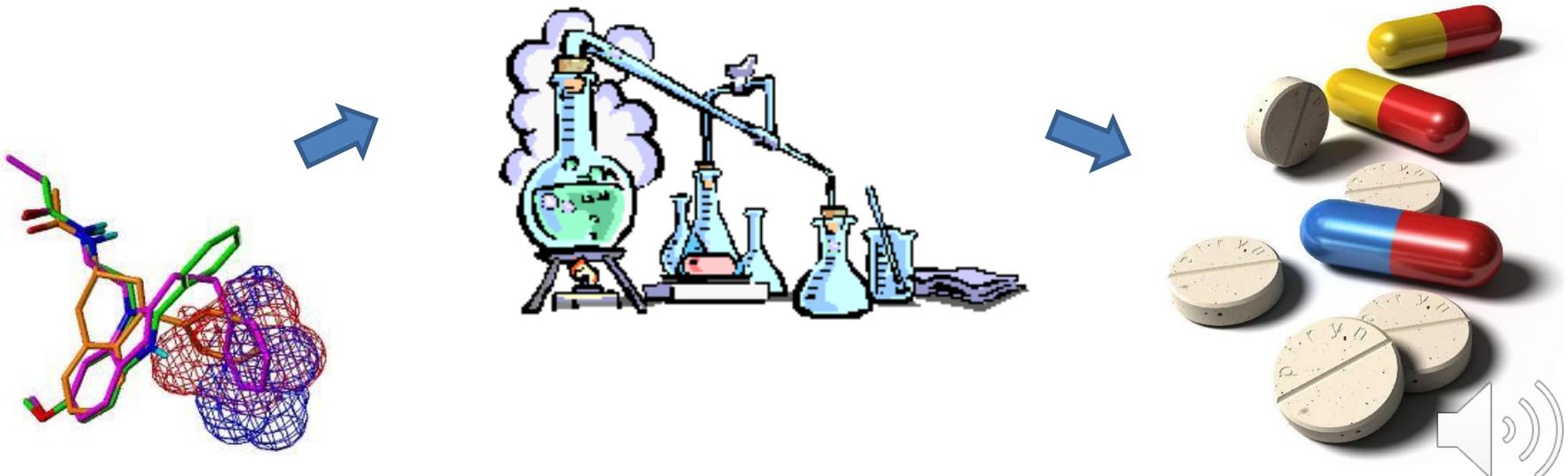
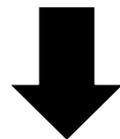


Ricerca e sviluppo del farmaco e aspetti regolatori



Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Scegliere la malattia da trattare!
- ✓ Scegliere il bersaglio molecolare (target)
- ✓ Identificare il saggio biologico opportuno
- ✓ Identificazione del prototipo
- ✓ Isolare e purificare il prototipo
- ✓ Determinare la struttura del prototipo



Lead compound

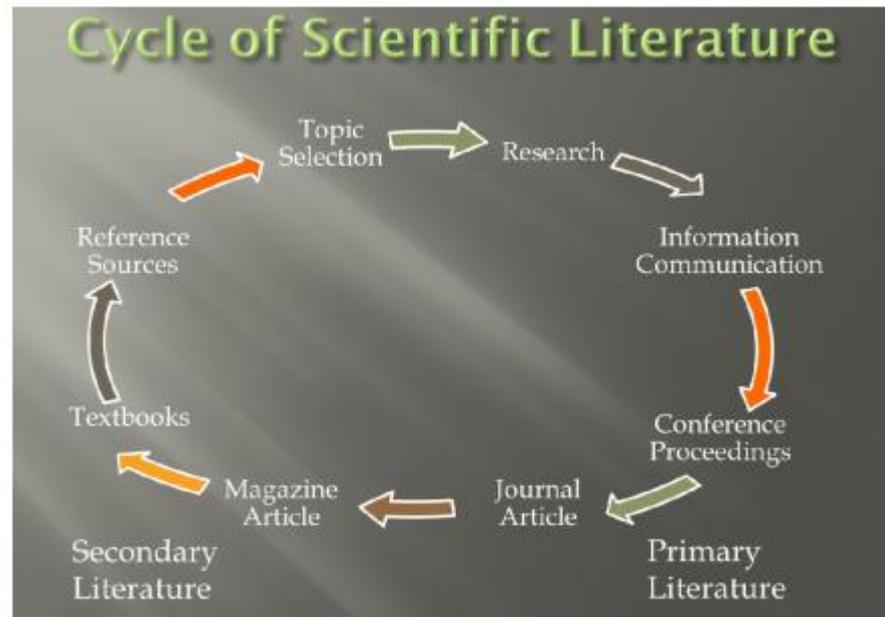
Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Scegliere il bersaglio molecolare (target)

Determinazione della struttura del target

Poiché il farmaco interagisce con il relativo target instaurando interazioni complementari con esso, la raccolta di informazioni circa le caratteristiche del bersaglio biologico è fondamentale per guidare la progettazione di nuovi potenziali farmaci.

Se un target è già stato studiato ed esplorato, dati di letteratura possono rappresentare un buon punto di partenza per indirizzare la ricerca.

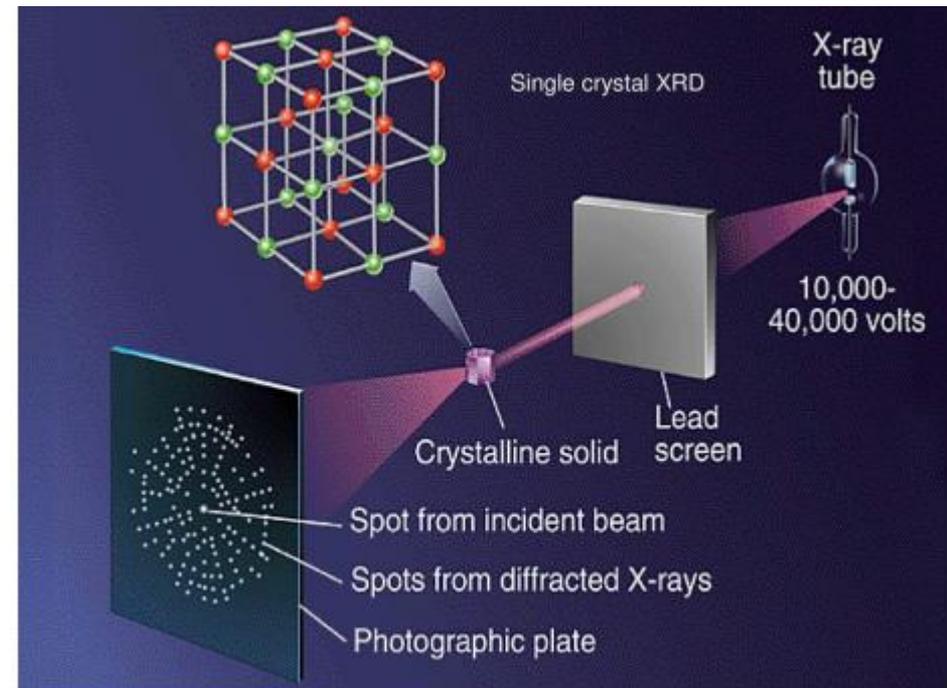


Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Scegliere il bersaglio molecolare (target)

Determinazione della struttura del target

La **cristallografia a raggi X** è la tecnica più comune per la determinazione della struttura di una proteina. Si studia la diffrazione di un fascio di raggi X in seguito all'interazione con una proteina presente sotto forma di cristallo. Il profilo di diffrazione permette di desumere la posizione relativa degli atomi nel cristallo



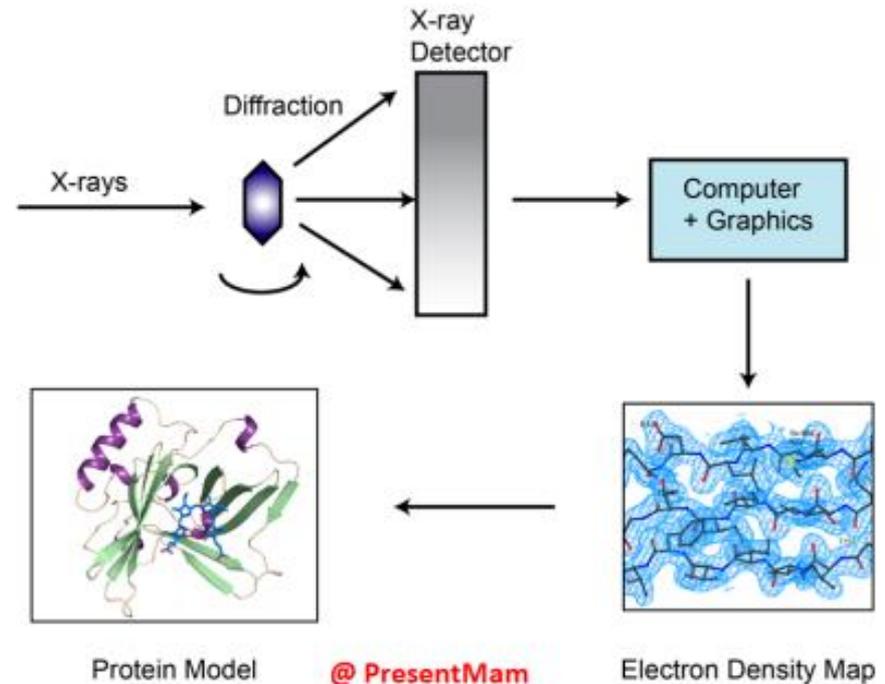
Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Scegliere il bersaglio molecolare (target)

Analisi cristallografica

Ciò che si ottiene in seguito all'elaborazione dei dati è la mappa di densità elettronica in cui gli atomi sono indicati da sfere nello spazio tridimensionale. Sulla base della mappa di densità elettronica e della struttura primaria della proteina avviene l'assegnazione.

Overview of the X-ray Crystallographic Method

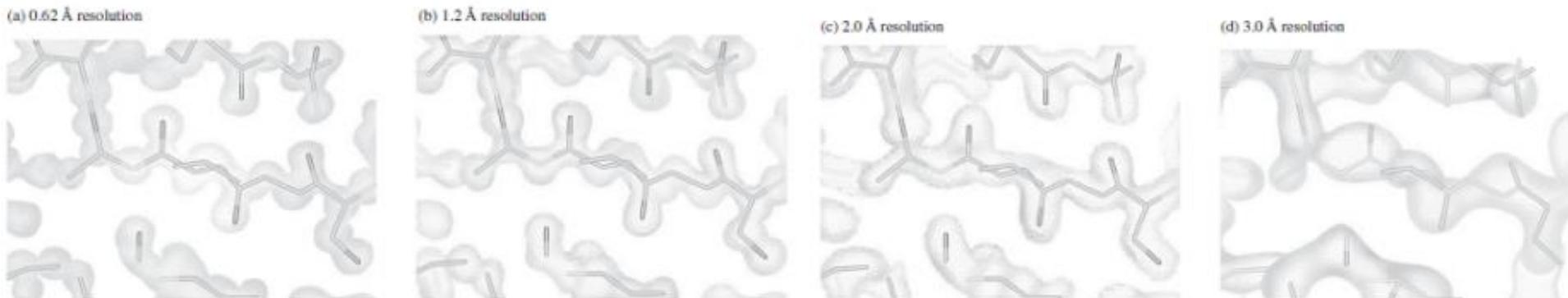
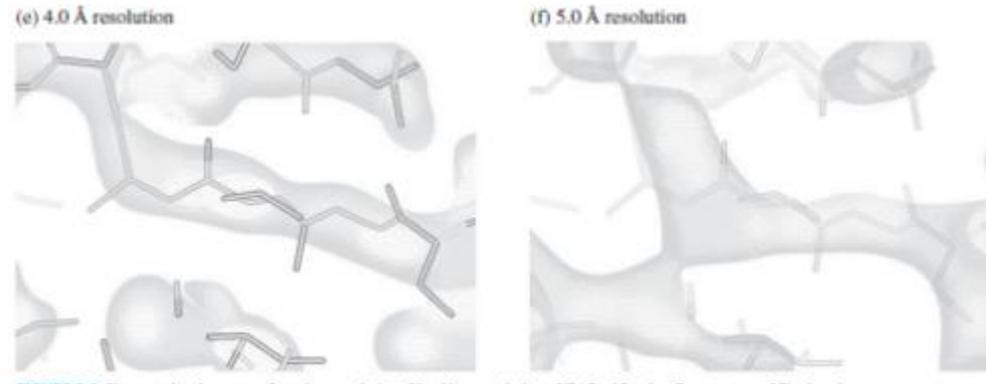


Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Scegliere il bersaglio molecolare (target)

Analisi cristallografica

A risoluzione maggiore, è possibile distinguere i singoli atomi (sfere) tra loro nel contesto della catena peptidica. Man mano che la risoluzione diminuisce, le sfere dei singoli atomi risultano meno chiare e l'elemento dominante diventa lo scheletro peptidico di base.

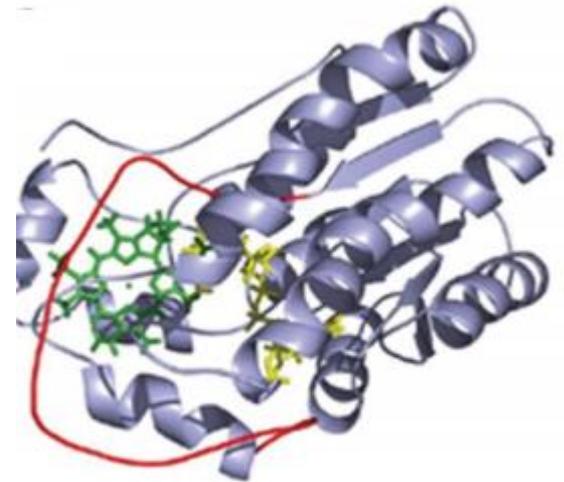


Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Scegliere il bersaglio molecolare (target)

Analisi cristallografica

Regioni proteiche ripiegate a costituire strutture secondarie ordinate sono distinguibili anche a bassa risoluzione. Di solito tali regioni caratterizzano i siti di legame o il sito attivo. L'analisi cristallografica consente di avere informazioni circa la natura e la forma del sito attivo (natura dei residui catalitici, presenza di una tasca più o meno profonda), consentendo la progettazione razionale di ligandi (es. inibitori enzimatici) ottimali.

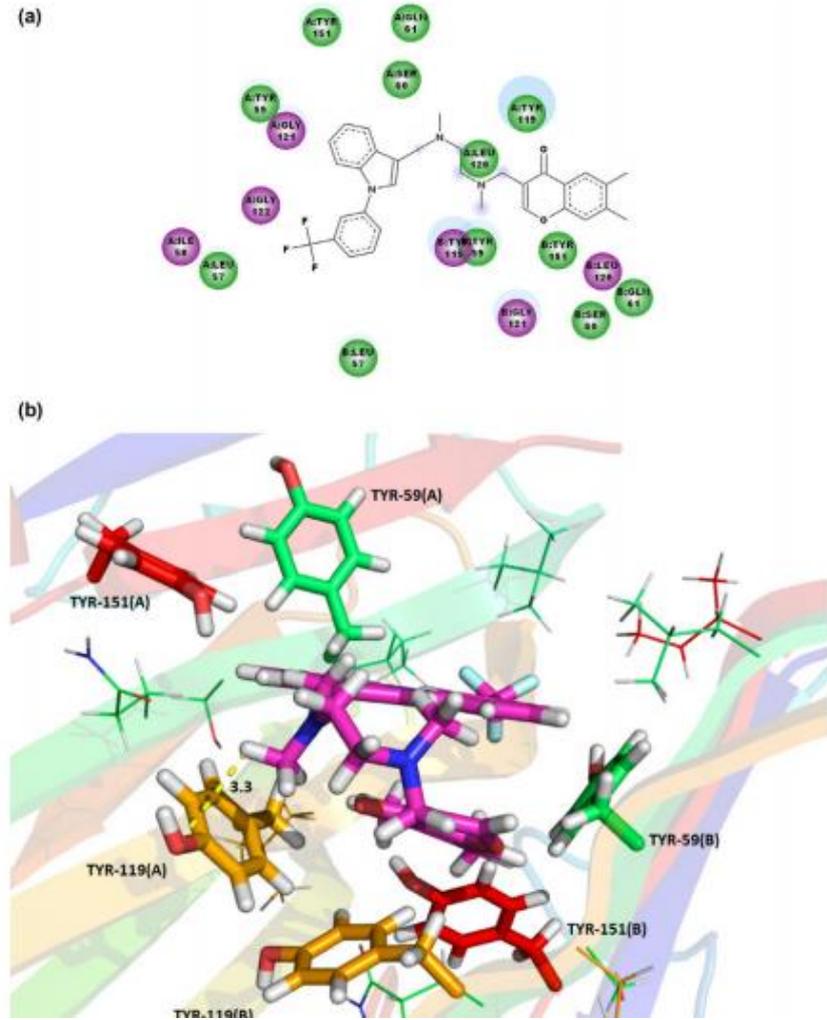


Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Scegliere il bersaglio molecolare (target)

Analisi cristallografica

Inoltre un inibitore può essere co-cristallizzato con la proteina target, evidenziando così il preciso sito di binding, le interazioni coinvolte e suggerendo eventuali modifiche strutturali da poter apportare.



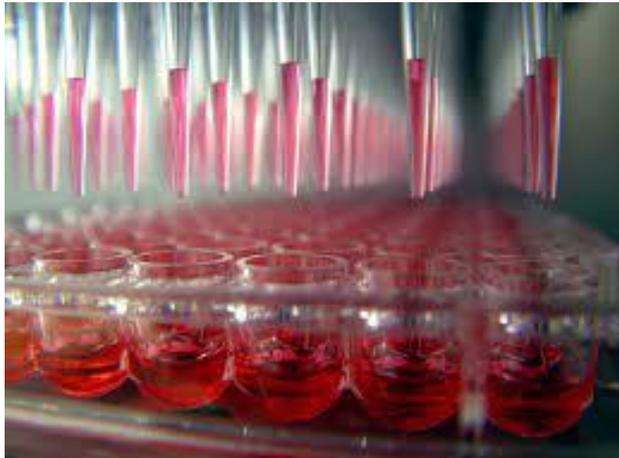
Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Identificare il saggio biologico opportuno

La scelta del saggio biologico da utilizzare per valutare l'attività biologica di una molecola è fondamentale per il successo della ricerca. Il saggio deve essere :

- Semplice
- Rapido
- Pertinente

- **Saggio *in vitro***



- **Saggio *in vivo***



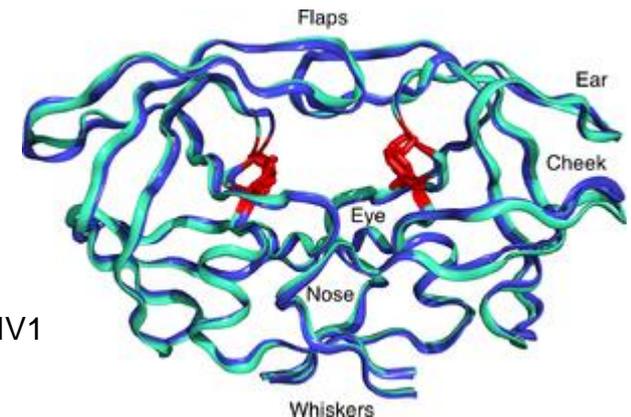
Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

✓ Identificare il saggio biologico opportuno

• Saggio *in vitro*

I saggi *in vitro* non coinvolgono animali vivi, in quanto vengono effettuati su tessuti, cellule o enzimi specifici. Nel passato si potevano incontrare difficoltà notevoli per isolare e purificare gli enzimi in quantità sufficiente per l'esecuzione delle prove, attualmente le metodologie che utilizzano l'ingegneria genetica possono essere utilizzate per incorporare il gene di un particolare enzima in cellule a crescita veloce come batteri o lieviti.

Con queste tecniche, si possono ottenere quantità cospicue dell'enzima, che può essere quindi isolato e purificato facilmente.



• Proteasi HIV1

Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

✓ Identificare il saggio biologico opportuno

- **Saggio *in vitro***

Agonisti e antagonisti recettoriali possono essere testati su cellule o tessuti che esprimono sulla loro superficie il recettore bersaglio.

Studi *in vitro* sulle cellule intere sono utili in quanto privi di tutte quelle complicazioni che si presentano negli studi in vivo, dove i farmaci devono superare barriere (parete intestinale) o restare inalterati agli attacchi degli enzimi metabolici.

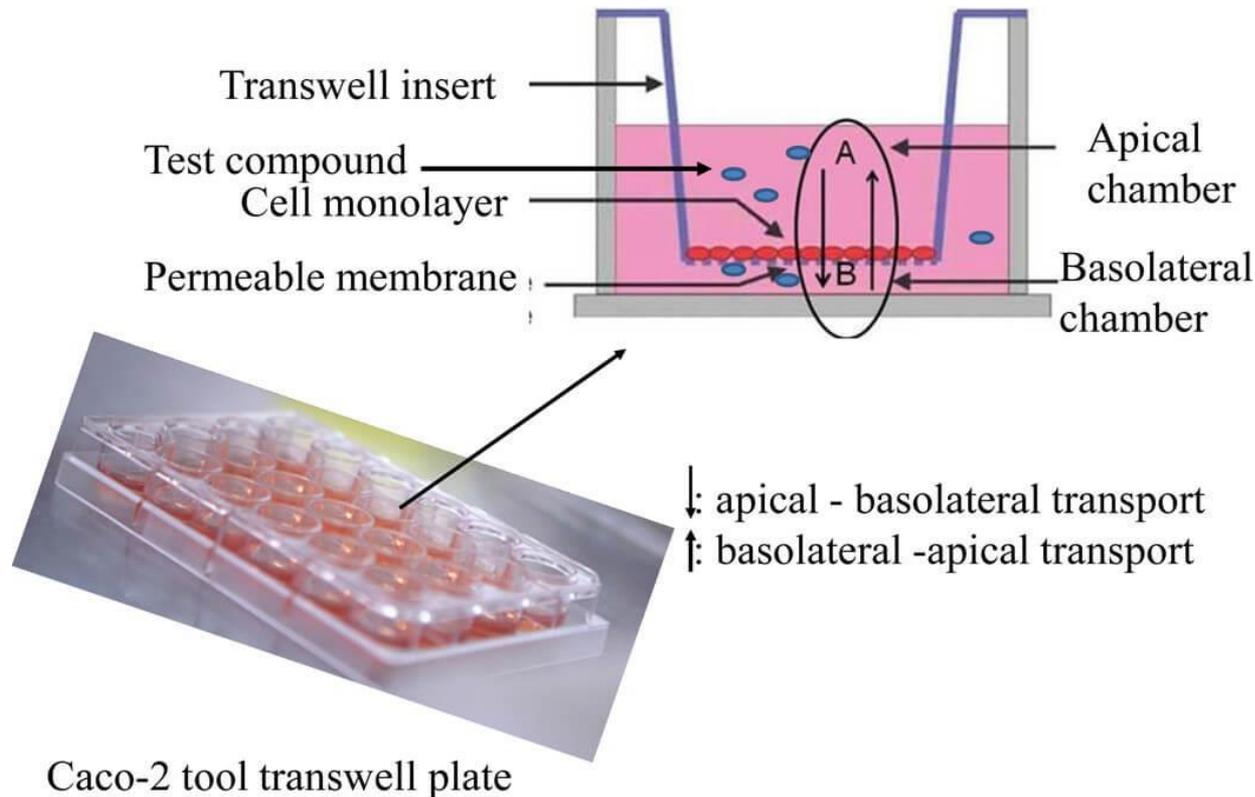
Farmaci antibatterici si saggiano *in vitro*. Si definiscono test *in vivo* solo quelli effettuati sull'uomo o sugli animali.

Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

✓ Identificare il saggio biologico opportuno

- **Saggio *in vitro***

Test *in vitro* vengono anche utilizzati per verificare proprietà farmacocinetiche.

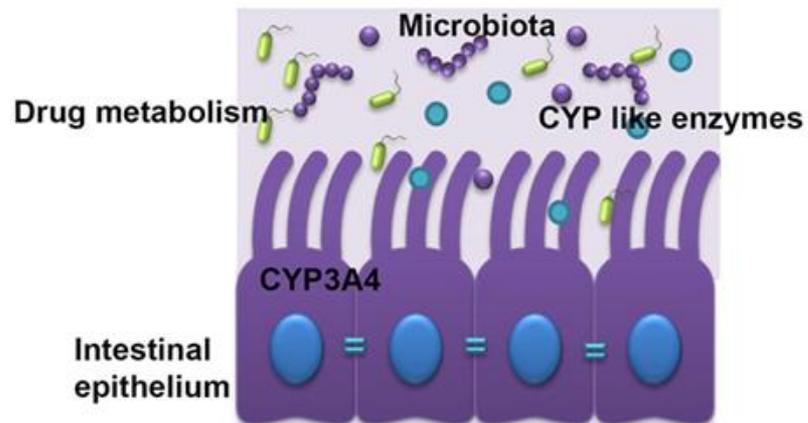
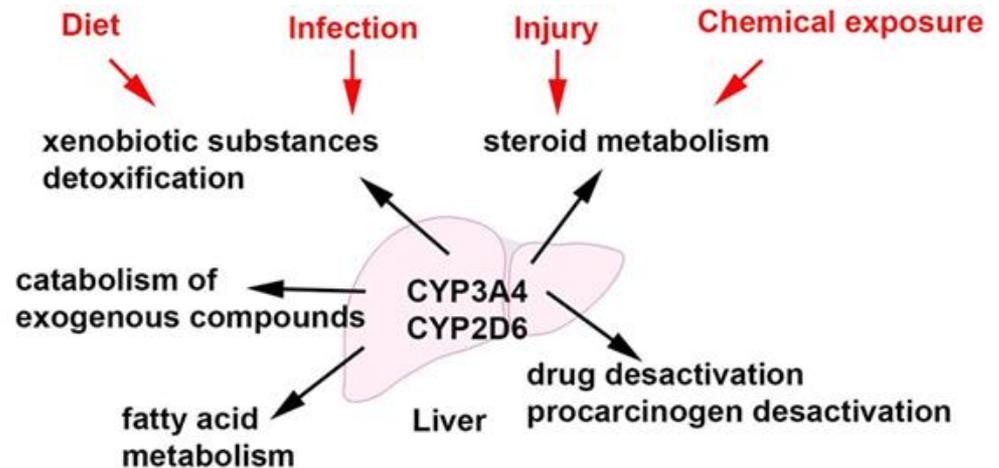


Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

✓ Identificare il saggio biologico opportuno

- **Saggio *in vitro***

I microsomi estratti dalle cellule epatiche contengono gli enzimi del citocromo P450 e possono essere utilizzati per valutare il metabolismo dei composti candidati a diventare farmaci per verificare possibili interazioni con altri farmaci.



Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

✓ Identificare il saggio biologico opportuno

- **Saggio *in vivo***

Molto spesso le prove in vivo consistono nell'indurre nell'animale uno stato di malattia per riprodurre sintomi osservabili. In una fase successiva l'animale viene trattato con il farmaco da testare.

Spesso si utilizzano animali transgenici.

Problematiche associate ai test in vivo:

- Etici
- Richiedono molto tempo
- Possono dare risultati fuorvianti.

Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ Identificare il saggio biologico opportuno
- **Screening ad alta produttività o high-throughput screening (HTS).**

Tale tecnica consiste nel testare automaticamente l'attività di un gran numero di composti su di un elevato numero di target.

Risultati facilmente identificabili: crescita cellulare, reazioni enzimatiche che producono cambio di colore, spiazzamento di un ligando radioattivo.



• Hit identification

Once a target and a testing system have been chosen, the next stage is to find a hit compound which shows the desired pharmacological activity. The level of activity may not be very great and there may be undesirable side effects, but the hit compound provides a start for the drug design and development process. There are various ways in which a hit compound might be discovered.

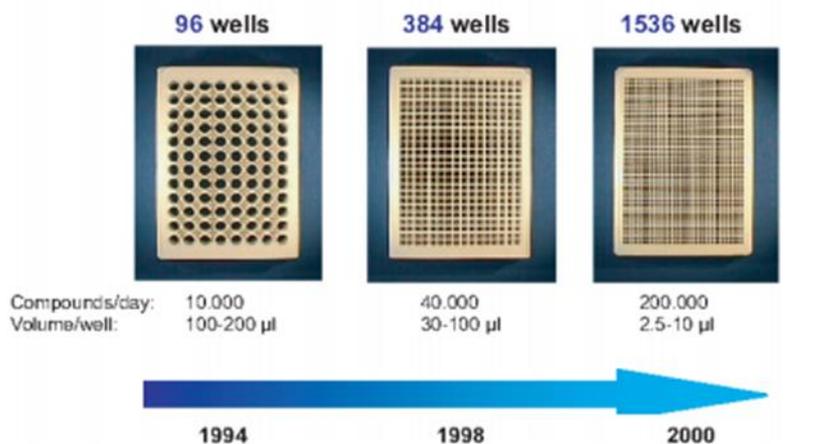
High-throughput screening (HTS)

This involves the automated testing of large numbers of compounds versus a large number of targets; typically, several thousand compounds can be tested at once in 30–50 biochemical tests. It is important that the test should produce an easily measurable effect which can be detected and measured automatically. This effect could be cell growth, an enzyme-catalysed reaction which produces a color change, or displacement of radioactively labelled ligands from receptors.



• Hit identification

High-throughput screening (HTS)



Compounds are usually dissolved in DMSO.

Advantages in using such a solvent include:

- Low melting point (18° C) with the ability to freeze compounds and reduce degradation;
- Solubilizes most organic compounds;
- High boiling point, so the concentration of stock solutions remains constant over time

• Hit identification

High-throughput screening (HTS)

In general, positive hits are compounds which have an activity in the range 30 μM –1 nM. Unfortunately, HTS can generate many false-positive hits, and there is a high failure rate between the number of hits, and those compounds which are eventually identified as authentic hit compounds.

One of the main causes of false hits is what are known as **promiscuous inhibitors**. These are agents which appear to inhibit a range of different target proteins and show very poor selectivity. It is believed that agents working in this manner come together in solution to form molecular aggregates which adsorb target proteins onto their surface, resulting in the inhibition observed. One way of finding out whether promiscuous inhibition is taking place is to add a detergent to the test solution. This reverses and prevents the phenomenon.

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Dopo aver scelto il bersaglio ed il saggio biologico, il passo successivo è quello di identificare un prototipo, ossia un composto che mostri l'attività farmaceutica desiderata.

Non è necessario che il livello di attività desiderato sia elevata e che siano totalmente assenti gli effetti collaterali.

Il prototipo costituisce il punto di partenza nel processo di sviluppo.

Ci sono molti modi per scoprire un prototipo:

- **Screening di sostanze di origine naturale**

I composti responsabili di tale attività viene denominato principio attivo e può essere considerato un prototipo.

Generalmente sono metaboliti secondari.

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

- Screening di sostanze di origine naturale

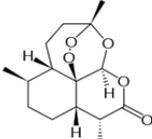
Plants in the News
October 9 2015

Nobel Prize in Physiology or
Medicine awarded to Tu Youyou
for the development of artemisinin

Qinghao



Artemisia annua



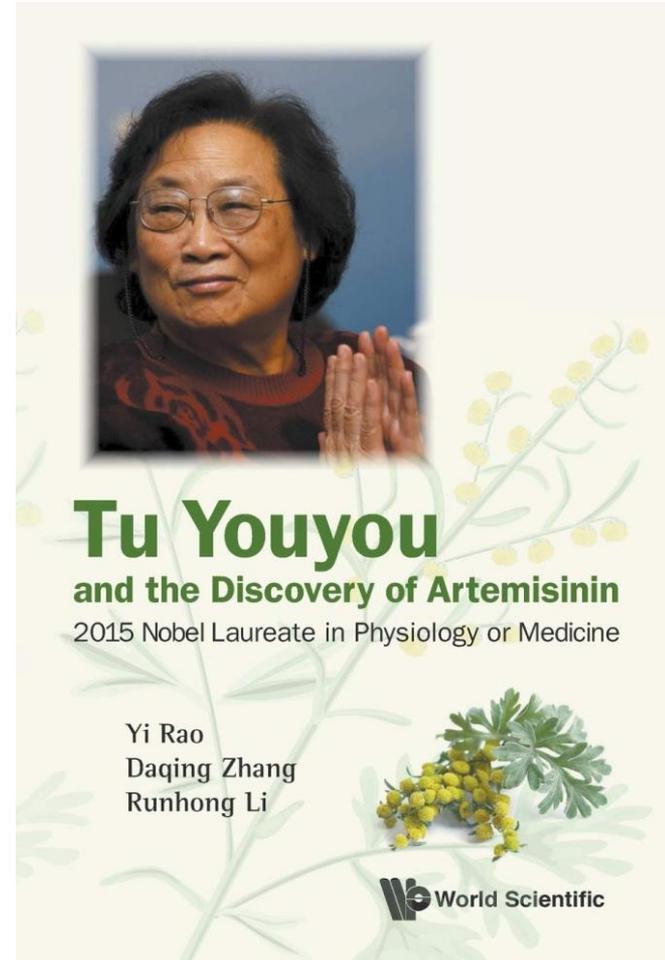
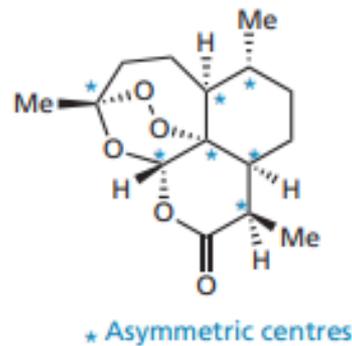
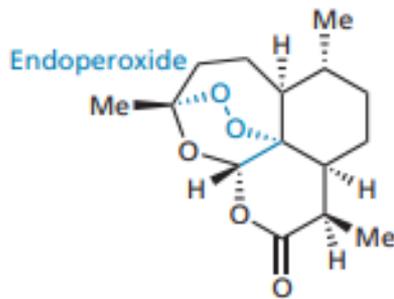
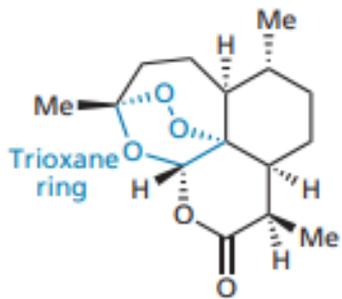
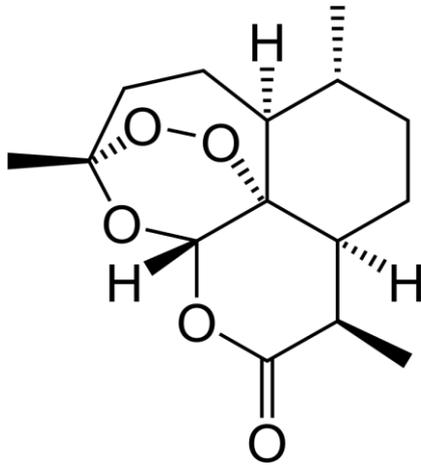
**Artemisinin, for
the treatment of
malaria**



0152

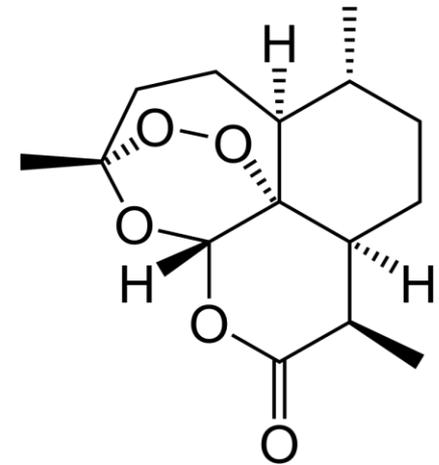
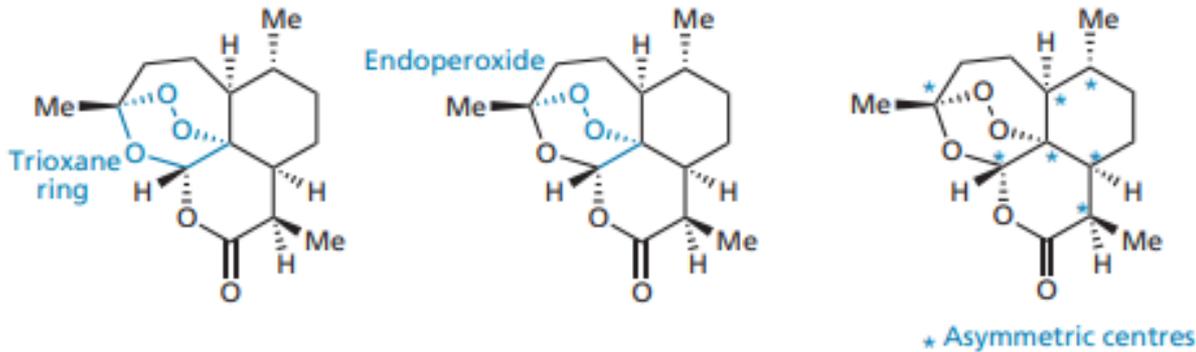
Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

- Screening di sostanze di origine naturale



Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

- Screening di sostanze di origine naturale



• artemisinina

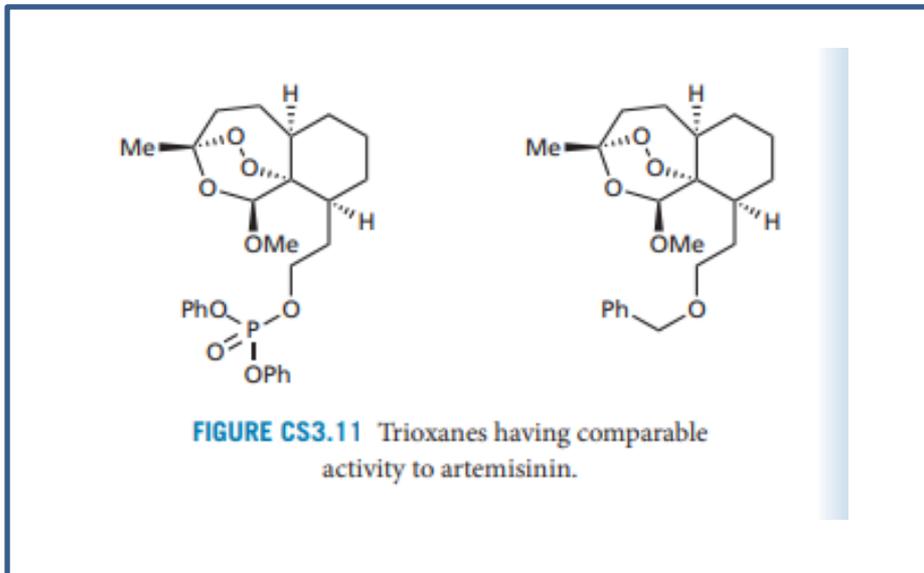


FIGURE CS3.11 Trioxanes having comparable activity to artemisinin.

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

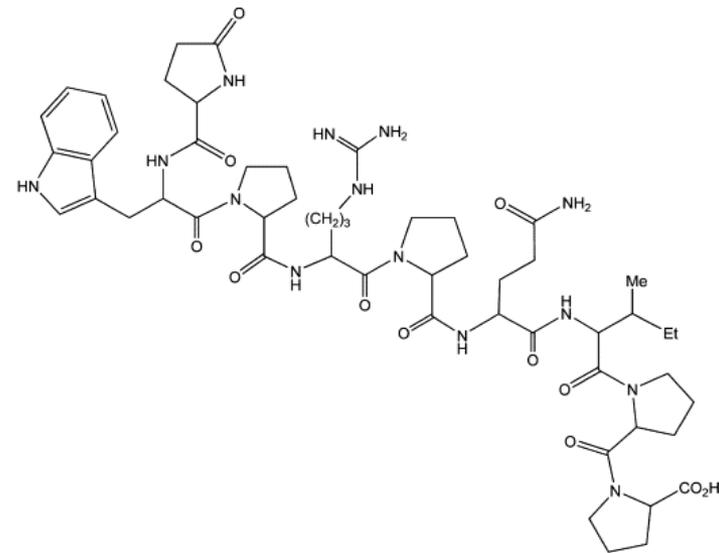
- Screening di sostanze di origine naturale

- Veleni e tossine: provenienti da piante, serpenti, ragni, insetti e microrganismi, si comportano generalmente da ligandi altamente specifici per un target molecolare. Di conseguenza sono estremamente utili per la caratterizzazione di recettori, canali ionici ed enzimi

Teprotide , a peptide isolated from the venom of the Brazilian viper, was a lead compound for the development of the antihypertensive agents cilazapril and captopril



Brazilian R1 viper (Bothrops jararaca)



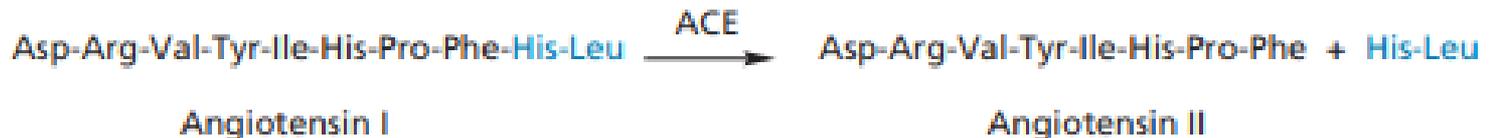
Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Screening of natural products

- Venoms and toxins



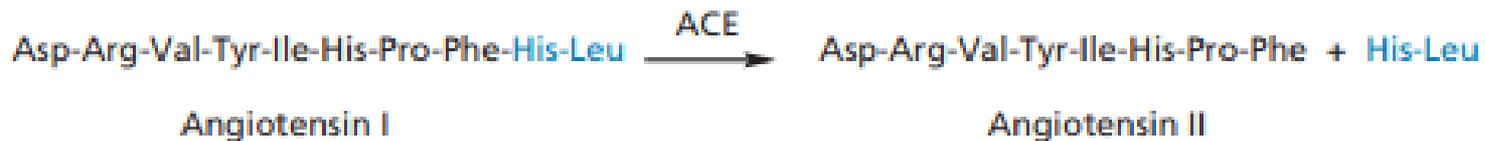
ACE is a membrane-bound enzyme which has been difficult to isolate and study. It is a member of a group of enzymes called the zinc metalloproteinases and catalyses the hydrolysis of a dipeptide fragment from the end of a decapeptide called angiotensin I to give the octapeptide angiotensin II



Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Screening of natural products

- Venoms and toxins

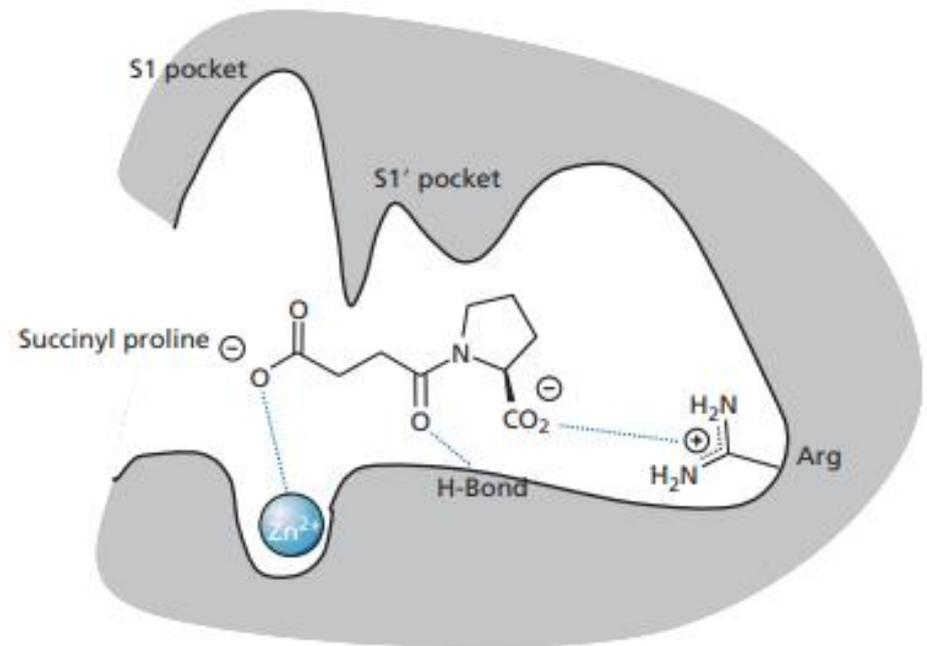


Teprotide; IC_{50} 0.9 μM

it is susceptible to digestive enzymes and is orally inactive. Other

ACE inhibitors found in snake venoms also contain the terminal proline group, implying that the ring might be involved in some binding interaction with the binding site.

Succinyl proline was the end result of this design philosophy



IC_{50} 628 μM

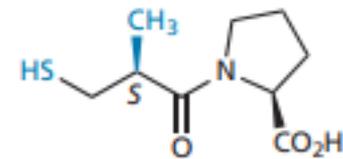
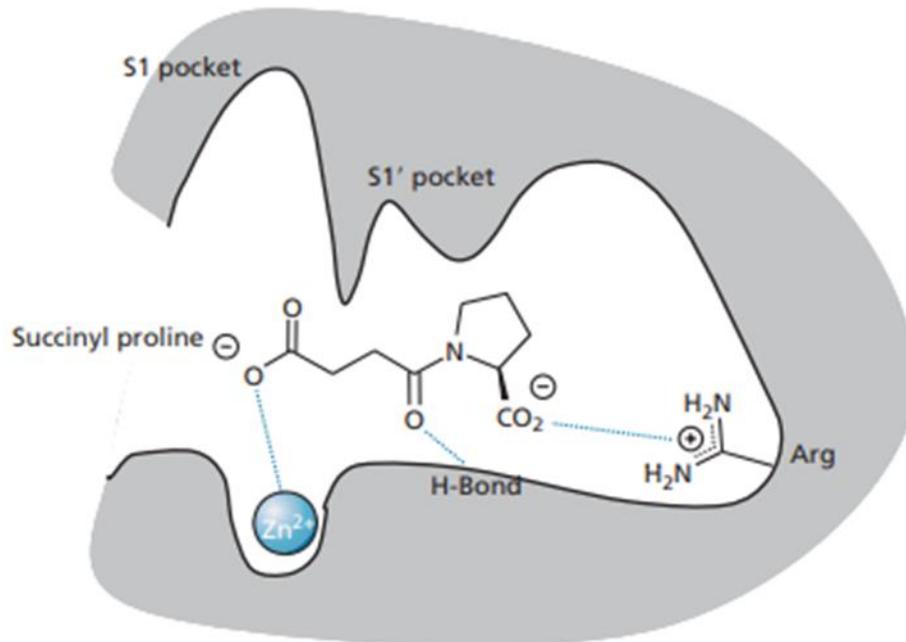
Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Screening of natural products

- Venoms and toxins



Teprotide; IC_{50} 0.9 μ M



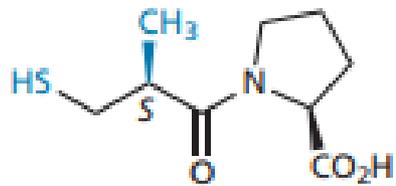
Captopril; IC_{50} 23 nM



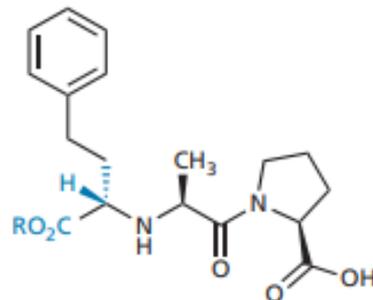
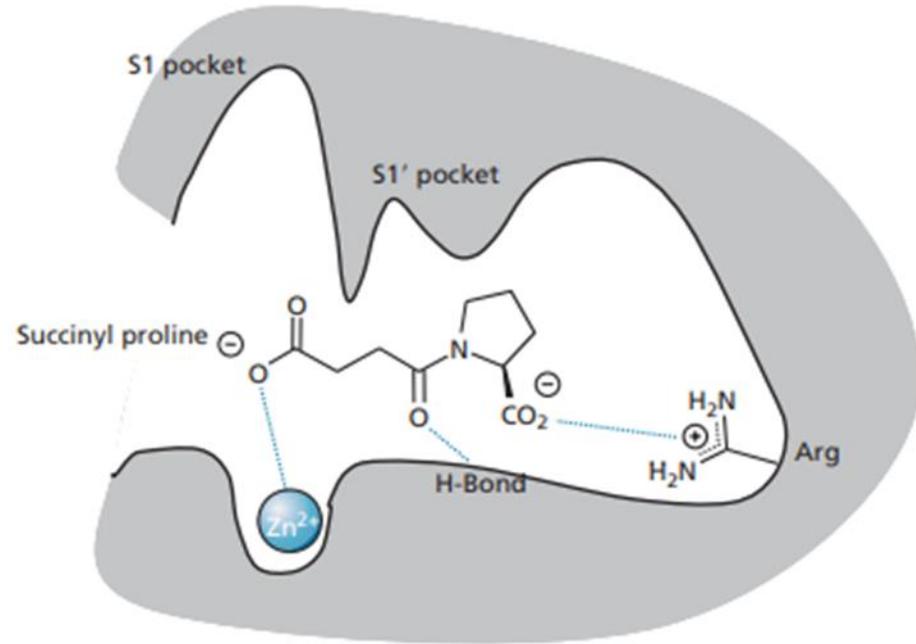
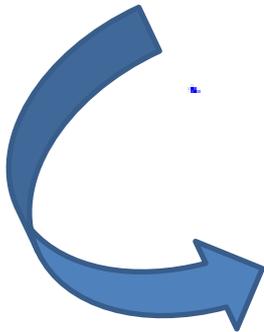
Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Screening of natural products

- Venoms and toxins



Captopril; IC_{50} 23 nM

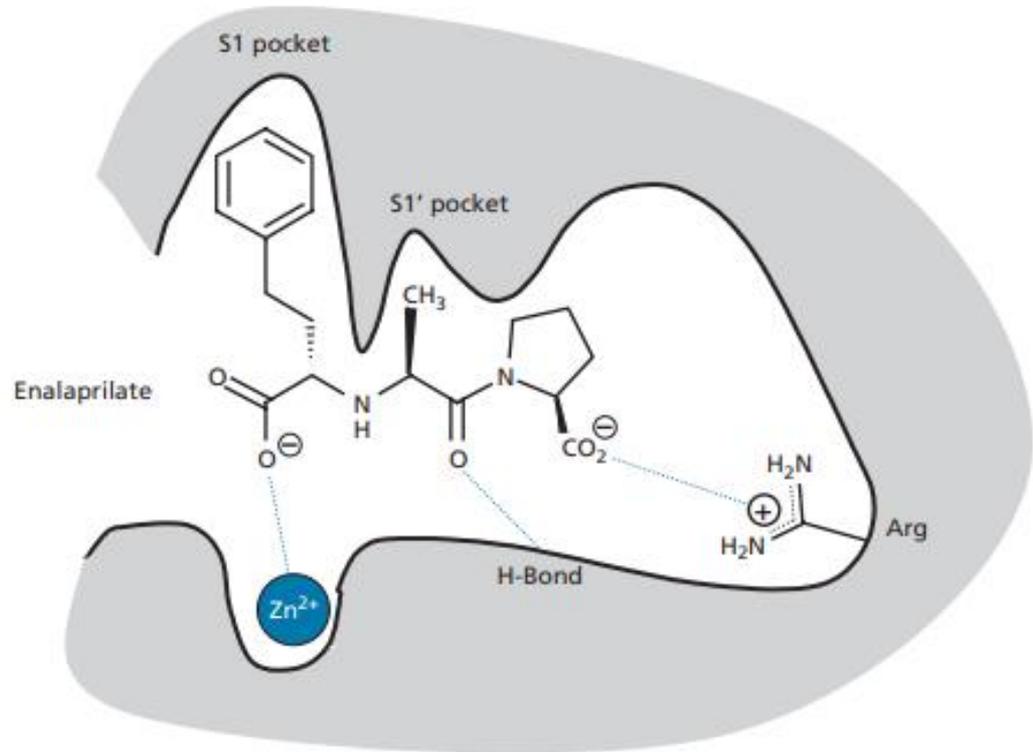
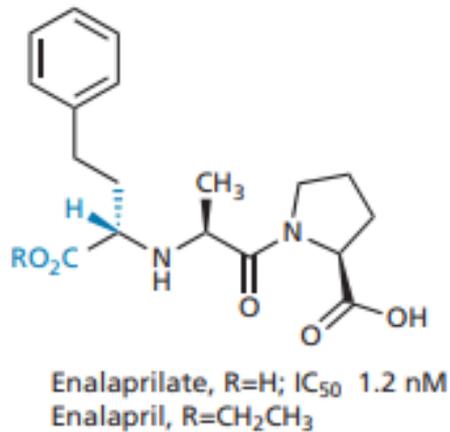


Enalaprilate, R=H; IC_{50} 1.2 nM
Enalapril, R=CH₂CH₃

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Screening of natural products

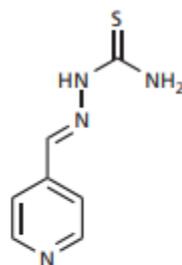
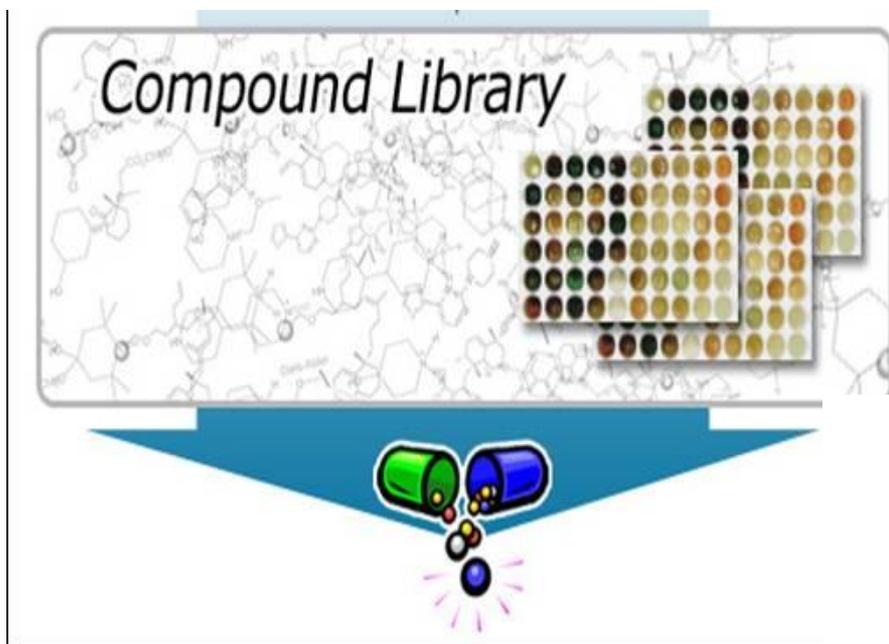
- Venoms and toxins



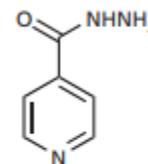
The prodrug is absorbed more easily from the gut than enalaprilate itself and is converted to enalaprilate by esterase enzymes.

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

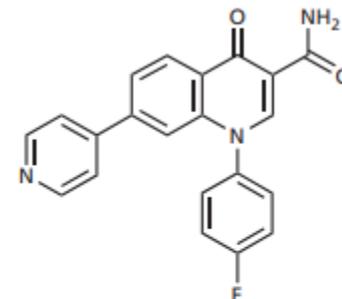
- Screening di «librerie» di prodotti di sintesi.



Isonicotinaldehide
thiosemicarbazone



Isoniazid



Quinoline-3-carboxamides

FIGURE 12.11 Pharmaceutically active compounds discovered from synthetic intermediates.

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Farmaci già esistenti:

- ✓ Farmaci «me too» e «me better»



Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Farmaci già esistenti:

✓ L'amplificazione di un effetto collaterale

SOSA: Selective Optimization Of Side Activity

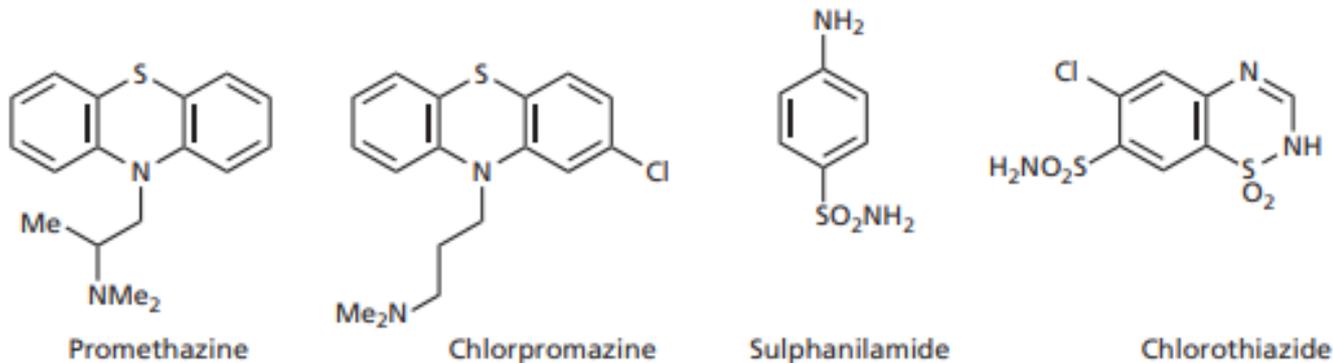


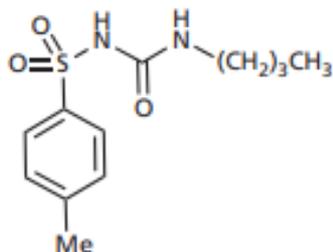
FIGURE 1 Drugs developed by enhancing a side effect.

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

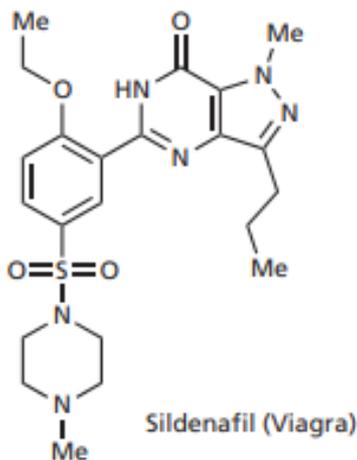
Farmaci già esistenti:

✓ L'amplificazione di un effetto collaterale

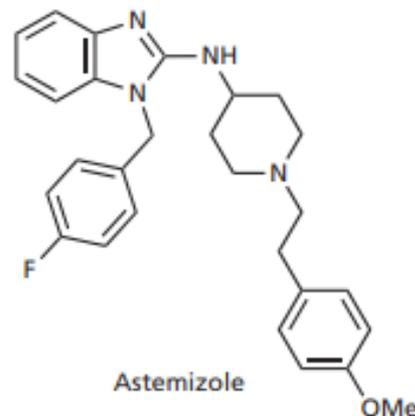
SOSA: Selective Optimization Of Side Activity



Tolbutamide



Sildenafil (Viagra)

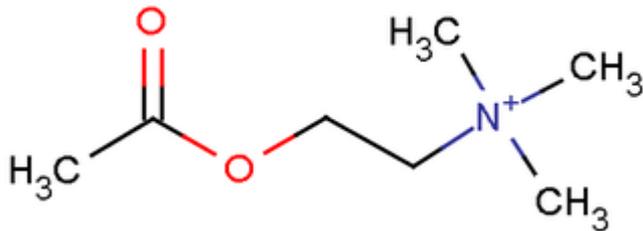
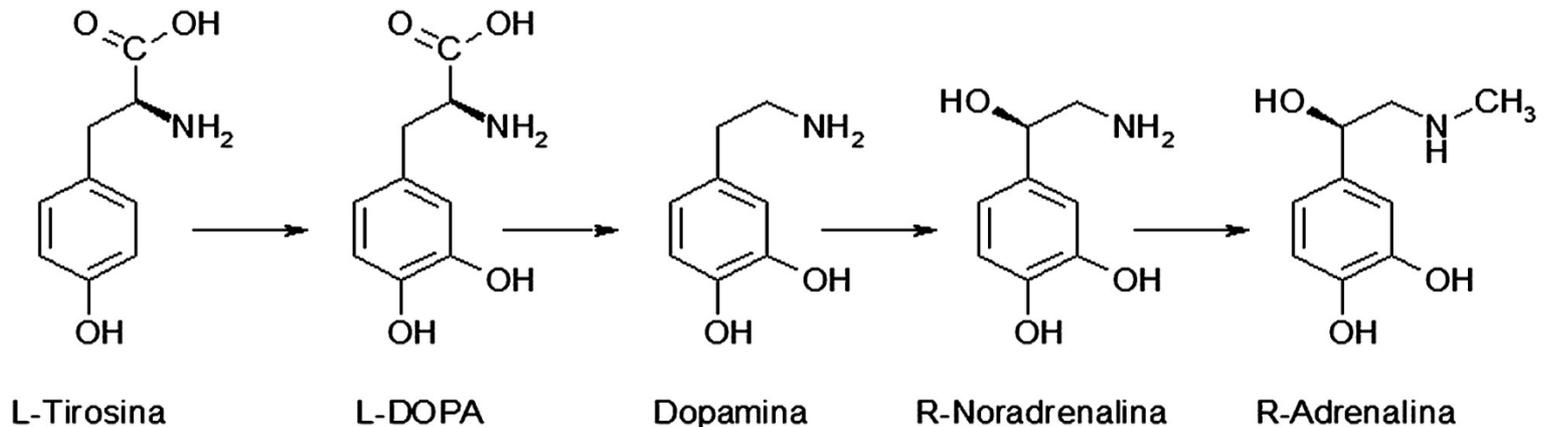


Astemizole

The moral of the story is that a drug used in one field of medicinal chemistry could be the lead compound in another field

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Progettazione di farmaci a partire da ligandi o modulatori naturali:



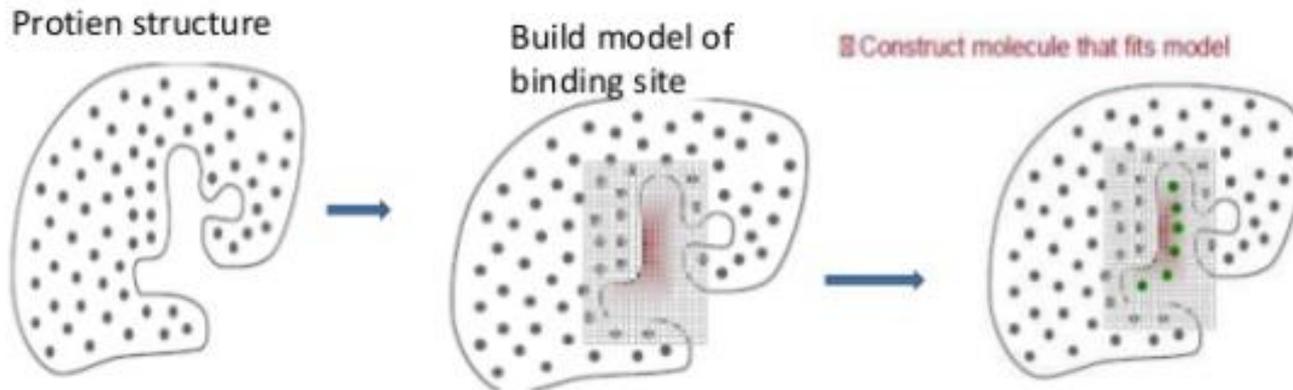
Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Progettazione di prototipi assistita dal computer

- Conoscenza del sito di legame
- Cristallografia a raggi x.



Progettazione di farmaci *de novo*



Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

- ✓ **Ricerca assistita da computer**
- ✓ **La scoperta attraverso l'uso di frammenti molecolari**

Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

La serendipità e la menta preparata

Scoperta della Penicillina

A luglio del 1928, il batteriologo Alexander Fleming andò in vacanza e lasciò sui banconi del suo laboratorio una serie di piastre Petri contenenti ceppi di *Staphilococcus*.

Al suo ritorno, rilevò colonie batteriche in tutte le piastre, eccetto una. In essa fu rilevata una muffa, un ceppo di *Penicillium notatum*, che aveva inibito la crescita batterica. Tale evento fu successivamente correlato alla produzione di penicilline, composti in grado di inibire la proliferazione dei batteri.



Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

La serendipità e la menta preparata

Scoperta della Penicillina

Una serie di eventi casuali hanno consentito tale scoperta:

- Fleming aveva lasciato le piastre sul bancone piuttosto che in incubatore;
- I laboratori al piano inferiore stavano studiando l'effetto di quella particolare muffa sulle allergie;
- Il clima: i primi giorni dopo la partenza di Fleming faceva freddo: ciò consentì la crescita della muffa e la produzione di penicilline; al contrario, gli ultimi giorni di vacanza erano più caldi, inducendo la proliferazione batterica e consentendo di evidenziare le zone di inibizione legate alla presenza della muffa.

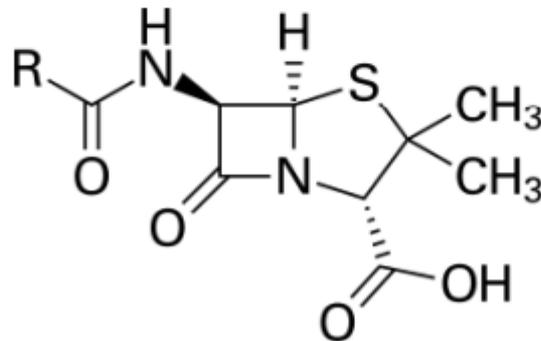
Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

La serendipità e la menta preparata

Scoperta della Penicillina

Tuttavia non fu semplice per Fleming l'isolamento del componente chiave, a partire dalla miscela dei prodotti della muffa.

Nel 1939, il batteriologo Howard Florey riuscì ad isolare campioni puri di penicillina; in poco tempo le penicilline divennero antibiotici ampiamente utilizzati nell'uomo.

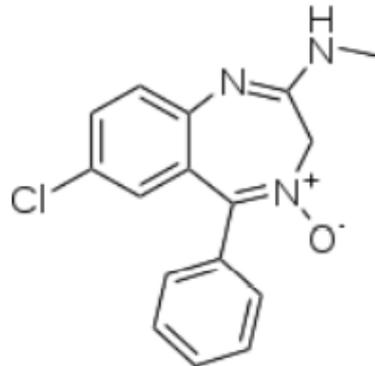


Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

La serendipità e la menta preparata

Scoperta del clordiazepossido

All'inizio del 1955, il gruppo di ricerca di Leo Sternbach alla Hoffmann-La Roche stava conducendo delle ricerche sui tranquillanti. Tuttavia, dopo mesi di ricerca infruttuosi, si decise di abbandonare il progetto. Nell'aprile del 1957, durante la pulizia dei laboratori, furono ritrovati alcuni composti tra cui il clordiazepossido che non erano stati precedentemente testati. Piuttosto che smaltirli, si decise di testarli. Tra questi, il clordiazepossido evidenziò risultati particolarmente positivi e risultò poco tossico nelle cavie (ratti e gatti).



Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

La serendipità e la menta preparata

Scoperta del Clordiazepossido

A causa del suo ottimo profilo, il clordiazepossido venne testato in sperimentazione clinica senza ulteriore ottimizzazione.

Nel 1960, venne commercializzato con il nome Librium, il capostipite delle benzodiazepine. Ad esso fece seguito, nel 1963, il diazepam (Valium) e negli anni successive una serie di analoghi tuttoggi impiegati in terapia.

