella nostra esperienza sulla ripartizione dei metaboliti microbici in solventi tipo *n*-ottanolo-acqua, la maggior parte delle molecole hanno valori di Log P bassi o negativi. Inoltre, nelle loro dense strutture ci sono legami idrogeno intramolecolari. Secondo Lipinski un singolo legame idrogeno intramolecolare può dare un incremento di dieci volte in permeabilità [4]. I metaboliti microbici non sono pertanto fuori dalla *rule of five* in assoluto. Lipinski stesso ha inoltre

considerato la *rule of five* troppo semplificata per le loro strutture complesse [4]. Questa complessità costituisce la vera sfida/opportunità. Anche il processo Hts presenta intrinseche complicazioni quando applicato ai metaboliti microbici. Questi, infatti, sono prodotti come miscele complesse, il che rende incerto il risultato dei saggi di attività.

Tuttavia con le moderne tecniche analitiche e di saggio biologico è possibile identificare la molecola bio-attiva anche in miscele complesse e stabilirne le macro-caratteristiche (peso molecolare, polarità ecc). Solo successivamente si arriva alla determinazione della struttura e alla possibilità di farne dei derivati con metodi chimici. Sfruttando tuttavia la ricchezza degli estratti microbici e applicando forte stringenza in fase Hts è generalmente possibile scoprire molecole con buone caratteristiche biologiche e sgravare pertanto il lavoro successivo di ottimizzazione.

Per realizzare tutto questo è ovviamente necessario un team di ricercatori con competenze in molteplici settori della chimica e della biologia. La maggior parte di questi gruppi si trova attualmente in aziende biotecnologiche.

### Conclusioni

La tendenza delle maggiori industrie a perseguire la via della sintesi combinatoriale le ha indotte a interrompere i programmi di screening di prodotti microbici. Tuttavia negli ultimi anni sono sorte compagnie biotecnologiche che si focalizzano sulla diversità chimica dei metaboliti microbici che è, in ultima analisi, distinta e complementare a quella dei prodotti di sintesi.

### Bibliografia

- [1] S. Walker, CMR International (www.cmr.org).
- [2] C.A. Lipinski *et al.*, *Advanced Drug Delivery Review*, 1997, **23**, 3.
- [3] D. Butina *et al.*, *Drug Discov. Today*, 2002, **7**, S83.
- [4] C.A. Lipinski, *ibid.*, 2003, **8**, 12.
- [5] R. Carr, H. Jhoti, *ibid.*, 2002, **7**, 522.
- [6] G. Muller, *ibid.*, 2003, **8**, 681.
- [7] CMR International, Discovery benchmark, Survey of 2000 data.
- [8] L. Muller-Kuhrt, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 602.