

Nell'appuntamento odierno voglio occuparmi di due articoli che, in diversa maniera e con diverso scopo, si sono occupati di problematiche sempre attuali nella ricerca di nuovi farmaci da parte, fra gli altri, di chimici farmaceutici.

Il primo lavoro (Y. Zhu *et al.*, JACS, 2005, **127**, 858) si occupa di elucidare il meccanismo d'azione di alcuni inibitori della "inducibile nitric oxide synthase", o iNOS, accomunati dalla presenza di una funzione ammidinica. Il primo inibitore (**1**, Figura 1) è un prodotto naturale, mentre il secondo (**2**, Figura 1) è un prodotto sintetico.

Entrambi i prodotti sono stati caratterizzati come inibitori causanti inibizione irreversibile di iNOS, ma entrambi, dopo aver così inattivato l'enzima, vengono recuperati intatti! L'asserzione degli Autori,

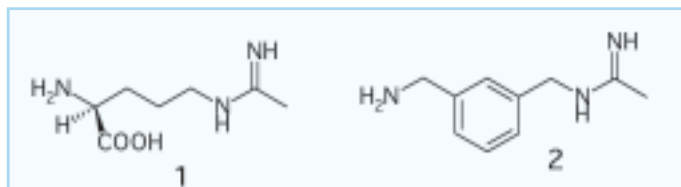


Figura 1

rivendicanti per questi composti l'unicità di tale meccanismo d'azione, mi ha incuriosito e convinto a parlarne qui, sebbene l'argomento non sia strettamente legato a nuove tecnologie.

L'apparente mistero è stato risolto determinando che l'inattivazione avviene attraverso la modificazione covalente del cofattore di iNOS, e cioè della molecola dell'eme (**3**, Figura 2), che viene convertita in uno dei quattro isomeri del derivato biliverdina, quello denominato α (**4**, Figura 2; per quelli β , γ e δ , vedi pure Figura 2). Il meccanismo con cui la degradazione dell'eme a biliverdina α avviene è simile a quello con cui l'enzima eme ossigenasi catalizza la stessa reazione; ciò ha permesso sia di determinare l'esatto meccanismo di inibizione di **1** e **2**, e di verificare che, comportandosi essi alla stregua di residui attivi nel sito dell'eme ossigenasi, al termine della reazione inibitoria non vengono alterati.

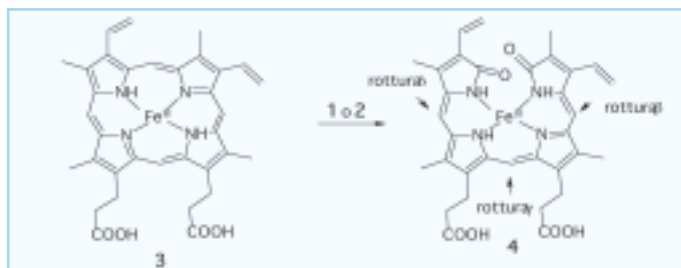


Figura 2

Il secondo articolo (J.R. Huth *et al.*, JACS, 2005, **127**, 217) si occupa di un argomento già trattato in questa rubrica, e cioè dei cosiddetti falsi positivi che rallentano il lavoro del chimico farma-

ceutico nella ricerca di un principio attivo dopo un saggio di attività biologico. Falsi positivi possono essere originati da un'infinità di ragioni: estrema reattività (aspecifica) del composto, prevenuta attraverso filtri di reattività che eliminino composti contenenti funzionalità troppo reattive; effetti sinergici fra composti originanti attività non riconducibili ad un singolo composto, prevenuti attraverso saggi di attività su discreti piuttosto che su miscele; fenomeni di aggregazione sopramolecolare fra più molecole di un composto, prevenuti attraverso la definizione attenta del protocollo sperimentale del saggio d'attività prescelto.

Pur osservando tutte le precauzioni appena citate, ogni saggio biologico ad alta capacità (diciamo, che misuri l'attività di oltre 50 mila composti) resta soggetto a rischi: se consideriamo una frequenza di positivi (ragionevole) dell'1%, avremo 500 positivi fra i quali certamente si annideranno svariati falsi positivi senza alcuna attività sul bersaglio biologico. Se, malauguratamente, i chimici farmaceutici inizieranno a lavorare sulla struttura di uno di essi, potranno perfino passare vari mesi prima che con certezza si possa determinare la natura di falso positivo per questi composti e per la loro classe strutturale: tempo e denaro sprecato, per non parlare della frustrazione dei ricercatori coinvolti!

Gli Autori in questione hanno riportato un metodo chiamato ALARM NMR (da "A La Assay for Reactive Molecules"), che utilizza la spettrometria NMR ed una proteina chiamata La antigene. Gli Autori, nel corso di un saggio di attività su questa proteina come potenziale bersaglio terapeutico, si accorsero di una frequenza di positivi estremamente alta (circa 7% dei 10.000 composti testati). Usando la spettrometria NMR, i positivi vengono definiti come composti che provocano alterazioni nello spettro dell'antigene; con analisi più dettagliate, in questo caso essi risultarono tutti "aspecifici" (ad esempio, interagenti con tioli cisteinici attraverso alchilazione, od ossidazione, ecc.). Sorprendentemente, nessuno dei circa 700 positivi fu confermato essere un vero positivo, e così fu anche ampliando la collezione fino a 50.000 composti.

Questi risultati chiaramente provano due cose: in primis, inibitori specifici dell'La antigene sono molto difficili (se non impossibili...) da identificare; in secondo luogo, la stessa proteina può funzionare come una sonda molto sensibile per identificare composti aventi attività aspecifiche a volte anche imprevedibili. Ne consegue che gli Autori abbiano deciso di utilizzare l'ALARM NMR come pre-saggio, e con esso di essi eliminino routinariamente da ogni collezione di composti tutti quelli che danno interazione con l'La antigene. Esaminando in dettaglio i risultati da loro citati nel lavoro, sembra di poter dire che il saggio abbia un significativo effetto di riduzione di falsi positivi nel corso di campagne di saggi biologici.