

A CURA DI SILVIA CAUTERUCCIO E MONICA CIVERA
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA
 UNIVERSITÀ DI MILANO
 SILVIA.CAUTERUCCIO@UNIMI.IT
 MONICA.CIVERA@UNIMI.IT



Modulazione allosterica: dalla casualità alla progettazione razionale

Da un punto di vista farmacologico, un modulatore allosterico, legandosi ad un sito diverso da quello (ortosterico) tipico dei ligandi endogeni o esogeni, può avere delle potenzialità terapeutiche molto vantaggiose [S. Lu, *J. Med. Chem.*, 2019, Accepted Manuscript DOI: [10.1021/acs.jmedchem.8b01749](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01749)]. È infatti un composto più selettivo, con meno problemi di tossicità e che può agire in modo cooperativo con il ligando ortosterico. Inoltre, data la diversa posizione rispetto ad un sito funzionale, può anche limitare e combattere l'effetto di *drug-resistance* dato dalle mutazioni di un sito ortosterico. Il numero di modulatori allosterici sta rapidamente crescendo, ed attualmente cinque farmaci (approvati da FDA) sono presenti sul mercato (Stati Uniti): Cinacalcet[®], Maraviroc[®] e Plerixafor[®], per i recettori GPCR, e Gleevec[®] e Mekinist[®], per le chinasi.

In questi anni, la maggior parte dei modulatori allosterici sono stati identificati in modo casuale tramite esperimenti di *high-throughput screening*. Recentemente grazie agli sforzi congiunti di studi computazionali e strutturali, la scoperta di nuovi modulatori allosterici sta cercando di sfruttare un approccio più razionale di tipo *structure-based*. Viste le diverse funzionalità e caratteristiche chimico-fisiche di questa classe di modulatori, è fondamentale lo sviluppo di software *ad hoc* [S. Lu,

Accounts of Chemical Research, 2019, **52**, 492]. Da un punto di vista computazionale, sono stati sviluppati diversi *tools* allo scopo di predire i possibili siti allosterici (Fig. 1). Oltre ad identificare la loro posizione, vista la bassa conservatività dei residui coinvolti (da cui deriva la maggiore selettività di ligandi allosterici rispetto a quelli ortosterici), anche la predizione delle possibili mutazioni e della comunicazione allosterica attivata nel *target* sono importanti aspetti che possono essere indagati *in silico*. Dal punto di vista delle proprietà chimico-fisiche, i residui di un sito allosterico risultano più idrofobici (sono molto ricchi di tirosine e isoleucine). Confrontando le caratteristiche dei composti, i ligandi ortosterici (raggruppati nel database ChEMBL, <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>, composto da circa 1,9 milioni di molecole biotivo) rispetto a quelli allosterici (circa 80.000 composti del database ASD v3.0, <http://mdl.shsmu.edu.cn/ASD/>) risultano più rigidi ed aromatici. Combinando l'informazione sperimentale (dati NMR e raggi X per circa 2.000 strutture *apo/ holo*) con *tools* bioinformatici (ASBench), nel database ASD v3.0 sono stati identificati quasi duemila siti allosterici. È stata anche sviluppata una prima piattaforma web (**AlloFinder**, <http://mdl.shsmu.edu.cn/ALF/>) che raggruppa diverse tecniche computazionali (tra cui anche specifiche funzioni di score per lo *screening* virtuale) per selezionare potenziali modulatori allosterici di un dato target.

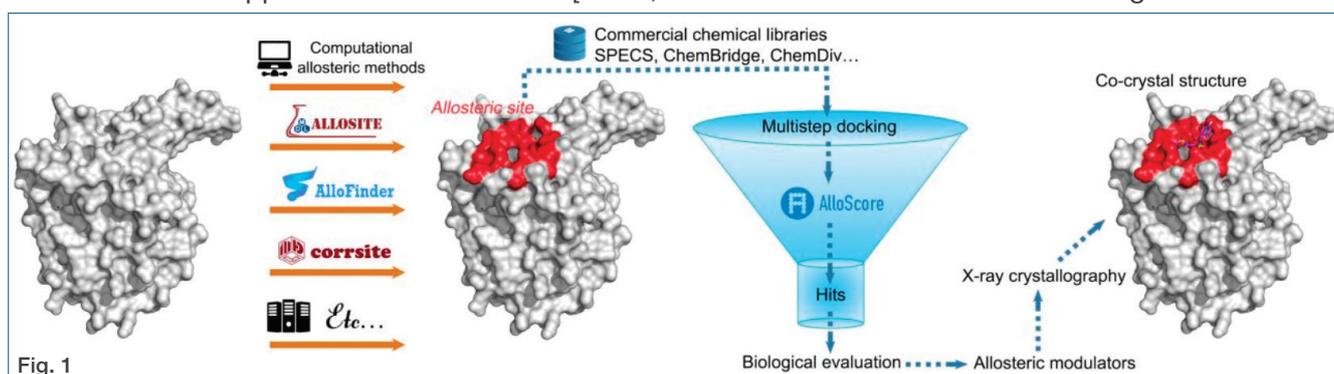
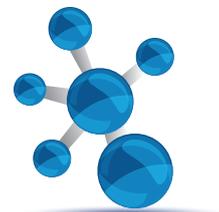


Fig. 1



Risoluzione di racemati mediante nanoparticelle magnetiche

La risoluzione di un racemo è un problema ancora oggi molto attuale, soprattutto considerando la domanda sempre più crescente di sostanze chirali enantiomericamente pure da parte dell'industria farmaceutica, nonché nella produzione di materiali per applicazioni in ottica non lineare. I metodi più comuni di risoluzione si basano su processi di cristallizzazione selettiva, impiego di enzimi e metodi cromatografici, i quali, attualmente, rappresentano la principale tecnica con cui ottenere i singoli enantiomeri da un racemo. Tra questi la cristallizzazione selettiva rappresenta certamente l'approccio più economico e che permette di lavorare su larga scala. Lo sviluppo però di processi altamente efficienti e selettivi che permettano di ottenere mediante un solo passaggio di cristallizzazione i singoli enantiomeri con resa chimica quantitativa e purezza ottica elevata è ancora un problema tutt'altro che risolto, anche nei casi più fortunati di un conglomerato, dove è presente una miscela meccanica di cristalli ognuno dei quali contenente un solo enantiomero. Le maggiori difficoltà nel separare tali cristalli sono legate alle loro dimensioni spesso piccole e con forma molto simile tra loro. Uno studio molto interessante propone la risoluzione di racemati che cristallizzano come conglomerati utilizzando delle nanoparticelle di ossido di ferro quale nano-splitter magnetici [X. Wan, *Nature Commun.*, 2019, **10**,

1964]. In questo lavoro sono state sintetizzate delle nanoparticelle (NPs) di Fe_3O_4 di dimensioni opportune (ca. 6 nm di diametro) e con specifiche proprietà magnetiche, le quali sono state poi rivestite con specie polimeriche a base di lisina o fenilalanina enantiopura. Il principio di funzionamento di queste NPs chirali può essere descritto in modo semplificato come riportato in Fig. 2. In particolare, le NPs chirali sono aggiunte ad una soluzione satura di un racemo, dove si osserva un'interazione preferenziale delle NPs nei confronti di un enantiomero rispetto all'altro, ovvero durante il processo di cristallizzazione un solo enantiomero co-cristallizza con le NPs dando vita a dei cristalli "magnetici". A questo punto la separazione dei cristalli dei due enantiomeri si effettua utilizzando una calamita in grado di rimuovere i cristalli "magnetici" di un enantiomero, il quale sarà recuperato per semplice lavaggio, permettendo così di rigenerare le NPs che potranno essere quindi riutilizzate. Le performance di questi *nanosplitters* chirali sono state valutate su racemi di amminoacidi proteogenici, quali l'asparagina e la treonina. Gli enantiomeri isolati sono stati ottenuti con ottime rese (fino al 95%) ed elevata purezza ottica (95-99% di eccesso enantiomerico). Infine, questi nanosistemi sono risultati molto stabili, in quanto per semplice lavaggio acquoso sono stati recuperati e riutilizzati per cinque volte, mantenendo sempre stessa efficienza e selettività di separazione.

