

## ***Materiale didattico di supporto***

---

Materiale delle lezioni, sarà reperibile nel minisito dell'insegnamento; è utile come traccia degli argomenti svolti, ma non sostituisce il libro di testo

**Raccomandazione importante:** Il materiale delle lezioni è riservato agli studenti UniFE ed è fatto divieto di diffonderlo in qualsiasi maniera, **potendo contenere immagini/filmati per i quali valgono i diritti di copyright.**

# Ricerca di molecole attive

Una volta stabilito:

1) la malattia da trattare e

2) il bersaglio da colpire,

la ricerca si propone di trovare un composto attivo di riferimento, il cosiddetto.

**“Lead compound”**

# Ricerca di molecole attive

Il **Lead compound** può essere definito come un  
**prototipo**

che abbia dimostrato una determinata attività biologica, potenzialmente interessante come farmaco, ma con caratteristiche che lo rendono ancora non utilizzabile come tale.

Per ottenere un vero farmaco, si deve cercare di migliorarne la struttura, tramite un processo di  
**ottimizzazione**

# Identificazione del Lead

Identificazione composti che interagiscono con il target con elevata capacità di legarsi e di produrre l'effetto desiderato.

Parametri importanti sono:

- **affinità e selettività** (legame al target),
- **potenza ed efficacia** (effetto sul target).

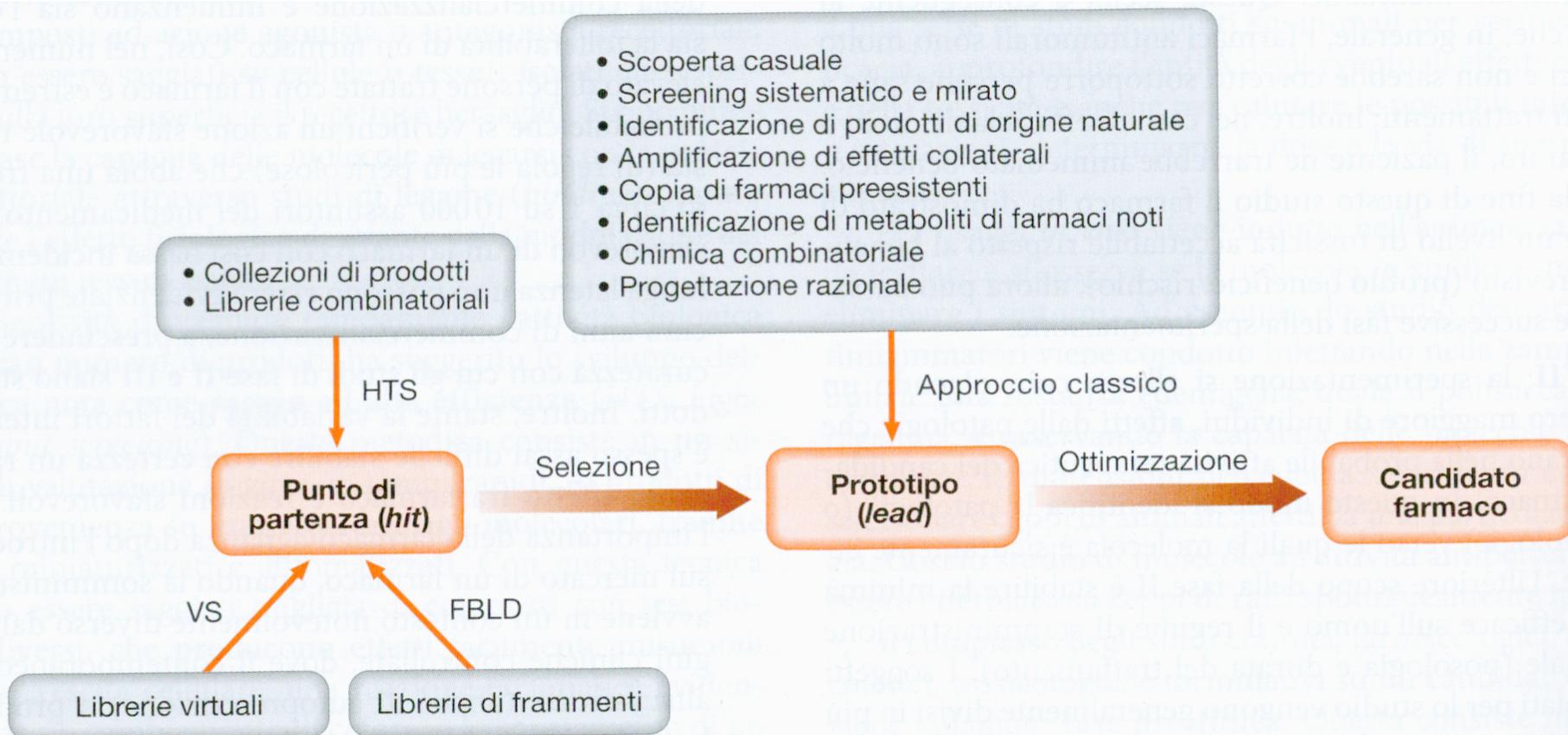
## *Proprietà relative al legame al target.*

- **Affinità**: si indica la capacità di una molecola di legarsi fortemente al suo bersaglio (target) e si misura in molarità.
- **Selettività**: capacità che un composto possa riconoscere il proprio bersaglio senza interagire con altri, anche se sono correlati ad esso.

## *Proprietà relative all'effetto sul target.*

- **Efficacia**: è la capacità del ligando di indurre un effetto sul bersaglio, in termini di risposta biochimica o fisiologica.
- **Potenza**: è inversamente correlata alla dose richiesta per produrre l'effetto desiderato. Più il farmaco è potente, minore è la dose richiesta per raggiungere la risposta voluta.

# Fonti moderne per ottenere farmaci



**Figura 7.2** Fasi iniziali della ricerca di nuovi farmaci. VS, *virtual screening*; FBLD, *fragment based ligand discovery*.

# Ottimizzazione di molecole attive

**L'ottimizzazione** della struttura del **Lead compound** può essere dedicata a migliorare:

**L'interazione col bersaglio (farmacodinamica)**

Con lo scopo di avere maggiore potenza e minori effetti collaterali dovuti a poca selettività.

# Ottimizzazione farmacodinamica

Le molecole vengono modificate cercando di **aumentare** il numero di interazioni di **legame specifico col target** (e diminuire quelle che danno legami con altri targets).

Il risultato si ottiene variando il **numero** e la **disposizione spaziale** di gruppi funzionali che danno interazioni responsabili degli effetti desiderati e degli effetti indesiderati collaterali.

# Ottimizzazione di molecole attive

L'**ottimizzazione** della struttura del **Lead compound** può essere dedicata a migliorare:

## **La distribuzione nell'organismo (farmacocinetica)**

Con lo scopo di raggiungere efficacemente il bersaglio ed essere poi eliminato in tempi accettabili e via metaboliti non tossici. Migliori caratteristiche ADME.

# Ottimizzazione farmacocinetica

Le molecole vengono modificate cercando di migliorare le caratteristiche chimico-fisiche atte ad una buona distribuzione ed eliminazione.

Il risultato si ottiene introducendo gruppi che migliorano

- la **lipofilia/idrofilia** (**logP** e **logD**),
- il **grado di ionizzazione**,
- la **velocità di metabolizzazione** e l'ottenimento di **metaboliti noti e sicuri**.

Si progettano adeguati **profarmaci**, se possibile e necessario.

# Ottimizzazione di molecole attive

Si è sempre desiderato prevedere, prima di sintetizzarla, se una molecola in fase di progetto avesse le caratteristiche di un “buon farmaco”.

Tra le caratteristiche di un farmaco ottimale vi è quella della possibilità di **somministrazione per os.**

# Obiettivo finale: Farmaco

Nel 1997, **Christopher A. Lipinski**, un chimico farmaceutico della Pfizer, analizzando una grandissima quantità di dati, ha descritto una serie di caratteristiche a cui rispondevano le strutture della maggioranza dei farmaci allora conosciuti somministrati per **via orale**: la cosiddetta **regola del 5**.

In realtà, le regole sono 4, ma contengono parametri con valori limite di 5 o suoi multipli.

# Rule of five

Molecole con:

1. Peso molecolare **inferiore a 500**
2. cLogP **inferiore a 5**
3. Gruppi funzionali in grado di donare legami idrogeno (OH, NH<sub>2</sub>, CONH, SO<sub>2</sub>NH) **inferiori a 5**
4. Gruppi funzionali in grado di accettare legami idrogeno (CO, OH, NH, SO<sub>2</sub>) **inferiori a 10**

soddisfano la regola del 5 di Lipinski.

In realtà, non occorre soddisfare tutte le regole, ma ogni scostamento diminuisce le probabilità di successo.

# Rule of five

La regola ha i suoi anni e ci sono anche importanti eccezioni (es. eritromicina).

E' però ancora un facile e ancora valido punto di riferimento quando si prova a giudicare la cosiddetta plausibilità come farmaco (“**drug likeness**”) di una nuova molecola. Ovviamente non si fa riferimento alla interazione col bersaglio in sé, ma alle sue proprietà **farmacocinetiche** e, più in particolare, **alla sua capacità di poter essere somministrato efficacemente per via orale.**

# Oltre Lipinski: Veber Rules

Le regole di Lipinski hanno diverse eccezioni, per cui altri studiosi hanno cercato di correlare proprietà positive di farmaci con le caratteristiche strutturali.

Esempio, Daniel F. Veber (GSK), per cui una buona biodisponibilità orale è stata correlata a:

- Numero di legami ruotabili minore o uguale a 10.
- Meno di 12 donatori o accettori di legame H, in totale.
- Area superfice polare (PSA) minore di 140 Angstrom<sup>2</sup>.
- Non fa riferimento al peso molecolare...

# Scoperta di un Lead

Per arrivare ad ottenere un **lead compound** occorre partire da una fonte.

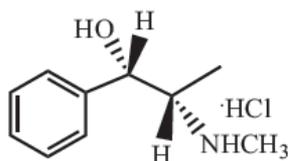
Vi sono fonti “classiche” ed altre più moderne.

Le fonti moderne fanno spesso uso di indagini sulla struttura di bersagli e ligandi con l’assistenza di software adeguati.

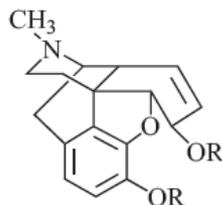
# Sorgenti di origine naturale

- L'uso di medicinali naturali ha una origine molto antica.
- Molto più recentemente, per alcuni di essi, si sono isolati ed identificati alcuni composti chimici responsabili dell'effetto terapeutico. Sono spesso dei metaboliti prodotti dalla **biochimica vegetale, fungina o microbiologica**, a volte con una struttura complessa.
- Anche fonti animali (es. tossine contenute in veleni) possono rappresentare il punto di partenza per nuovi farmaci.

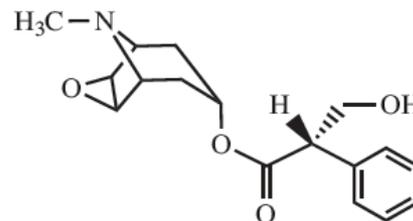
# Fonti naturali di farmaci



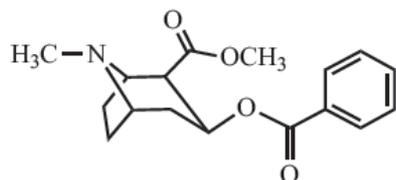
**Pseudoefedrina cloridrato**  
1.1



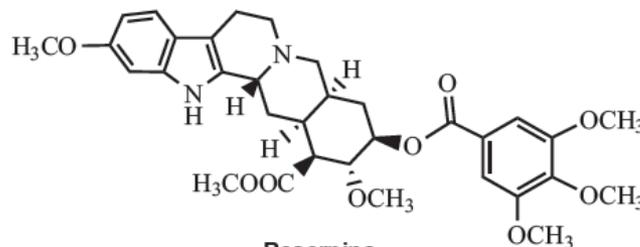
**1.2, Morfina (R = R' = H)**  
**1.3, Codeina (R = CH<sub>3</sub>, R' = H)**



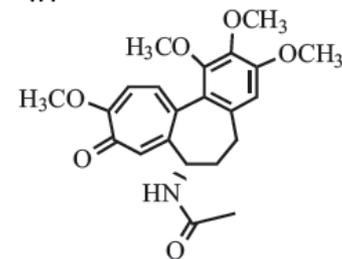
**Scopolamina**  
1.4



**Cocaina**  
1.5



**Reserpina**  
1.6



**Colchicina**  
1.7

Dalla natura, preparati con attività curative. Solo recentemente sono stati scoperti i principi attivi.

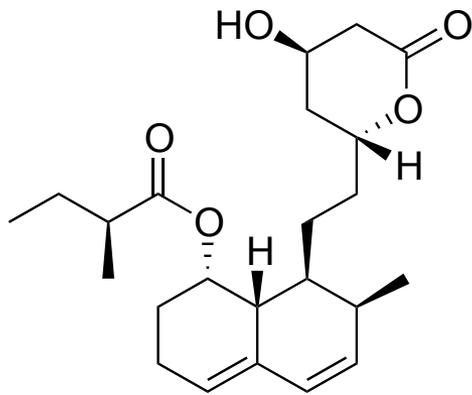
La complessità non riguarda solo le dimensioni ma anche la presenza di diversi centri chirali.

# Sorgenti di origine naturale

- La ricerca basata su queste molecole ha avuto fasi di alterna fortuna. Oggi i composti di origine naturale sono oggetto di molti studi poiché, malgrado la loro complessità, spesso danno luogo ad **interazioni ad elevata attività e specificità**.
- Molti farmaci antitumorali, antibiotici, ipocolesteremizzanti, ecc. provengono da fonti naturali.

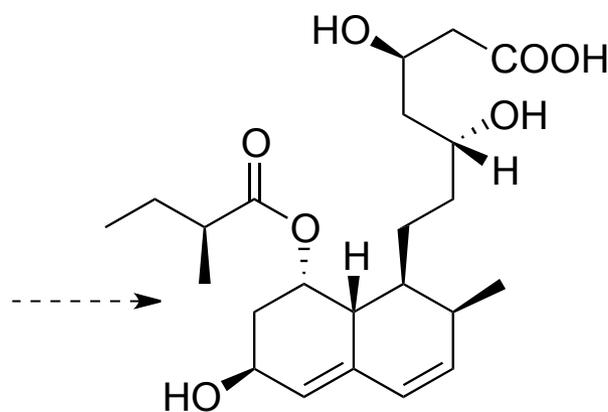
# Sorgenti di origine naturale

La classe delle Statine rappresenta potenti farmaci ipocolesteremizzanti.

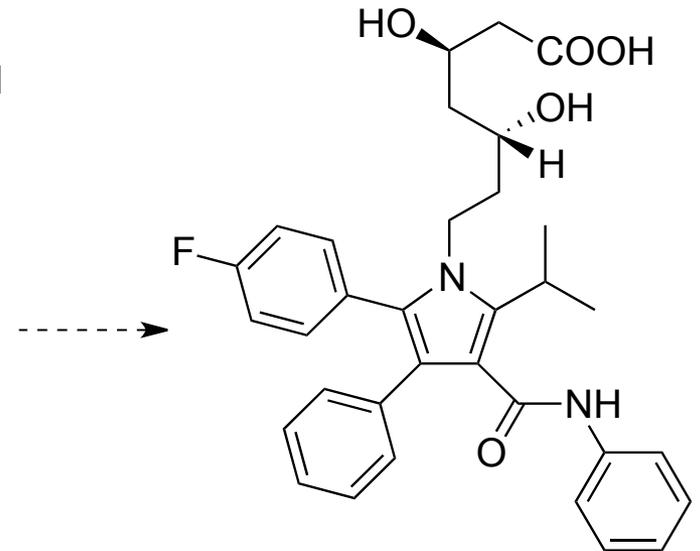


Mevastatina

Tipo I, origine naturale  
(*Penicillium* o *Aspergillus*)



Pravastatina  
(metabolita più attivo)



Atorvastatina

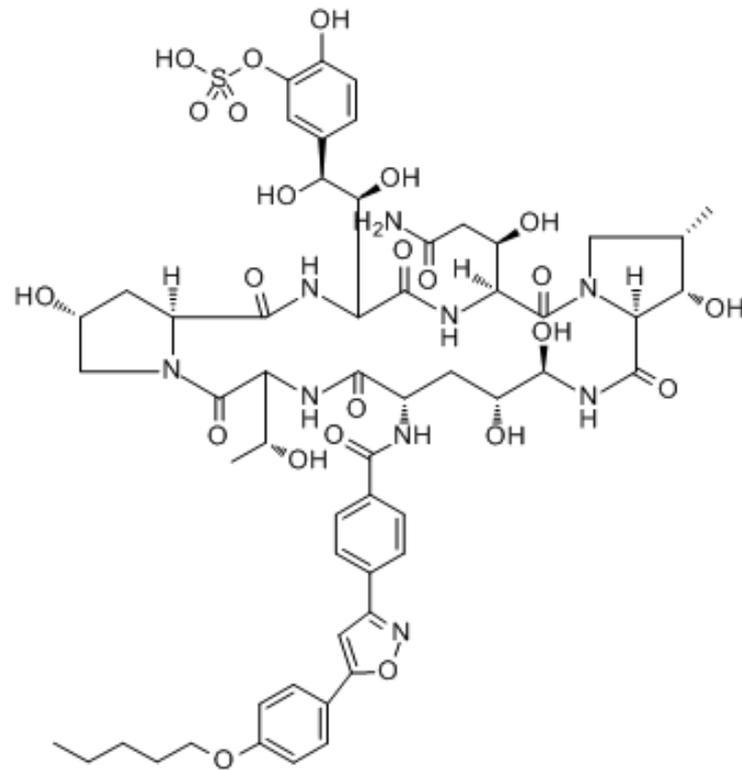
Tipo II, sintetica

# Sorgenti di origine naturale

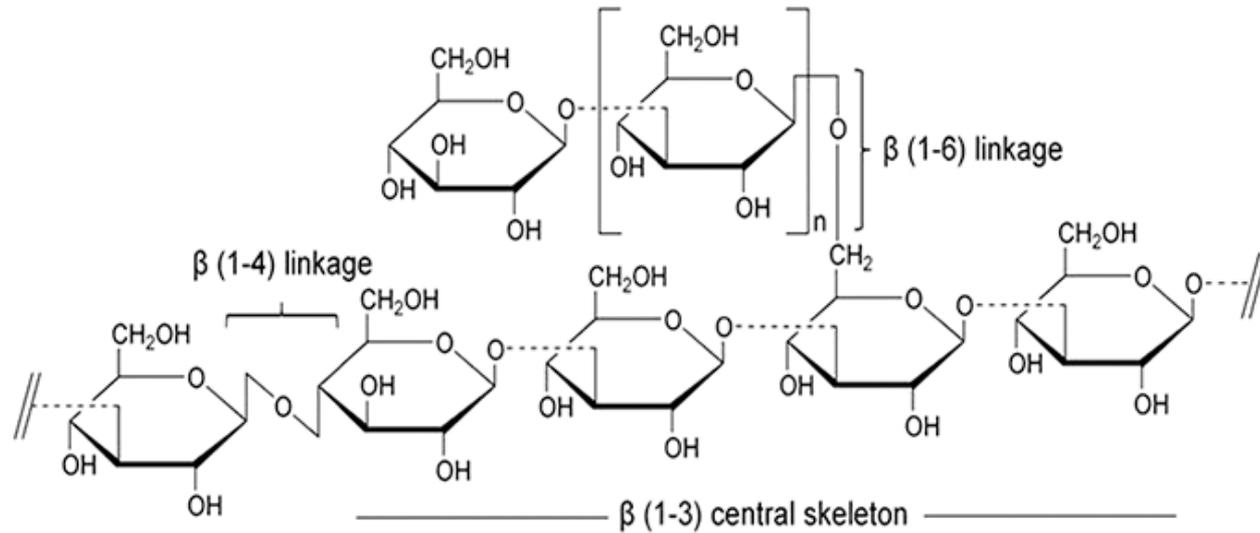
Si ottengono composti naturali, particolarmente efficaci e complessi, sviluppati nella lotta per la sopravvivenza tra diverse specie di organismi.

Il **Micafungin** (Mycamine®) è una molecola delle Echinocandine prodotta da alcuni funghi che uccidono altri funghi inibendo la sintesi di un componente essenziale della parete cellulare.

Usata per trattare le Candidosi.

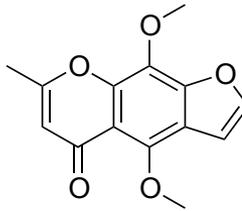


1,3 beta glucano, componente della parete di alcuni funghi (es. Candida) inibita da Micafungin

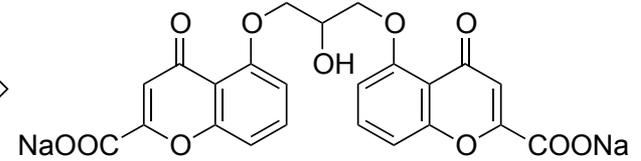


# Sorgenti di origine naturale

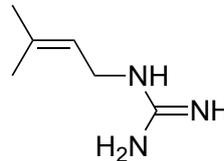
Molti compounds da cui derivano farmaci importanti sono ottenuti da fonti naturali, in questo caso **vegetali**



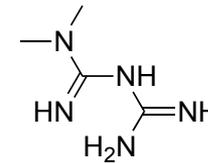
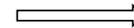
**Khellina**  
(*Ammi visnaga*)



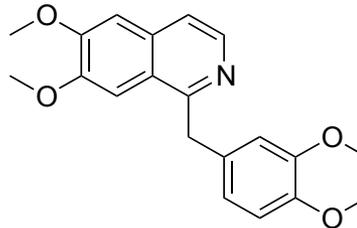
**Sodio Cromoglicato**



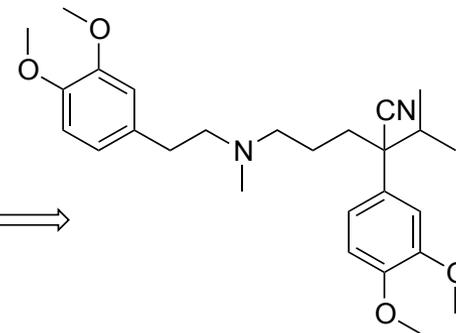
**Galegina**  
(*Galega officinalis*)



**Metformina**

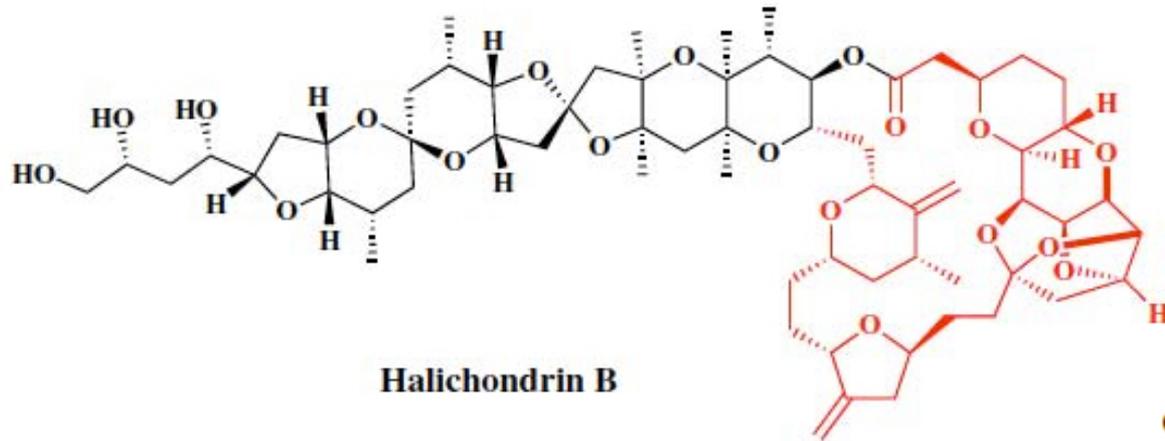


**Papaverina**  
(*Papaver somniferum*)

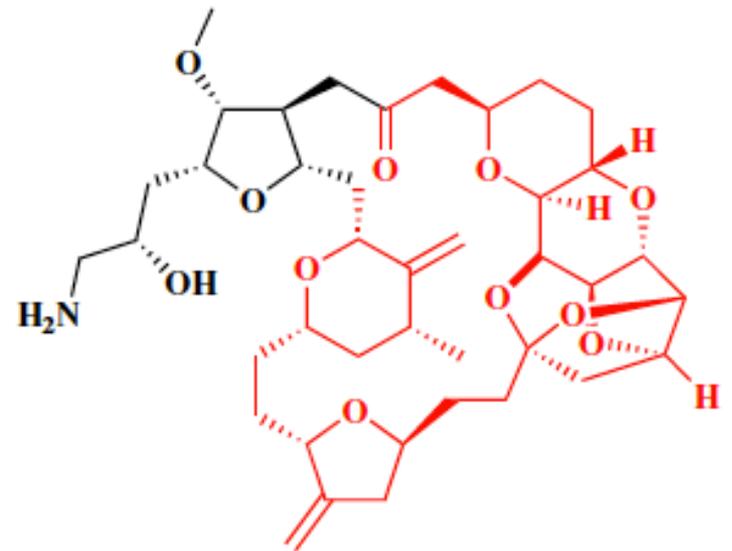


**Verapamil**

# Sorgenti di origine naturale



**Molecole da fonti marine.** In rosso la parte attiva dell'Halichondrine B (ottenuta da una spugna marina), utilizzabile per sintetizzare farmaci più semplici (Eribulina, antitumorale inibitore tubulina, Halaven<sup>®</sup>).



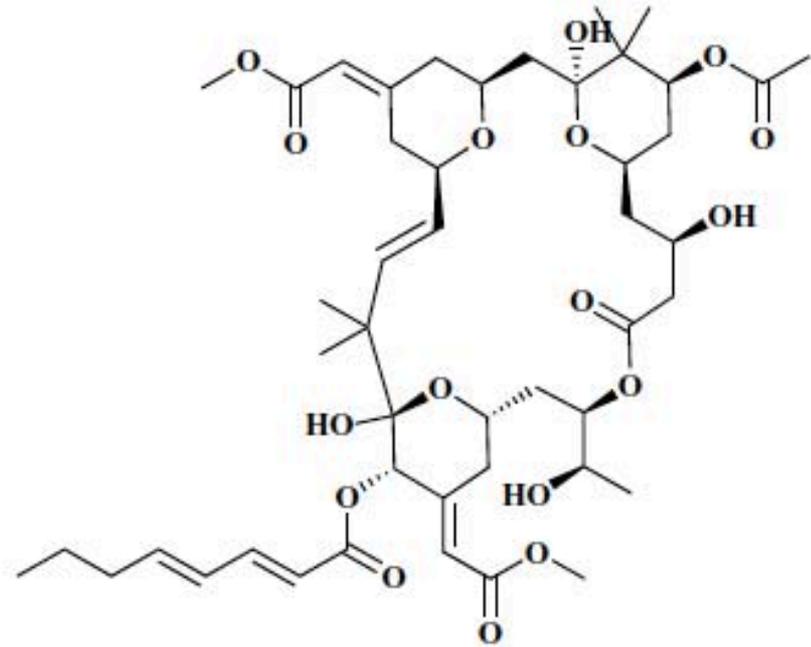
E<sub>7389</sub> (Eribulin)

## Sorgenti di origine naturale

**Molecole da fonti marine.** La Briostatina si è dimostrata di interesse nel campo degli **antitumorali**, degli **antiretrovirali** e pure nel possibile trattamento del morbo di **Alzheimer** (Fase II).

Solo di recente una efficace ma complessa sintesi chimica è stata portata a termine, superando difficoltà di approvvigionamento.

Problemi di tossicità.



**Bryostatin 1**

# Sorgenti di origine naturale

## Fattori pro e fattori contro

### **Fattori pro:**

- Sorgente di grandi quantità di nuovi composti.
- L'attività biologica associata è spesso molto elevata.

### **Fattori contro:**

- Molecole sono spesso molto complesse per dimensioni e chiralità.  
Da cui:
- Se complessi, sono difficilmente sintetizzabili in toto. Occorre estrazione da fonte naturale con tutti i limiti connessi.

### **Variabili**

- Farmacocinetica: può essere non ottimale e, per esempio, essere necessaria la somministrazione e.v. Ma spesso si trovano strutture che oltrepassano le regole del 5 mantenendo buona distribuzione.

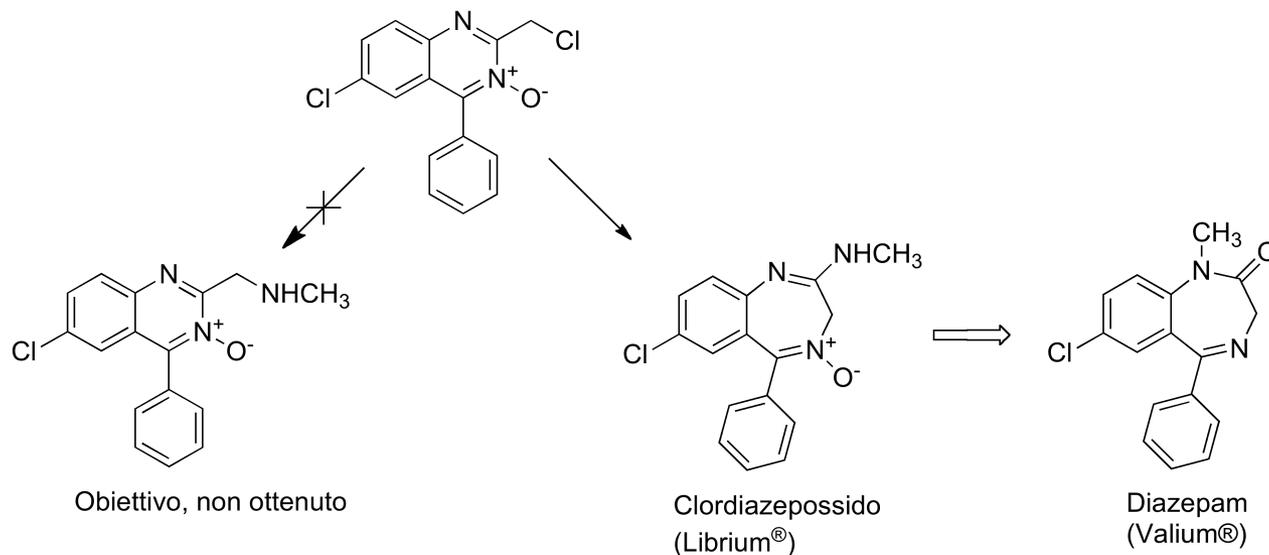
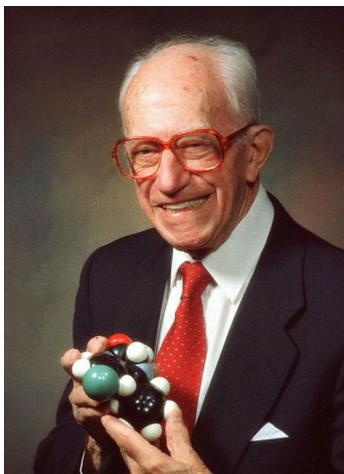
Farmaci da scoperte (più o meno) casuali.

Alcuni esempi famosi sono:

- Penicilline
- Benzodiazepine
- cis-Platino

# Clordiazepossido e benzodiazepine

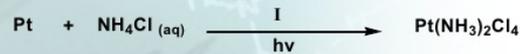
**Leo H.  
Sternbach  
(Hoffman-La  
Roche)**



# cis-Platino

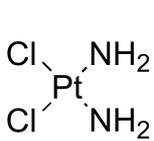
## Discovery

- Barnett Rosenberg, University of Michigan
- Cell Division/ Growth
- $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$

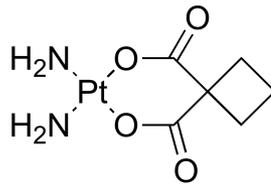


Nature 205, 698 - 699 (13 February 1965); doi:10.1038/205698a0  
Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode  
BARNETT ROSENBERG, LORETTA VAN CAMP & THOMAS KRIGAS  
Biophysics Department, Michigan State University, East Lansing.

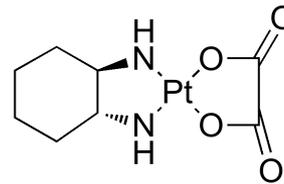
## Barnett Rosenberg



Cisplatin



Carboplatin



Oxaliplatin

# Altre fonti classiche

Fonti classiche di nuovi lead compounds possono essere i **farmaci preesistenti**.

Da essi si può procedere per:

- 1.Modifica della struttura per oltrepassare brevetti
- 2.Conoscenza e esaltazione degli effetti collaterali
- 3.Conoscenza dei metaboliti attivi
- 4.Drug repositioning o repurposing

# Modifiche di farmaci già conosciuti

Si introducono **modifiche** ad un farmaco noto, per un accesso rapido ad **un nuovo brevetto**.

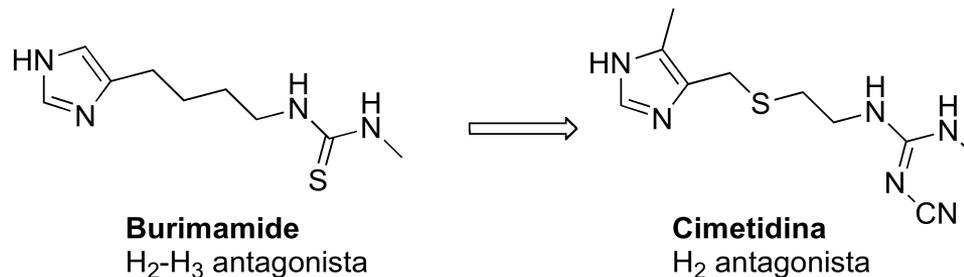
Manca di originalità, ma a volte produce miglioramenti sostanziali rispetto al farmaco copiato.

Questa strategia dà origine ai cosiddetti  
“**Me too drugs**” oppure “**Follow-on drugs**”

# Modifiche di farmaci già conosciuti



*“The most fruitful basis for the discovery of a new drug is to start from an old drug”*

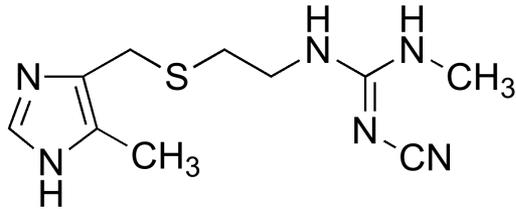


**Sir James W. Black** (1924-2010)

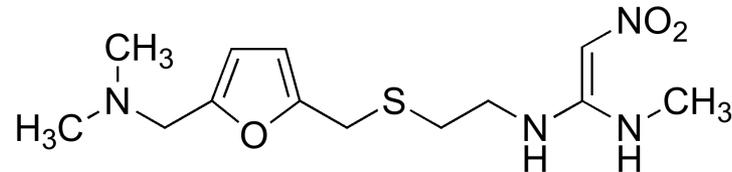
Premio Nobel per la Medicina 1988.

Scopritore, tra gli altri, dei farmaci **propranololo** e **cimetidina**

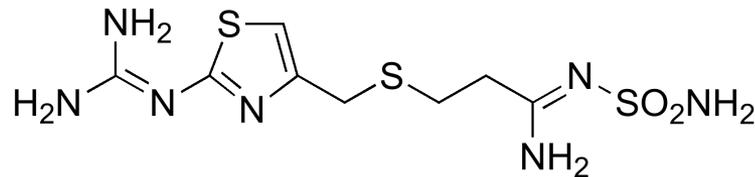
# Me too compounds



Cimetidina (SK & F)



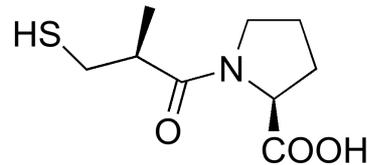
Ranitidina (Glaxo)



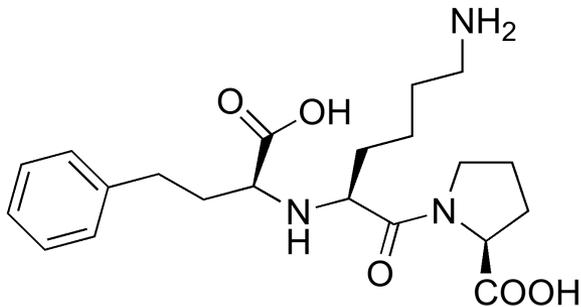
Famotidina (Yamanouchi)

Dalla cimetidina della SK&F, altre industrie farmaceutiche hanno preso spunto per produrre molecole analoghe con proprietà simili o migliori (“**Me better drugs**”). Per oltrepassare il brevetto occorreva sostituire l’imidazolo con un altro ciclo non basico, e ciò ha prodotto maggior potenza e minori effetti collaterali.

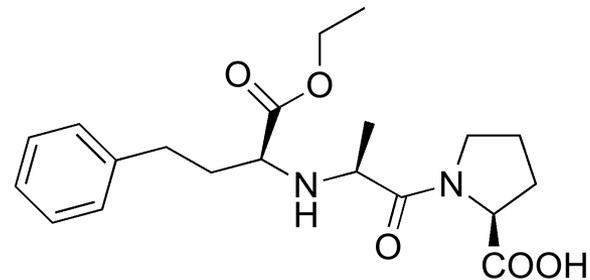
## Me **better** compounds



Captopril



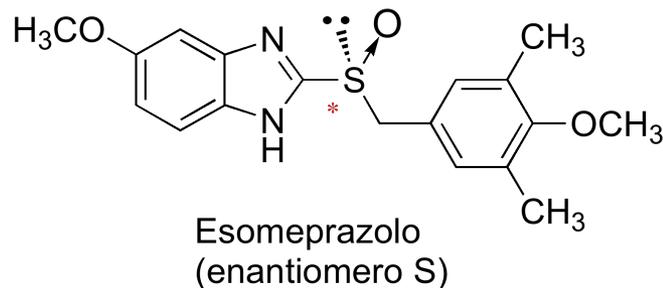
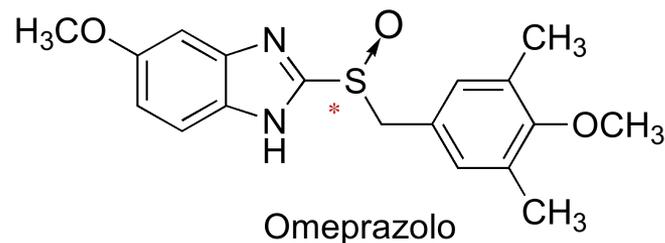
Lisinopril



Enalapril

Dal Captopril (Squibb) si sono sviluppati diversi derivati me-  
better. Non necessariamente ciò impedisce l'uso del precursore,  
il Captopril è usato ancora oggi.

## Me again compounds



Una strategia simile può consentire alla stessa ditta (nell'esempio dell'omeprazolo, la Astra Zeneca) di prolungare i benefici di un brevetto ormai scaduto o in scadenza. Qualcuno chiama questa strategia "me again".

# Me too compounds

## *Fattori pro e fattori contro*

### **Fattori pro:**

- I bersagli sono noti e validati in partenza.
- A volte, i nuovi composti sono migliori dei precedenti.
- Qualora non siano migliori in assoluto, danno origine ad una maggiore possibilità di scelta, magari utile ad una parte dei pazienti.
- Si può a volte ridare vita a brevetti scaduti.

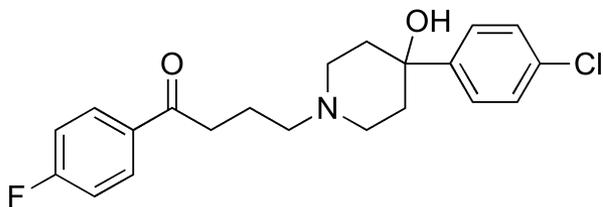
# Me too compounds

## *Fattori pro e fattori contro*

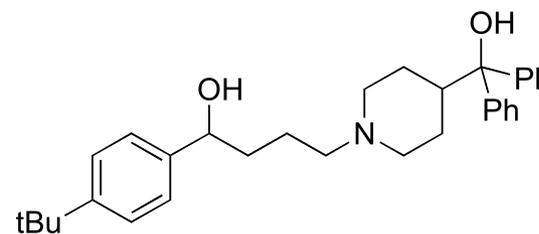
### **Fattori contro:**

- Vi è una consistente possibilità di rendere meno invitante l'investimento in ricerca di farmaci innovativi.
- Di fronte a benefici addizionali ridotti, vi è la possibilità che i rischi addizionali siano maggiori.
- Il loro valore può essere spropositato di fronte alle risorse impiegate per ottenerli, e che potrebbero essere meglio spese.

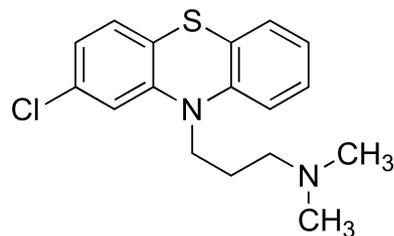
## Analoghi strutturali con differente attività



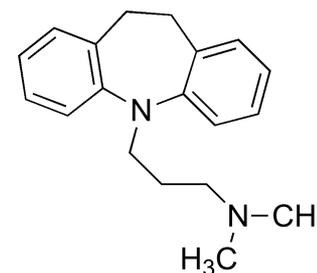
Aloperidolo  
(Antipsicotico D2 antagonista)



Terfenadina  
(Antiistaminico H1)



Clorpromazina  
(Neurolettico D2 inibitore)



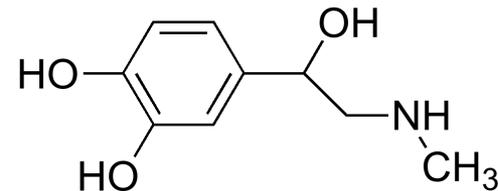
Imipramina  
(Antidepressivo, inibitore reuptake NA)

Da analoghi di un farmaco noto si possono ottenere farmaci con **attività completamente diversa**.

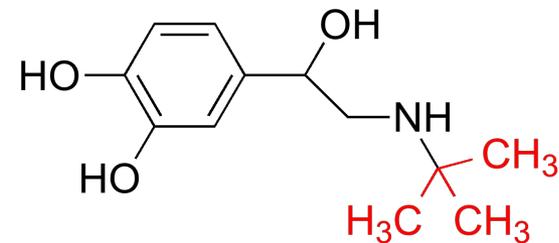
## Analoghi con differente attività

Nei farmaci che interagiscono coi recettori è facile modificare l'attività.

Si può ottenere **selettività recettoriale**, vedi dall'adrenalina all'isoproterenolo, o anche passaggio ad un recettore diverso.



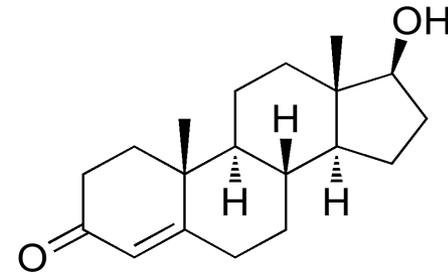
Adrenalina  
(agonista non selettivo)



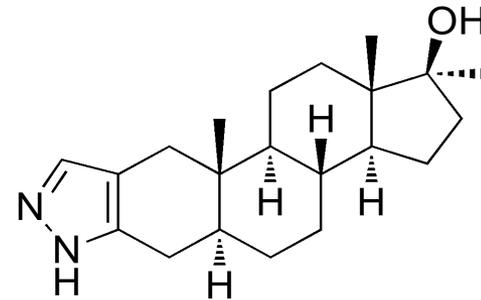
Isoproterenolo  
(agonista  $\beta$  adrenergico)

# Amplificazione effetti secondari

Dal ligando naturale testosterone, in grado di avere effetti sia androgeno che anabolizzante, si sono ottenuti derivati con il solo effetto anabolizzante

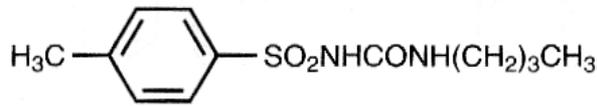


Testosterone  
(androgeno/anabolizzante)

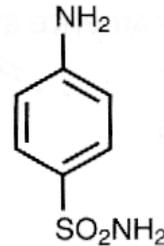


Stanozololo  
(anabolizzante)

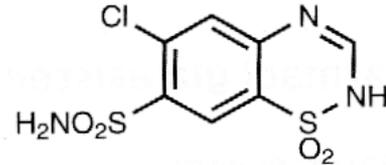
# Esaltazione di effetti collaterali



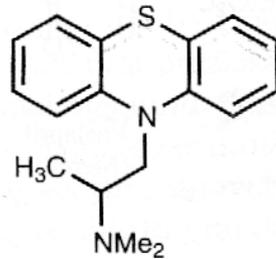
Tolbutammide



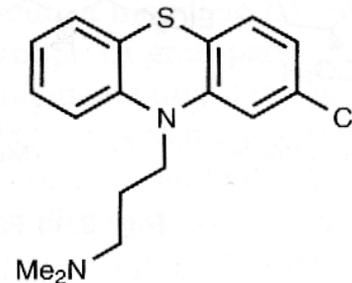
Sulfanilammide



Clorotiazide



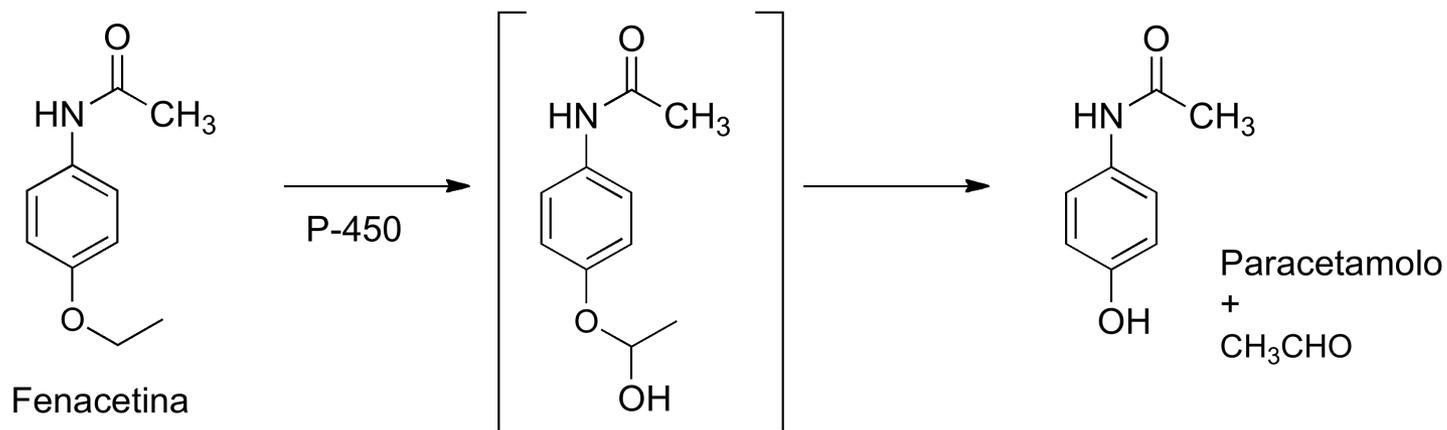
Prometazina



Clorpromazina

- Gli effetti collaterali della sulfanilammide (ipoglicemia e aumentata diuresi) e dell'antistaminico prometazina (sedazione) sono stati il punto di partenza di nuovi farmaci.

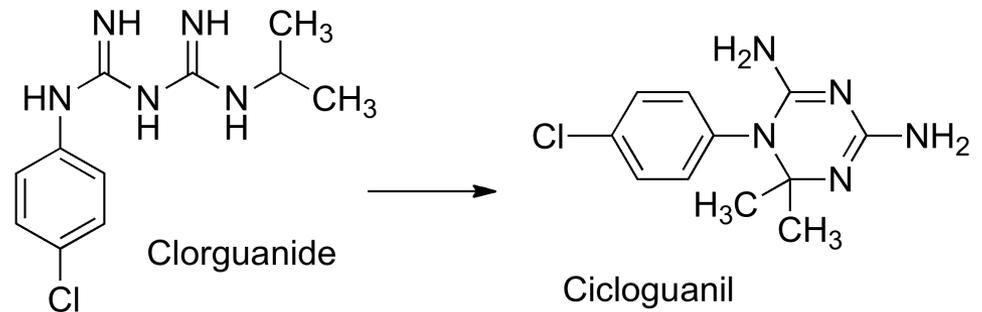
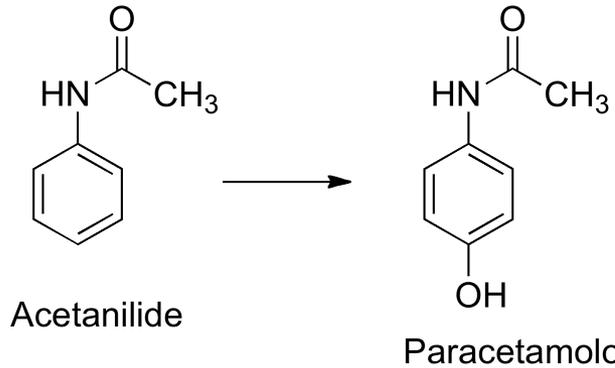
## Da trasformazioni metaboliche di altro farmaco



La Fenacetina viene metabolizzata nel suo analogo O-dealchilato. Il paracetamolo, meno tossico, ha soppiantato il precursore.

# Studio dei metaboliti attivi

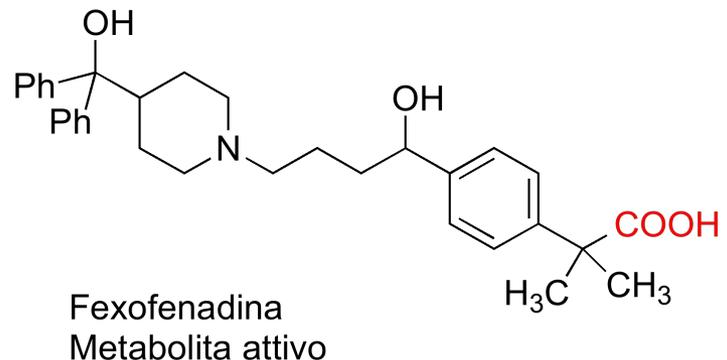
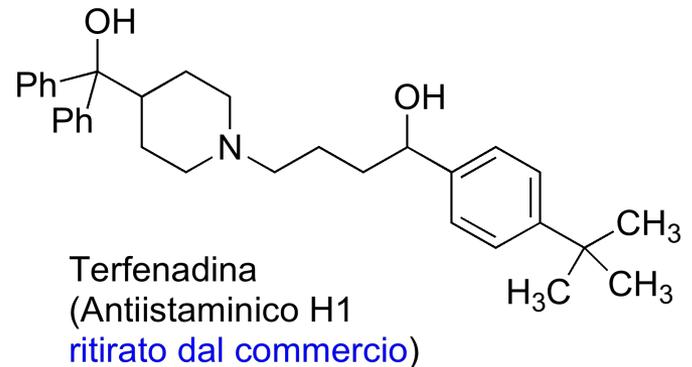
Se un metabolita di un farmaco risulta dotato ancora di attività (in genere non lo è), allora quasi sicuramente è meno tossico rispetto al farmaco progenitore.



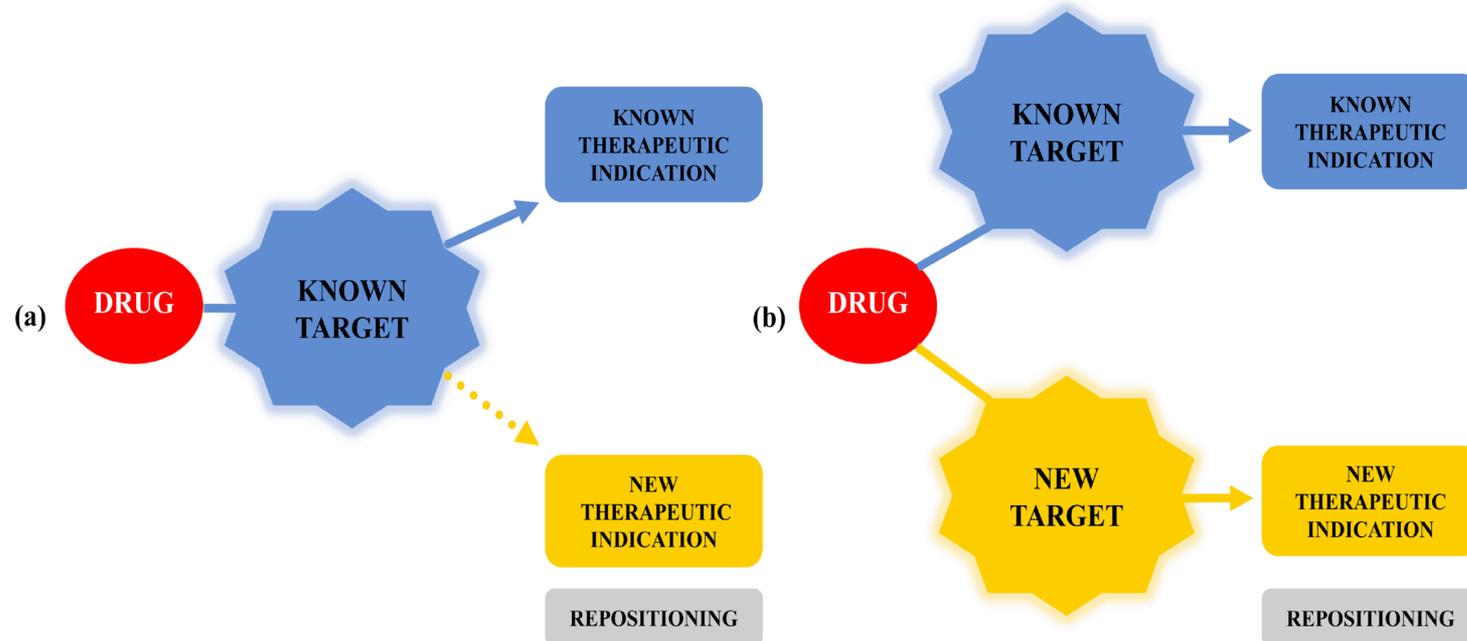
# Studio dei metaboliti attivi

La terfenadina è stata ritirata perché in grado di inibire i canali del potassio cardiaci noti come hERG, provocando aritmie, fibrillazione, arresto cardiaco e morte.

Il suo metabolita ossidativo (CYP3A4) fexofenadina mantiene attività anti H1 senza interagire coi canali hERG.



# Drug repositioning (o repurposing)



Il farmaco noto è utilizzato per uno scopo terapeutico diverso dall'originale, tramite lo stesso meccanismo (*on target*) oppure attraverso un diverso bersaglio (*off target*)

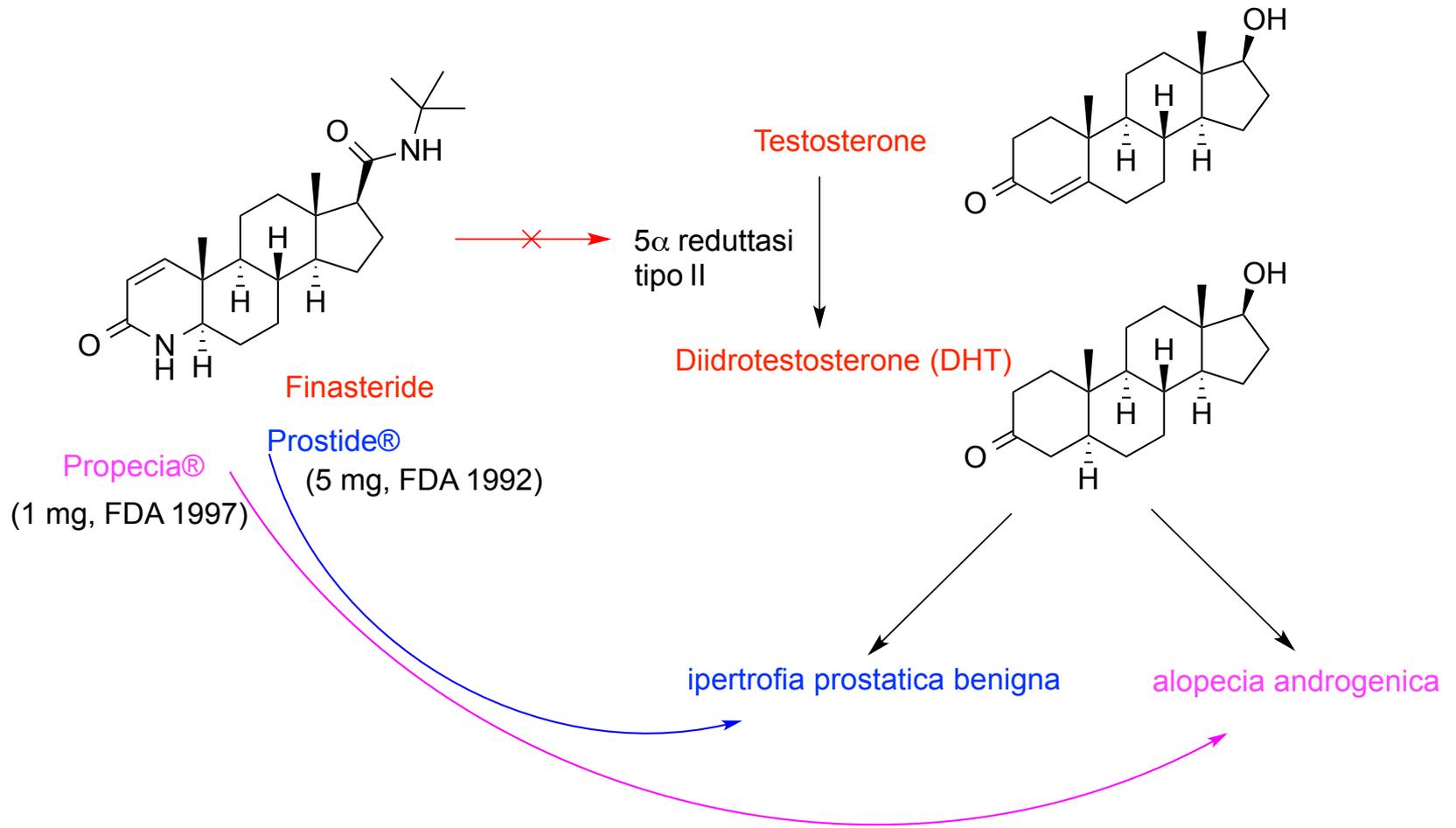
# Drug repositioning (o repurposing)

Un farmaco riposizionato *on target* è, per esempio, la **Finasteride**, inibitore della biosintesi del Diidrotestosterone (DHT) dal Testosterone.

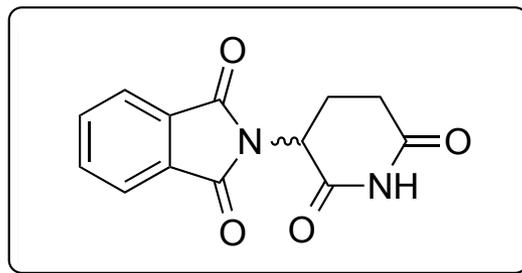
- L'eccesso di DHT prodotto a livello della prostata comporta aumentato rischio di iperplasia benigna.
- La presenza di DHT è stata anche correlata alla atrofizzazione dei bulbi piliferi e quindi alla calvizie.

Unico target (sintesi di DHT), due applicazioni.

# Drug repositioning (o repurposing)



# Talidomide: farmaco multi-target riposizionato



Azione sedativa



Originario impiego  
sedativo-antinausea

Azione teratogena



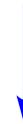
Malformazioni al feto

Azione immunomodulatoria



Trattamento noduli  
eritematosi della lebbra

Azione antitumorale

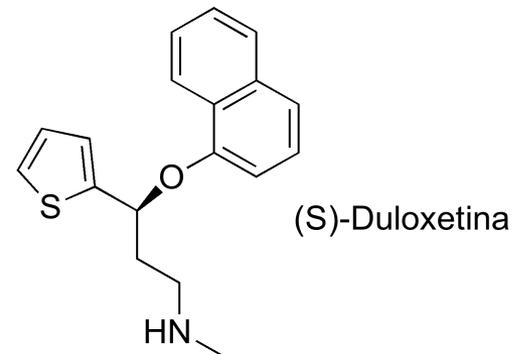


Terapia antitumorale  
(es. mieloma multiplo)

Tra i tanti meccanismi della talidomide, alcuni sono origine degli effetti collaterali, ma altri hanno permesso il riposizionamento *off target* ad altre applicazioni terapeutiche.

## Drug repositioning (o repurposing)

Alcuni antidepressivi inibitori non selettivi di reuptake NA e 5HT (NSRI) come la duloxetina hanno trovato applicazione nel trattamento del dolore cronico neuropatico.

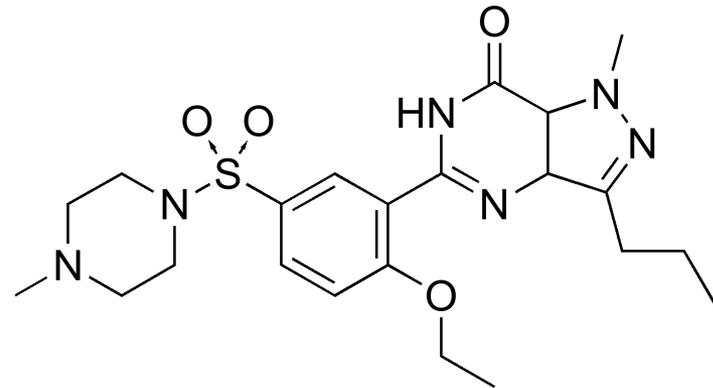


Farmaci noti utilizzati per determinate terapie e riposizionati per applicazioni differenti possono dare accesso a **nuovo brevetto d'uso**.

## Drug repositioning: effetti collaterali che diventano effetti terapeutici (e viceversa)

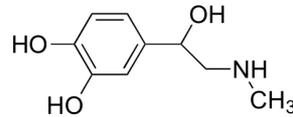
Nella ricerca di nuovi farmaci vasodilatatori utili per l'ipertensione e per l'angina, un target individuato era la fosfodiesterasi 5 (PDE-5).

L'effetto positivo sulla disfunzione erettile è diventato da collaterale a principale, e l'effetto vasodilatatore è diventato secondario.

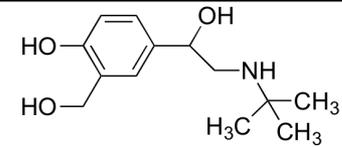


Sildenafil

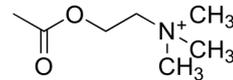
Sintesi di farmaci  
a partire dalla  
conoscenza dei  
ligandi naturali



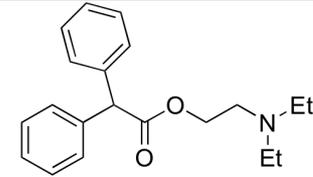
Adrenalina



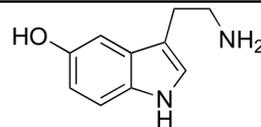
Salbutamolo  
(agonista  $\beta_2$ )



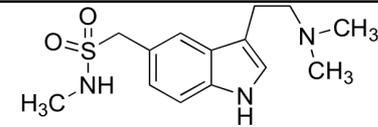
Acetilcolina



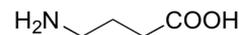
Adifenina  
(antagonista nicotinic)



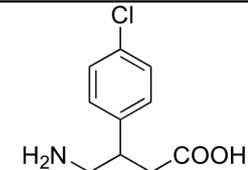
Serotonina



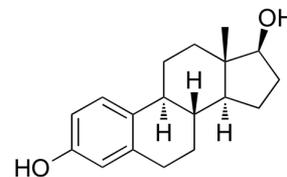
Sumatriptan  
(agonista 5HT<sub>1</sub>)



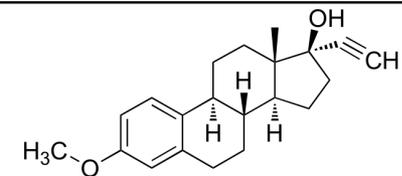
GABA



Baclofen  
(agonista GABA-B)



Estradiolo



Mestranolo  
(agonista)

## *Identificazione del Lead* per **progettazione razionale** (Rational Drug Design)

- Dalla conoscenza della struttura del **sito catalitico dell'enzima** si possono progettare **inibitori**.
- Da ligandi del recettore si può conoscere il **farmacoforo** e quindi anche antagonisti.

La **progettazione razionale** è supportata da calcoli complessi ottenuti con computer, di cui parleremo più avanti.

# Structure-based e Ligand-based drug design

- **Progettazione** di molecole in base alla struttura ai raggi X ed analisi spettroscopica della proteina e studi di modellistica molecolare (se abbiamo a disposizione quantità sufficienti della **proteina bersaglio**).
- **Progettazione** di nuove molecole attraverso una modifica chimica del substrato, ovvero della **sostanza endogena** che si lega alla proteina in esame.

# Screening di librerie di composti

Se manca l'informazione di base in grado di indirizzare una progettazione, per esempio:

- Non conosciamo ligandi o substrati noti del bersaglio di interesse.

Oppure,

- I ligandi noti sono inutilizzabili per la nostra ricerca (proteine, composti non liberi o non manipolabili), oppure cerchiamo alternative.

Potrebbe essere utile ricorrere ad uno **screening su una grande quantità di composti.**

# Screening di librerie di composti

## Screening mirato.

Lo screening ricerca composti di interesse all'interno di una **libreria molecolare** riguardo ad un **target ben definito**.

## Screening sistematico.

I composti di una **libreria molecolare** (di solito più piccola) vengono valutati **ciascuno in molti saggi differenti**, alla ricerca di un loro profilo di attività biologica **senza un target predeterminato**.

Scoperta di diverse molecole attive (**Hit compounds**)

## **Screening di librerie di composti**

**High Throughput Screening** (HTS, screening ad alta produttività) su un **archivio di composti chimici** (fonte: chimica combinatoriale, naturale, sintesi in fase liquida).

Metodo di valutazione ***in vitro***, in tempi molto rapidi, di un numero elevato di molecole diverse rispetto a numerosi bersagli molecolari.

Il risultato deve essere di facile interpretazione, es. crescita cellulare, via enzimatica in grado di produrre colorazione, spostamento di ligandi marcati radioattivamente.

# Screening di librerie di composti

Il metodo HTS funziona solo se è adatto ad essere manipolato tramite sistemi **miniaturizzati e automatizzabili**.

- **Vantaggi:** 3-400.000 molecole testate in poche settimane.
- **Svantaggi:** Risposta “on/off” (si/no) in termini di attività per il bersaglio, molecole attive chimicamente molto diverse, difficoltà nella scelta della molecola da “ottimizzare”.
- **Attenzione ai falsi positivi.** In qualche caso una risposta “on” può essere frutto di meccanismi non specifici, estranei alle proprietà biologiche della molecola.

# Screening di librerie di composti

I composti individuati **positivamente** col metodo HTS sono solitamente caratterizzati da bassa attività ed altre proprietà molto poco soddisfacenti per essere considerati un farmaco o anche solo un lead.

Questi composti con una qualche attività biologica sono denominati solo come :

## **Hit compounds**

Non tutti gli hit compounds sono però adatti ad essere presi in considerazione per lo sviluppo.

## Da “hit compound” a “lead compound” ( e a candidato clinico).....

Durante il processo di ottimizzazione di diversi “hit compounds” a “lead compounds”, i vari “hits” solitamente aumentano il loro peso molecolare e lipofilia.

Per cui un “hit compound” dovrebbe avere:

- peso molecolare inferiore a 250
- bassa lipofilia
- diverse posizioni di variabilità chimica
- sufficiente affinità e selettività

# Origine di librerie di composti

## **Librerie da archivi aziendali.**

Possono essere prese in considerazione strutture senza particolari discriminanti oppure si può fare una preselezione.

Efficaci sono composti presenti in fonti naturali (es. vegetali)

## **Librerie costruite ad hoc.**

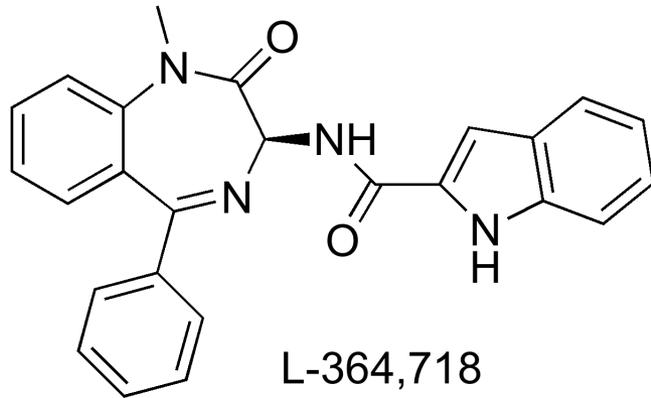
Sintesi di nuove strutture, usualmente tenendo conto di particolari “**scaffold**” su cui inserire numerose varianti.

**Librerie** possono anche essere **affittate** o **comprate**.

## Scelte da operare su librerie di composti

Se si fa una **scelta** su molecole da valutare biologicamente o, a maggior ragione, da costruire, può essere utile al nostro metro di giudizio conoscere che ci sono delle strutture note che possono dare effetti tossici, i cosiddetti gruppi **tossicofori**, ma anche strutture che ricorrono ripetutamente in molti farmaci con diversa attività, dette **strutture privilegiate**.

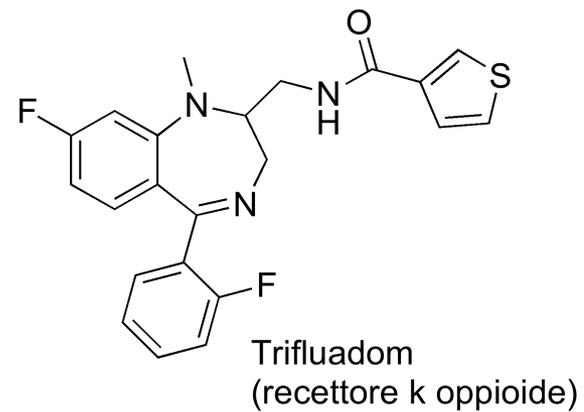
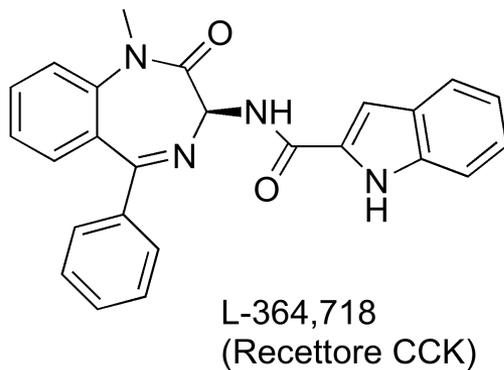
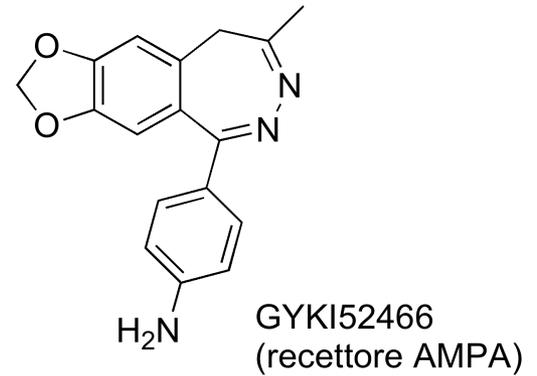
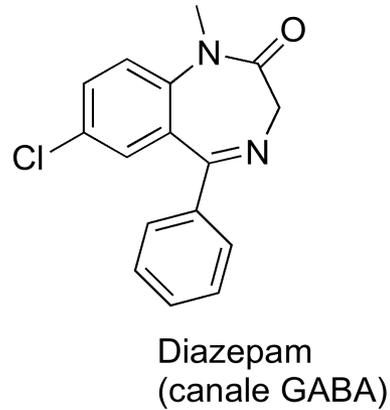
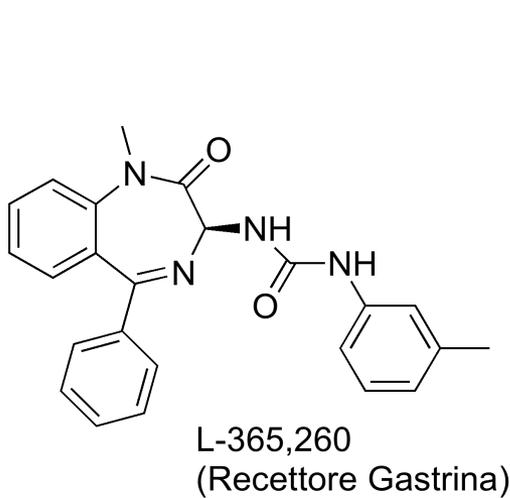
## Strutture “privilegiate”



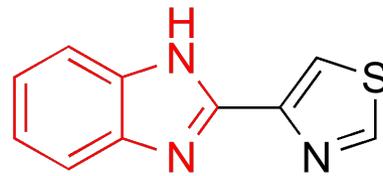
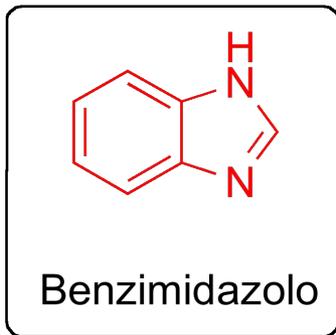
Nel 1988, B. E. Evans, un ricercatore della Merck Sharp & Dohme, descriveva delle strutture benzodiazepiniche in grado di inibire i recettori CCK (colecistochinine).  
(*J. Med. Chem.* 1988, 31, 2235)

Per primo, utilizzò il termine “privilegiato” come caratteristica di strutture (*nel suo caso l’anello benzodiazepina*) presenti in composti con diverse proprietà biologiche.

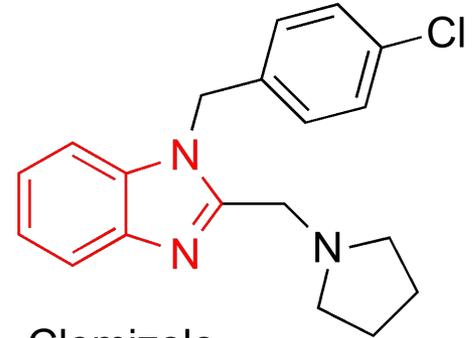
# Benzodiazepina, struttura “privilegiata”



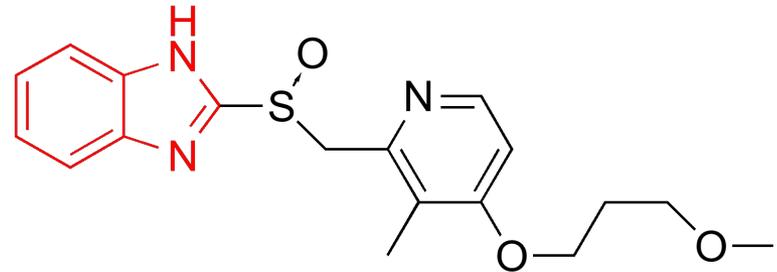
# Strutture “privilegiate” (alcuni altri esempi)



Tiabendazolo  
(antiparassitario)

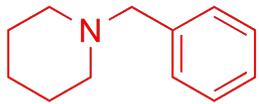


Clemizolo  
(antiistaminico)

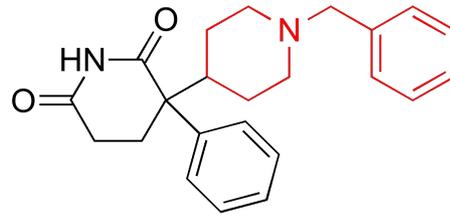


Rabeprazolo  
(antiulcera)

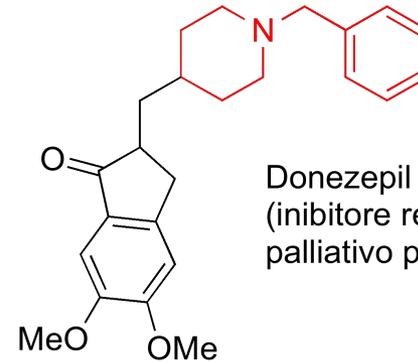
# Strutture “privilegiate” (alcuni altri esempi)



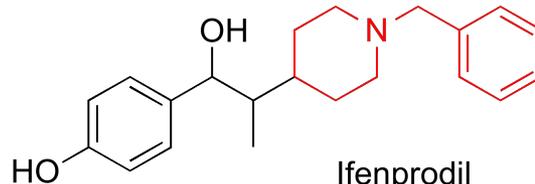
N-Benzilpiperidina



Benzetimide  
(antagonista muscarinico  
anti Parkinson)



Donezepil  
(inibitore reversibile AchE,  
palliativo per Alzheimer)



Ifenprodil  
(vasodilatatore,  
inibitore N-metil-D-aspartato)

# Strutture “privilegiate” (IUPAC)

## ***Privileged Structure:***

*Substructural feature which confers desirable (often drug-like) properties on compounds containing that feature. Often consists of a semi-rigid scaffold which is able to present multiple hydrophobic residues without undergoing hydrophobic collapse, e.g. diazepam in which the diphenylmethane moiety prevents association of the aromatic rings.*

*Pure Appl. Chem., Vol. 71, No. 12, pp. 2349±2365, 1999.*

# Utilizzo di strutture “privilegiate”

## **Pro:**

Rispetto alla ricerca su strutture non selezionate aumenta la probabilità di costruire composti hit.

## **Contro:**

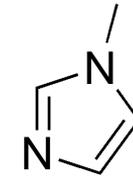
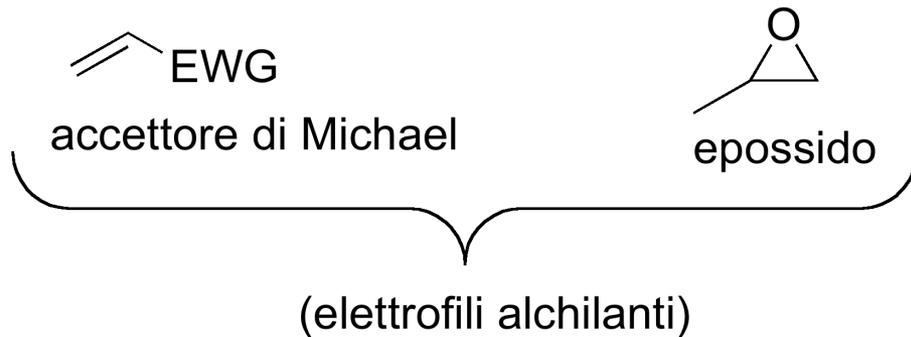
Molte strutture privilegiate sono note da tempo ed ampiamente utilizzate nella ricerca. Vi è una concreta possibilità che eventuali hits siano già coperti da brevetti oppure non brevettabili perché già descritti da altri.

## Evitare (se possibile) i gruppi tossicofori

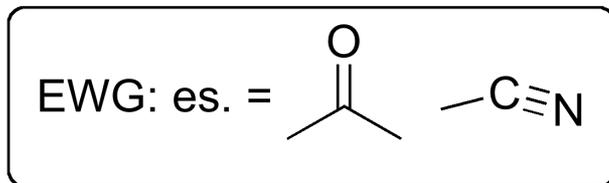
Un tossicoforo è una struttura chimica o parte di essa (es. un gruppo funzionale) correlato a effetti tossici, direttamente o dopo attivazione metabolica.

Non è sempre possibile prevedere un effetto tossico dovuto ad un gruppo funzionale, ma alcuni sono noti ed è meglio tenerne conto in fase di progettazione.

# Gruppi tossicofori diretti



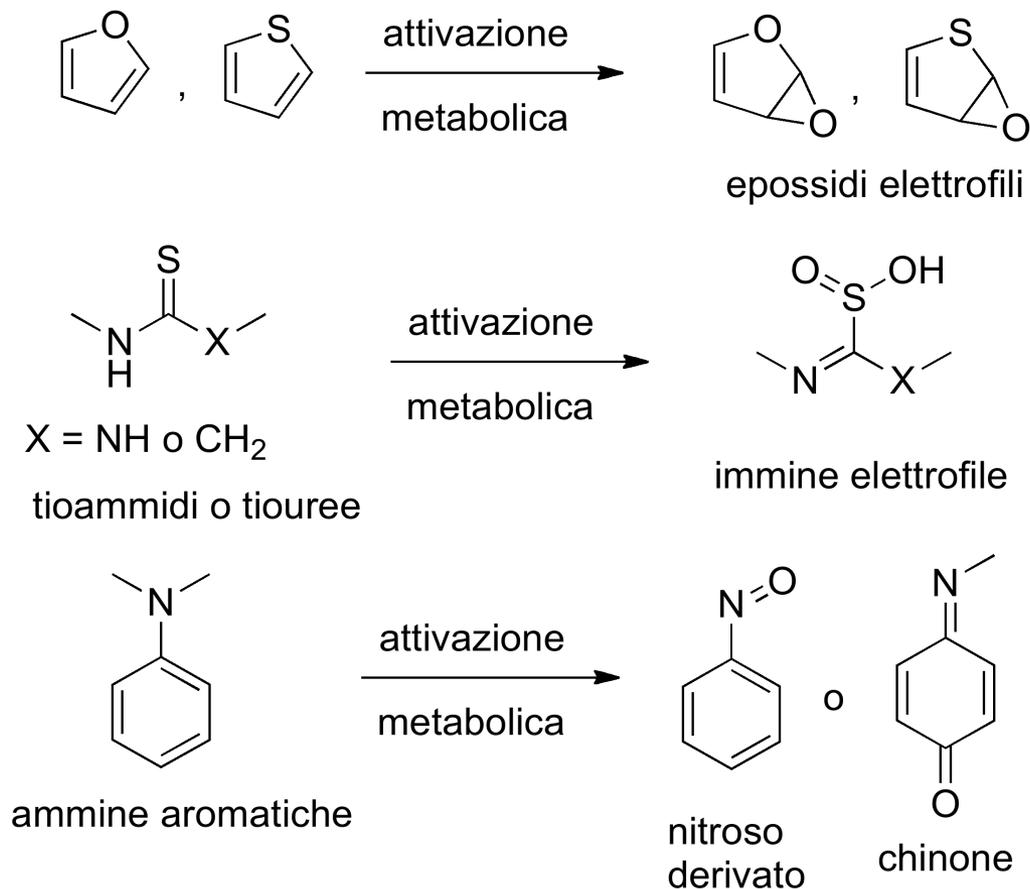
(possibile chelante di metalli)



La presenza di questo tipo di gruppi deve essere ben ponderata in una struttura da valutare come candidato farmaco

# Gruppi tossicofori dipendenti da attivazione metabolica

Altri gruppi sono noti per dare tossicità dopo una attivazione metabolica. Anche in questo caso, la loro presenza va ben ponderata.



## Librerie di frammenti

Oltre una certa dimensione, può essere molto improbabile che una molecola risulti attiva in un HTS.

Anche se avesse una parte di molecola in grado di creare un legame più o meno forte, le altre parti potrebbero essere in grado di impedirlo.

Per aumentare la probabilità di trovare un buon risultato, può essere utile rivolgersi a librerie di molecole molto piccole (120-250Da), considerate come possibili **frammenti** di un composto lead.

## Librerie di frammenti

Se usiamo piccole molecole, queste hanno il vantaggio di avere una variabilità di strutture inferiore a quelle grandi. Occorrono librerie meno popolate.

Piccole molecole possono legare con efficacia (vedi dopo) ma difficilmente hanno attività elevata. Troppo pochi gruppi che possono dare legami.

Sono però in grado di esplorare porzioni di target senza intralci.

Per valutare questo debole legame occorrono tecniche sofisticate di NMR, cristallografia a raggi X, spettrometria di massa ecc. A volte non distinguono il sito specifico di interazione.

**Queste librerie non sono adatte a HTS.**

## Valore dei frammenti

Il modo migliore per valutare l'attività dei frammenti non è la potenza, ma la cosiddetta :

**efficacia (o efficienza) del ligando**

Per efficienza del ligando (LE) si intende la parametrizzazione della forza di legame ( $\Delta G$ ) rispetto alla dimensione della molecola. Il parametro generalmente usato è il numero (N) di atomi pesanti (esclusi gli idrogeni) che compongono la molecola:

$$LE = -\Delta G/N$$

Essendo  $-\Delta G \approx -RT \ln(IC_{50})$ , andamenti analoghi si ottengono se invece del  $-\Delta G$  si usano altri parametri come  $pK_i$ ,  $pIC_{50}$  e così via.

## Valore dei frammenti

Il valore di LE indica il **contributo di  $\Delta G$  per ciascun atomo diverso dall'idrogeno.**

**Come riferimento generale**, è stato indicato un valore di LE circa 0,3 Kcal/mol per singolo atomo non idrogeno, oltre al quale è desiderabile per candidati farmaci ad uso orale (che rispondono anche alle regole di Lipinski).

Valori superiori a 0,4 sono stati associati a legami ben definiti con specifiche tasche recettoriali/enzimatiche.

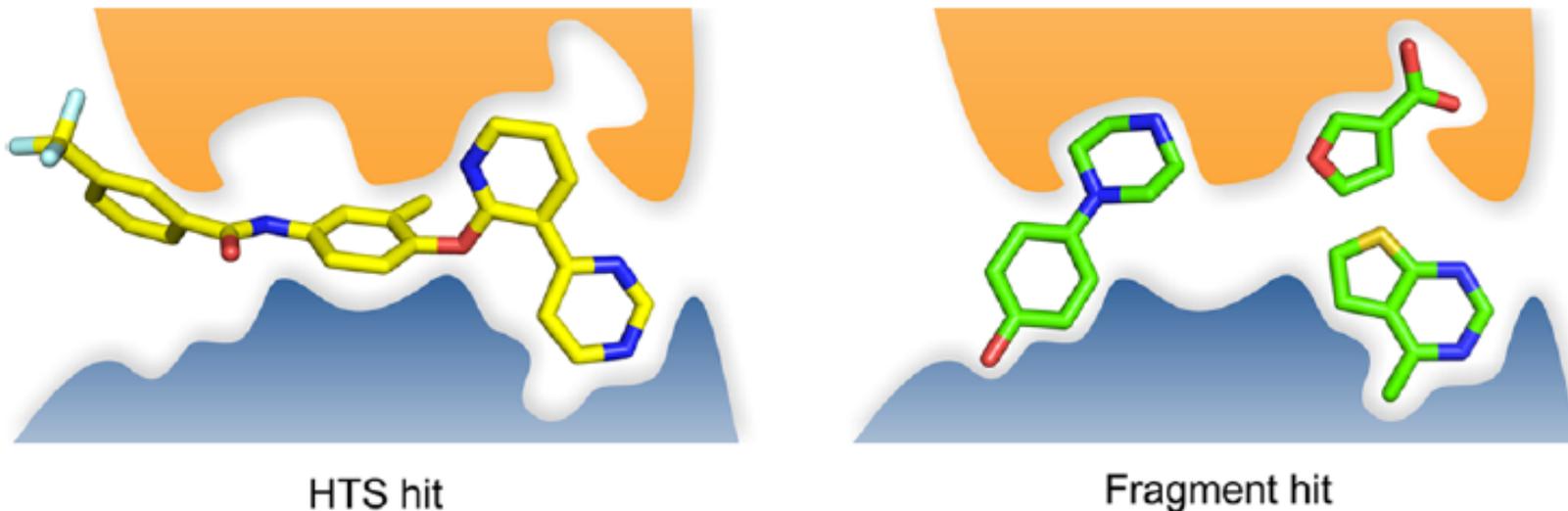
Valori pari o inferiori a 0,3 per legami con siti meno specifici e meno utilizzabili per l'interazione di farmaci.

## Valore dei frammenti

Spesso, **frammenti hanno bassa potenza** ( $\Delta G$  piccolo in valore assoluto, pochi gruppi di legame), **ma** distribuendolo su un basso N, **risultano più efficienti rispetto a molecole grandi e potenti** (molti gruppi di legame, ma alto N).

Valutando i frammenti come porzioni di molecole, da sviluppare in molecole più grandi, una elevata LE ci dà un **punto di partenza ottimale**, e un indirizzo per uno sviluppo che comporti il **mantenimento del suo valore**.

## Librerie di frammenti



Un hit trovato da classica HTS si può prevedere possa avere un legame con il target relativamente forte ma poco “efficace”. Al contrario, piccoli frammenti sono maggiormente in grado di sfruttare tutti gli spazi, legame complessivo minore, ma molto più efficace.

*Figura da D. E. Scott et al. Biochemistry, 2012, 51, 4990-5003.*

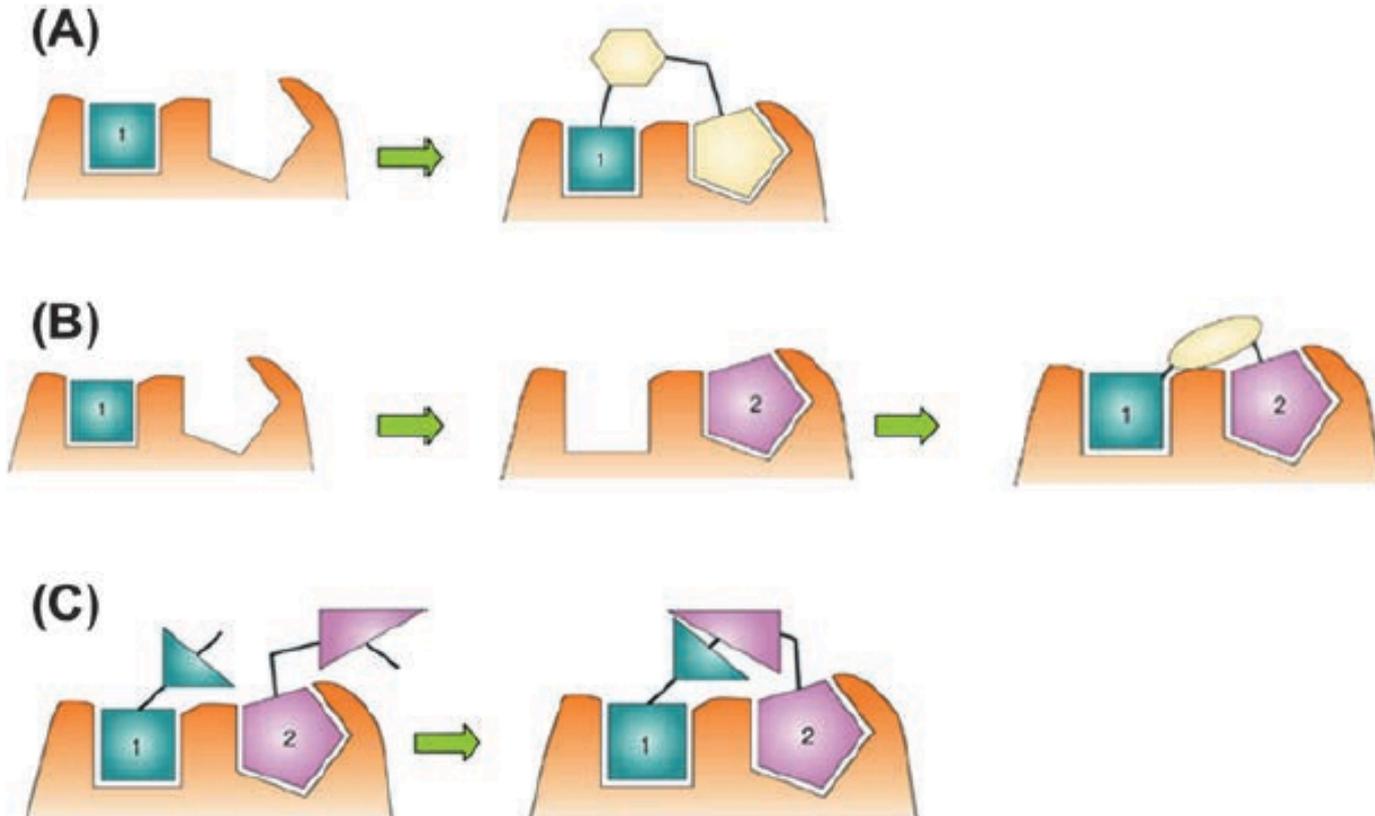
## Sviluppo di frammenti

I frammenti che sono trovati dallo screening possono essere oggetto di evoluzione, costruendo molecole più grandi per aggiunte successive di altri gruppi (**fragment growing**), oppure possono uniti tra loro.

**Legando più frammenti** poco attivi (in un giusto modo, da individuare), si cerca di ricostruire una molecola più grande, con attività elevata. Ciò deriva dal presupposto che i diversi frammenti leghino diverse porzioni all'interno del sito di legame.

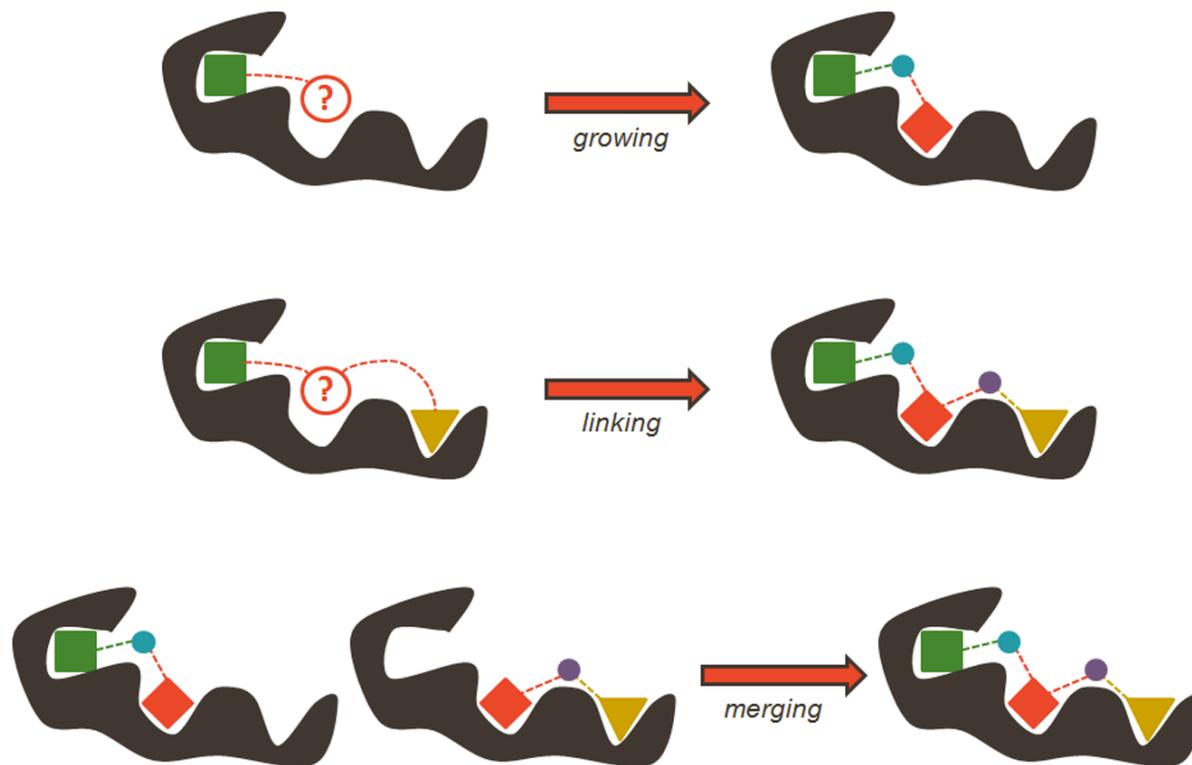
I **frammenti** da legare devono essere **vicini**. Un modo per selezionare frammenti vicini può essere delegato al sistema stesso, con un processo di “auto-assemblaggio”.

# Sviluppo di frammenti



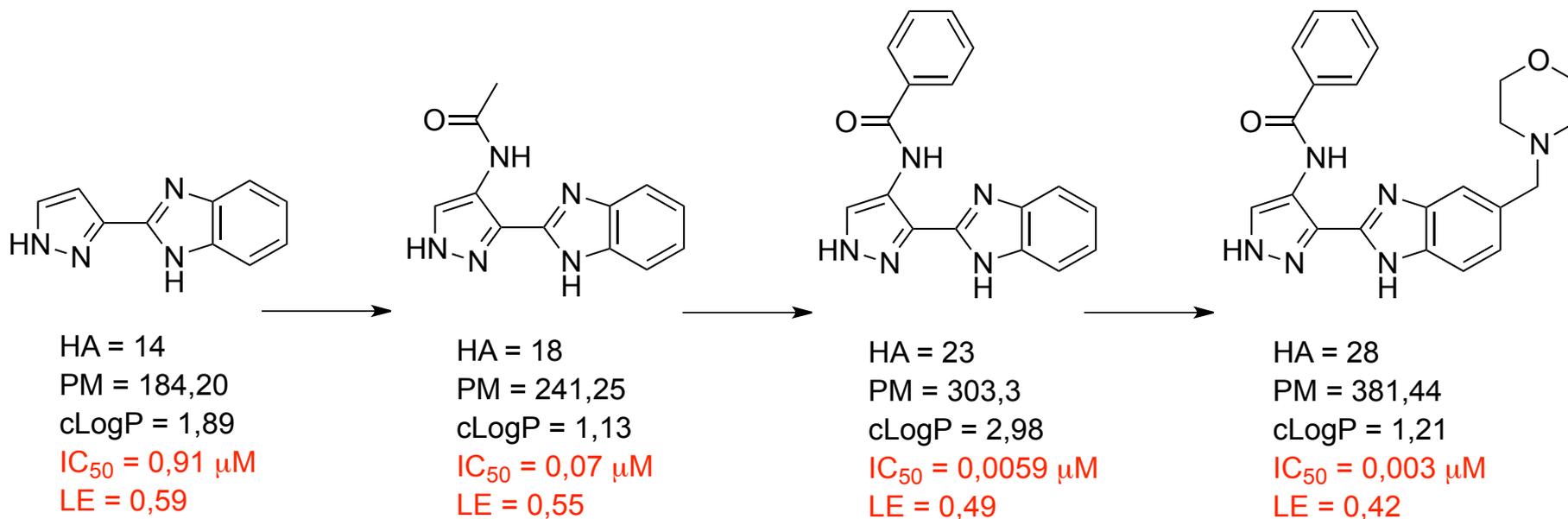
(A): Evoluzione di frammento; (B): Unione di frammenti;  
(C): Auto-assemblaggio di frammenti.

# Sviluppo di frammenti



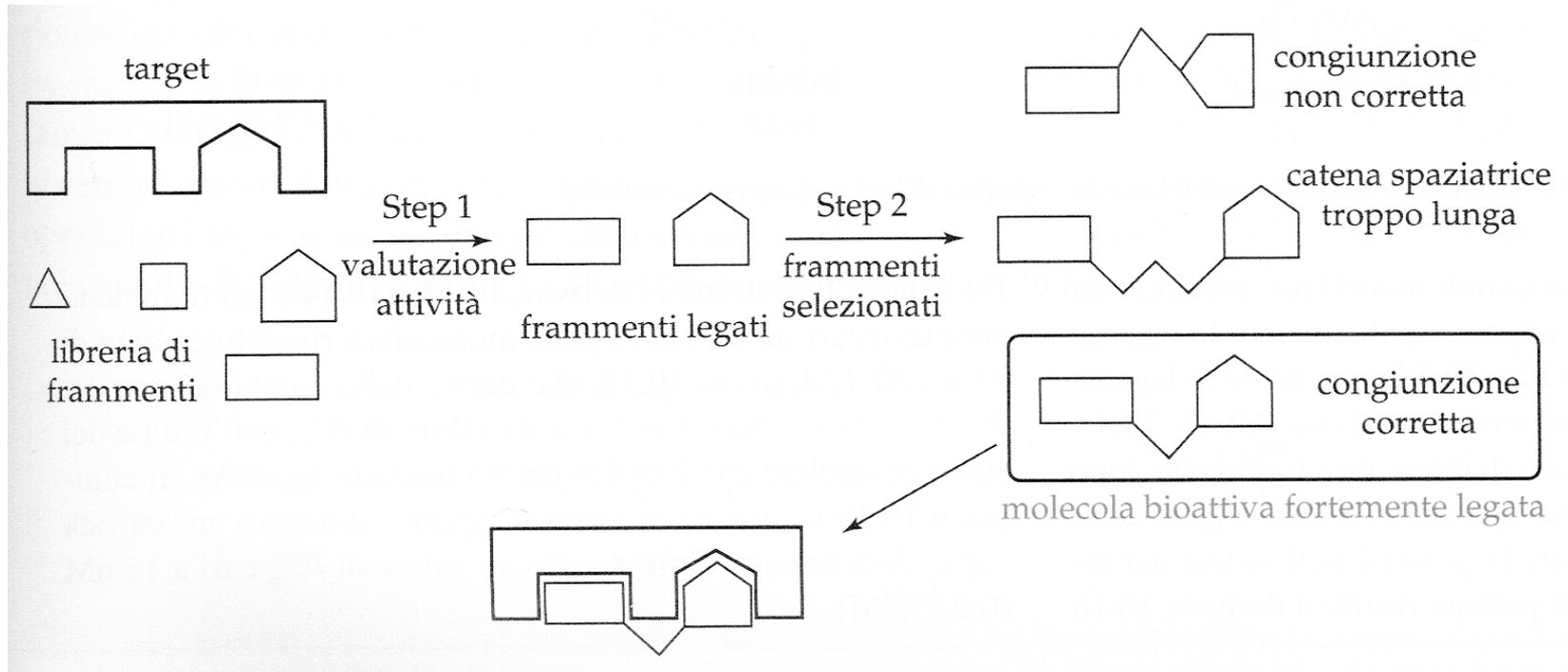
Da F. Chevillard et al. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 1118–1129

## Accrescimento (growing) di frammenti



Esempio di evoluzione per accrescimento di un inibitore di chinasi. La LE, pur diminuendo leggermente, resta sempre elevata e ci dà la conferma di un corretto sviluppo della molecola. HA = Heavy Atoms (atomi pesanti, non Idrogeno)

# Unione di frammenti



## Auto assemblaggio di frammenti

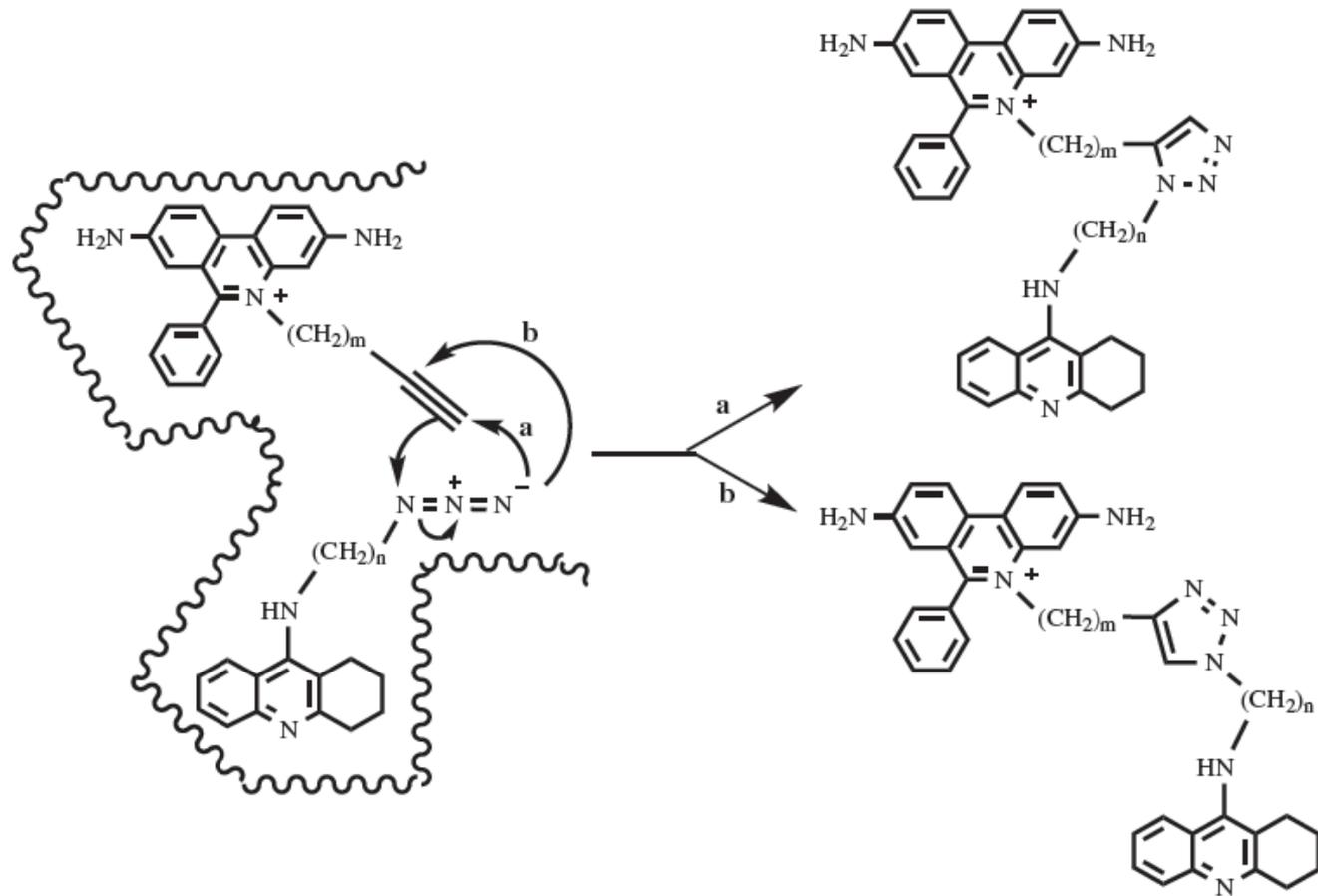
Per cercare di unire solo **frammenti vicini**, può essere utile vedere quali di essi possano legarsi spontaneamente, inserendo nella struttura dei **linkers con adeguati gruppi funzionali**.

I gruppi funzionali di due frammenti adiacenti devono essere complementari per dare un **legame stabile**, ma solo se si incontrano in punti vicini tra loro.

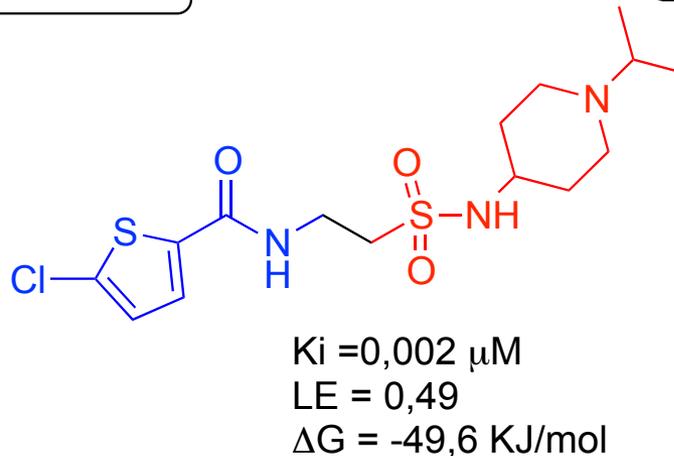
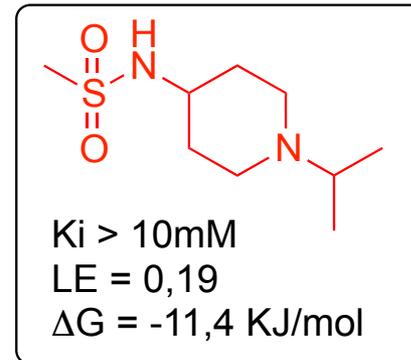
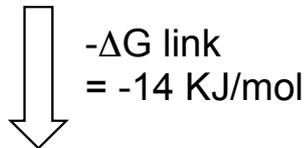
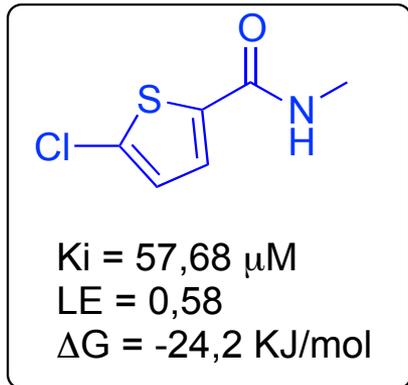
Un tipico esempio sono il gruppo aza ed il gruppo alchino. Se si trovano vicini possono dare una reazione di cicloaddizione 1,3 dipolare e formare un triazolo.

E' la tipica reazione della cosiddetta "**Click-Chemistry**".

# Auto assemblaggio di frammenti



## Unione di frammenti



L'unione di frammenti, nel corretto modo, ha dato origine a una molecola molto attiva come inibitore del fattore Xa.

*Nazaré et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2012, 51, 905*