



HIGHLIGHTS TECNOLOGIE INNOVATIVE

a cura di Pierfausto Seneci - Dipartimento di Chimica organica - Università di Milano

Ognuno di noi chimici farmaceutici, che combattiamo da anni con molecole attive biologicamente allo scopo di renderle dei candidati clinici biodisponibili e tollerabili, ha una o più aree terapeutiche di interesse; meglio ancora, ha delle classi di bersagli/target molecolari o di meccanismi patologici che conosce a menadito, e che quindi segue con grande interesse. Ciò vale pure per me, ed ho quindi pensato di "usare" biicamente un mio pallino, allo scopo di mostrare come le tecnologie moderne (e aggiungerei anche la maniera di porsi del chimico farmaceutico/medicinale moderno nei confronti delle discipline biologiche) influenzino ogni aspetto collegato con malattie di grande rilevanza, e come poi informazioni acquisite nel campo specifico siano "riutilizzate" per generare nuovi progetti ed applicazioni in campi diversi, e spesso pure non affini a quello originale.

L'aggregazione di materiale proteico a dare polimeri insolubili e tossici, con particolare riferimento alle malattie degenerative del sistema nervoso centrale in generale e al morbo di Alzheimer in particolare, è un settore molto studiato ed affascinante.

Aloysius Alzheimer nel 1906 caratterizzò il morbo omonimo per la presenza contemporanea di placche extraneuronali (proteina β -amiloide, composta dal peptide A β) e di ammassi neurofibrillari intraneuronali (composti da proteina tau iperfosforilata). Da allora questi due poliaggregati proteici "patologici" sono stati ritenuti essenziali per lo sviluppo e la progressione della malattia, e quindi hanno rappresentato un target meccanicistico a tutt'oggi (purtroppo) non ancora colpito con efficacia da farmaci in commercio.

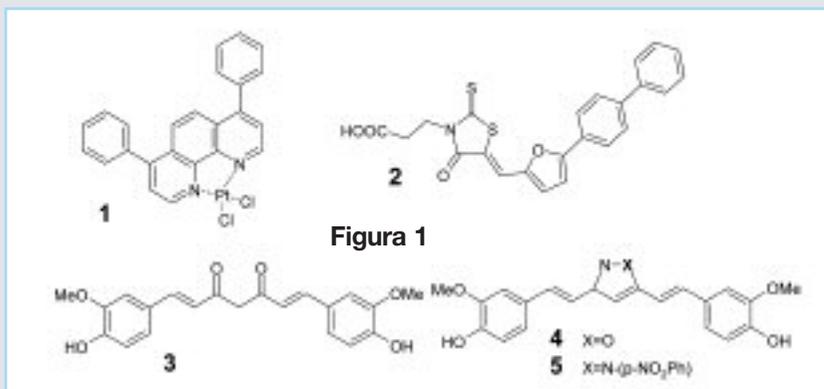
Nonostante polimeri di A β peptide e tau siano noti da più di un secolo, ancora fioccano studi di ricerca di base, atti a dimostrare come essi partecipino alla patologia di Alzheimer; questi studi sono resi possibili dall'enorme progresso di discipline bioanalitiche e dall'uso di strumenti chimici per rendere rilevabili certi fenomeni molecolari. Ad esempio, tecniche di imaging molecolare su topi transgenici hanno permesso di fare luce sulla sequenza di formazione e sviluppo di una singola placca di amiloide, studiandone la dipendenza da, e l'influenza sul microambiente tissutale circostante, ivi inclusi altri segnali di neurodegenerazione

e cambiamento neuronale (B.T. Hyman *et al.*, *Nature*, 2008, **451**, 720); tecniche di marcatura fluorescente di tau come tale e di alcuni suoi frammenti, e successivo imaging molecolare permettono di verificare come il binding "fisiologico" di tau ai microtubuli neuronali regoli il trasporto di materiali promosso da proteine "motrici", quali le kinesine, per cui alterazioni patologiche/distacco dai microtubuli/aggregazioni di tau provocano alterazioni potenzialmente neurodegenerative del trasporto neuronale (E.L.F. Holzbaur *et al.*, *Science*, 2008, **319**, 1086).

La natura di questi polimeri è costantemente studiata, sia per meglio capirne la formazione, che per identificare la, o le specie più neurotossiche (che sembrano essere a tutt'oggi oligomeri solubili "transienti", piuttosto che gli aggregati insolubili trovati nei pazienti e negli animali transgenici...), che per valutarne le proprietà come materiali, o come modelli per la generazione di nuovi materiali per applicazioni industriali. Fra i vari lavori, una review che studia il meccanismo di "fibrillazione" (mi spiace, ma mi sfugge una traduzione adeguata) di peptidi, con particolare attenzione su amiloide e (in parte) tau, che illustra le tecniche analitiche atte a caratterizzare le "fibrille", che descrive addentellati meccanicistici e patologici, inclusi potenziali trattamenti con competitori-antiaggreganti peptidici e che descrive aggregati totalmente sintetici, quali nanotubi e nanogels, concepiti come nuovi nanomateriali (H.W. Hamley, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 8128). Un'altra review (I. Cherny, E. Gazit, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 4062) si focalizza sull'uso (e sul disegno razionale) di nuovi "amiloidi" come nanomateriali per (cito fra gli altri) rigenerazione tissutale, rilascio di farmaci controllato, nano valvole per controllo di microflussi, nano biosensori, nano tubi e nanofili conduttori, scaffold biomolecolari, ecc. Per finire, un lavoro (M. Baldus *et al.*, *JACS*, 2008, **130**, 5922) caratterizza la natura molecolare, e le componenti attrattive/aggregative più rilevanti, di vari aggregati di varie isoforme della proteina tau attraverso studi di spettroscopia NMR dello stato solido.

Dulcis in fundo, la scoperta e lo sviluppo di principi attivi capaci non solo di rallentare i sintomi dell'Alzheimer (farmaci sintomatici ad oggi disponibili), ma anche e soprattutto di bloccare la progressione della

malattia (ad esempio, bloccando l'aggregazione di A β peptide e/o di tau). Qui la chimica medicinale gioca la parte del leone ma, come vedremo, anche logiche più "chimico-biologico-tecnologiche" hanno dato buoni frutti. Solo qualche parola su due approcci "classici", rispettivamente ispirati dal disegno razionale di composti metallo organici contenenti Pt^{II} e capaci di inibire le proprietà neurotossiche del β -amiloide (K.J. Barnham *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**, 6813) e da una campagna di screening per inibitori dell'aggregazione di tau (H. Waldmann *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**,

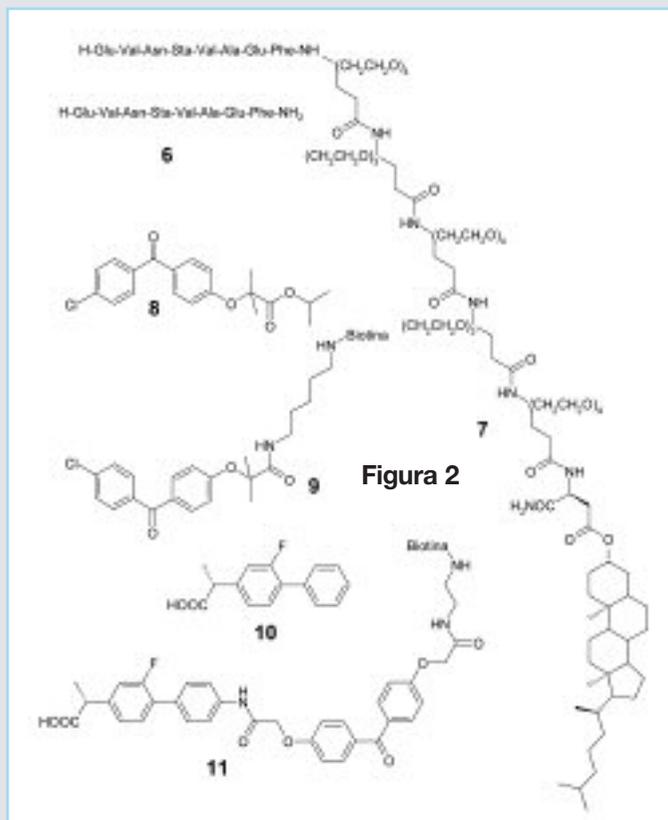


9215): entrambi i lavori illustrano le potenzialità rispettivamente di Pt-fenantroline (ad esempio **1**, Fig. 1) e rhodanine (ad esempio **2**, Fig. 1) come fonte di futuri candidati per la cura del morbo di Alzheimer. Sicuramente più intriganti sono i “multi-aggregation inhibitors” isossazolici e pirazolici (ad esempio **4** e **5**, Fig. 1) ispirati dalla struttura della curcumina **3**: nonostante le loro proprietà siano ben lungi dall’essere “drug-like”, questi composti inibiscono sia la produzione di aggregati di β -amiloide che di tau, inibendo fra l’altro la β -secretasi, uno dei target biologici più considerati nel morbo di Alzheimer, in quanto fra gli enzimi responsabili del taglio proteolitico di APP, il precursore dell’A β peptide (B. Schmidt *et al.*, *ChemMedChem*, 2008, **3**, 165).

Qualche parola in più, per finire, su due lavori più originali, derivanti da approcci chimico-biologici meno “classici”. Nel primo (K. Simons *et al.*, *Science*, 2008, **320**, 520) gli autori selezionano un noto inibitore dello stato di transizione della β -secretasi (**6**, Fig. 2) e lo connettono tramite un linker polietilenglicolico ad uno sterolo (**7**, Fig. 2). Il composto **6** non è permeabile e quindi, pur essendo un buon inibitore della β -secretasi quando testato sulla proteasi isolata, non previene la sua azione in linee cellulari; il composto **7** invece, che tramite la struttura sterolica riesce ad ancorarsi alla membrana cellulare, viene poi internalizzato nelle cellule stesse per endocitosi, e quindi inibisce la produzione di A β peptide nei compartimenti cellulari dove si trova la β -secretasi. Gli autori rivendicano questo metodo come specifico per la veicolazione di inibitori della β -secretasi *in vivo* (e verificano pure che l’attività dipenda dall’ancoraggio via sterolo alla membrana, e dalla corretta spaziatura fra sterolo ed inibitore garantita da un linker di lunghezza adeguata), e presumono che possa essere utile anche per altre proteine localizzate in compartimenti intracellulari accessibili via endocitosi.

Per finire, un esempio ulteriore di quello che gli anglosassoni chiamano “serendipity” (a voi la traduzione, più o meno edulcorata...). Parliamo ora di alcuni farmaci FANS o FANS-ispirati, quali il fenofibrato e il flurbiprofene (rispettivamente **8** e **10**, Fig. 2): questi composti, anche chiamati GSM (γ -secretase modulators), sono in grado di innalzare (**8**) od abbassare (**10**) i livelli di A β_{42} (peptide prono a fibrillare, derivante dal precursore proteico APP) interagendo con la proteasi γ -secretasi attraverso un meccanismo non elucidato chiaramente. Per chiarire il loro meccanismo d’azione, alcuni ricercatori della Mayo Clinic in USA (T.L. Kukar *et al.*, *Nature*, 2008, **453**, 925) hanno preparato derivati per marcatura di fotoaffinità quali i composti benzofenonici-biotinilati **9** e **11** (Fig. 2), e hanno eseguito alcuni esperimenti che hanno dato risultati a dir poco sorprendenti.

Nel caso di entrambi i GSM marcati **9** ed **11**, vari esperimenti con preparazioni cellulari contenenti γ -secretasi non hanno dato alcuna marcatura, indicando una non-affinità/inibizione di **9** e **11** (e quindi pure di **8** e **10**) sul target putativo. Questo target proteasico è



noto anch’esso processare il substrato APP, per produrre precursori dell’aggregato β -amiloide; stranamente, i GSM in questione non provocano effetti collaterali noti di altri inibitori di γ -secretasi, che interferiscono anche col taglio di altre proteine quali Notch e ErbB4. Alla luce di questi dati gli autori hanno esplorato l’unica possibilità rimasta, incubando i GSM marcati con l’unico altro componente all’interno di un saggio d’attività sulla γ -secretasi mirato a verificare la produzione di A β peptide, e cioè il substrato APP: sorprendentemente, si è verificato come APP sia marcato da **9** e **11**, risultando quindi essere il loro bersaglio molecolare. Questi risultati hanno probabilmente aperto un nuovo campo d’azione nell’inibizione enzimatica (inibitori agenti sul substrato, invece che sull’enzima da inibire), ed hanno permesso di chiarire appieno il meccanismo dei GSM in questione, verificandone anche un’ulteriore azione anti-aggregante sui precursori del β -amiloide.

Da umile chimico, mi permetto di dire che approcci puramente e totalmente biologici non avrebbero potuto fornire i risultati eclatanti dei due ultimi esempi; consiglieri quindi ai colleghi chimici medicinali di non disdegnare la collaborazione con biologi molecolari e cellulari, visto quanto i cosiddetti “tools” chimici di relativamente facile produzione possano essere utili sia da un punto scientifico che applicativo/industriale.