



HIGHLIGHTS TECNOLOGIE INNOVATIVE

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

Eccoci a concludere il discorso riguardo la *Fragment Based Drug Discovery*, o FBDD, di cui abbiamo già parlato alcuni mesi fa. Dopo aver descritto la tecnica, ci resta da spiegare come si misura l'affinità di frammenti chimici piccoli che, pur avendo un alto valore di ligand efficiency (LE) si legano al target biologico designato con affinità nell'intervallo millimolare-alto micromolare, inadatto a test biologici "classici" non così sensibili; e come si possa assemblare una collezione di frammenti adeguati all'approccio FBDD.

Per effettuare una campagna di screening su un target biologico di interesse bisogna avere una collezione di frammenti drug-like ed un saggio robusto che permetta di determinare la (potenziale) attività della collezione. Partiamo per l'appunto da quest'ultima: alcune recenti reviews (G. Siegal *et al.*, *Drug Discovery Today*, 2007, **12**, 1032; G.M. Rishton, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, **12**, 340; S.D. Bembenek *et al.*, *Drug Discovery Today*, 2008, **13**, 278) riportano una trattazione accurata che potremmo condensare come di seguito, e che in gran parte costituisce la cosiddetta "Regola dei 3":

- peso molecolare di ogni componente fra 150 e 300 Dalton, per essere sicuri di un'affinità misurabile (limite in basso), e di avere "spazio di manovra" nella susseguente ottimizzazione strutturale (limite in alto), che aggiunge peso all'hit iniziale;
- assenza di gruppi funzionali aspecifici/troppo reattivi (ad esempio, aldeidi e chetoni), che potrebbero dare un aumento anormale della percentuale di positivi da una campagna di screening;
- coefficiente di partizione (clogP) compreso fra 1 e 3, per avere biodisponibilità e penetrazione attraverso le membrane biologiche e al tempo stesso solubilità acquosa nei saggi biochimici, che richiedono concentrazioni millimolari per ogni composto;
- numero di accettori e donatori di legami ad idrogeno non superiore a 3, e total Polar Surface Area (TPSA) minore di 60 Å², per avere frammenti compatti e drug-like che possano dare interazioni efficienti ed efficaci col sito attivo della proteina target.

Un discorso a parte merita la numerosità della collezione da usare, che sarà molto inferiore a quella di una collezione HTS classica. Calcoli più o meno accurati hanno definito lo "spazio di diversità chimica" di molecole drug-like (quindi, di lead ottimizzati e di hits "maturi"/complessi risultanti da una campagna HTS, con peso intorno ai 5-600 Dalton) come popolato da almeno 10⁶⁰ molecole; quindi, una collezione HTS di molecole di alcuni milioni di individui ancora rappresenta un'infinitesima parte del virtualmente accessibile e potenzialmente interessante. Applicando invece i limiti per i frammenti di cui si diceva sopra, si arriva a un "virtuale" di alcuni milioni di composti contenenti O, C, N, H, S ed alogeni; e ad un numero "reale" di circa 70.000 frammenti aderenti a queste regole e commercialmente disponibili. A seconda del

tipo di saggio biochimico utilizzato (o della cascata di saggi usata), in letteratura sono usate collezioni che variano dalle poche centinaia fino alle svariate migliaia di composti (in quest'ultimo caso spesso testate come piccole miscele di 5-10 composti); è chiaro come ciò semplifichi i problemi logistici di stoccaggio della collezione, e soprattutto il costo per assemblarla.

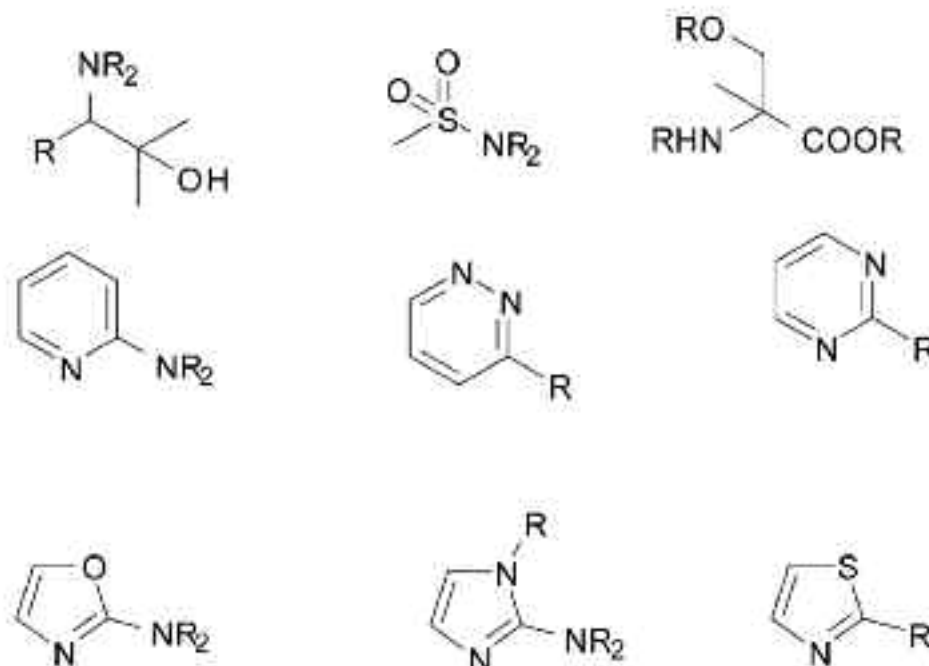
Per finire sull'argomento, una Figura (vedi pagina a fronte) dove riporto alcuni esempi di frammenti raccomandati da varie fonti.

Niente di speciale, o ignoto, vero? Questo è proprio il punto: come dicono gli inglesi "smaller is better", ed è meglio far crescere i composti attivi da frammenti piccoli, compatti e versatili, piuttosto che ottenere da campagne di screening HTS hits anche potenti, ma complessi, da ottimizzare in seguito. Una volta capito questo, non servono miracoli o magie: l'alto numero di composti (sette, nel marzo 2007) in clinica che chiaramente sono stati ottenuti anche attraverso un approccio FBDD lo dimostra.

Finiamo con un rapido *excursus* fra i tre principali metodi di saggio biochimico usati per testare queste collezioni. Iniziamo dal primo in ordine cronologico, e cioè l'NMR. Non parliamo qui di studi che richiedano la marcatura della proteina, ad esempio con ¹⁵N, ma di esperimenti meno accurati che misurano le differenze imposte sullo spettro NMR di un potenziale ligando dalla presenza di quantità sub-stechiometriche del target biologico. In questo modo si usa poca proteina, potenzialmente preziosa; non vi sono limiti nelle proteine target utilizzabili; lo screening è veloce (circa 10 minuti per ogni esperimento); e si possono anche testare piccole miscele di composti insieme, purché i loro spettri NMR siano sufficientemente diversificabili. Con questo metodo si può testare qualche migliaio di composti senza alcun problema, e si può invece riservare un esame più particolareggiato, sempre via NMR, per gli hits risultati positivi nella campagna di screening. Nel caso vogliate approfondire, vi segnalo due review recenti (J. Klages *et al.*, *The Analyst*, 2008, **132**, 692; M. Pellecchia *et al.*, *Nature Reviews Drug Disc.*, 2008, **7**, 738) e due esempi recenti, riguardanti la scoperta di ligandi dell'acetiltransferasi AAC(6')-Ib (T. Lombes *et al.*, *ChemBioChem*, 2008, **9**, 1368) e un'applicazione originale di tecniche NMR alla scoperta di ligandi specifici per tRNA^{Lys3} (F. Chung *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 4489). Il metodo a più alta capacità, o throughput, è quello che sfrutta biosensori con rilevazione ottica dell'interazione ligando-proteina target. Fra i metodi di rivelazione usati, il più noto è la *Surface Plasmon Resonance* (SPR), molto spesso conosciuto come Biacore, dal nome del più noto rivenditore commerciale di apparecchi SPR. Le apparecchiature "classiche" permettono di immobilizzare un target biologico di interesse su una superficie metallica, e di far passare su di esso un flusso di composti verificando la loro affini-

tà per il target attraverso variazioni del segnale misurato (maggiore massa in presenza di interazioni ligando-target); una capacità di svariate migliaia di composti analizzati in 24 ore è raggiungibile, anche se solo qualitativamente (composti “attivi” vanno poi profilati singolarmente in esperimenti quantitativi). Un’interessante modifica, apportata dall’azienda tedesca Graffinity, prevede l’immobilizzazione di composti su microarrays chimici (fino a 9.216 composti per array!), e la loro incubazione con il target biologico in soluzione: oltre ad aumentare la capacità (fino a 110.000 frammenti screenati su un singolo target: che si possa coprire tutto il “fragment drug-like space” entro breve?), questo formato sembra rendere più affidabile l’intero processo. Per gli interessati, citerei una recente review (T. Neumann *et al.*, *Curr. Topics Med. Chem.*, 2007, **7**, 1630) ed alcuni esempi recenti utilizzando SPR (H. Nordstroem *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 3449; S.S. Antonysamy *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 2990) od altre tecniche di rivelazione similari e promettenti, quali l’Isothermal Titration Calorimetry, o ITC (A. Ciulli *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 4992), o una recente tecnologia basata sulla misurazione delle entalpie di reazione (M.I. Recht *et al.*, *Analyt. Biochem.*, 2008, **377**, 33).

Per ultimo, il metodo più informativo (in termini di caratterizzazione del legame fra proteina target e ligando), ed a più basso throughput (ma non tanto). Parliamo qui di cristallografia, metodo introdotto in FBDD dalla compagnia inglese Astex Pharmaceuticals (che, attraverso l’FBDD e le collaborazioni istituite con multinazionali farmaceutiche è ora divenuta una R&D pharma company di tutto rispetto, con vari composti in fase clinica) e via via sempre più utilizzato. Se confrontata con i metodi già visti, la cristallografia richiede grandi quantità di proteina target (anche se la moderna automazione, e l’uso di sistemi basati su nanogoccioline come soluzioni di cristallizzazione



Figura

ha molto ridotto i costi) e ha un limite massimo di non più di alcune centinaia di composti testabili. Il suo uso migliore, quindi, è come metodo (più) informativo nel capire sia se uno o più frammenti sono dei ligandi per un target biologico, che (più importante) nel determinare se sia anche promettente: infatti, l’analisi del cristallo proteina-frammento permette di capire se e come l’affinità per il target può essere aumentata, cioè dove si può “decorare” il frammento e con quali gruppi funzionali. È evidente come, per quanto detto, la cristallografia debba idealmente fare da metodo “secondario” per caratterizzare decine, od anche centinaia di hits derivanti da uno screening FBDD “primario” (NMR, SPR, altri metodi) che ha scremato in maniera qualitativa la collezione di frammenti disponibile. Per finire, cito anche qui sia alcune recenti reviews sull’uso dei raggi X nel FBDD (H. Jhoti *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007, **11**, 485; W.T. Mooij *et al.*, *ChemMedChem*, 2006, **1**, 827), insieme ad alcuni recenti esempi di successo (S. Howard *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 379; J.W. Huang, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 7111).