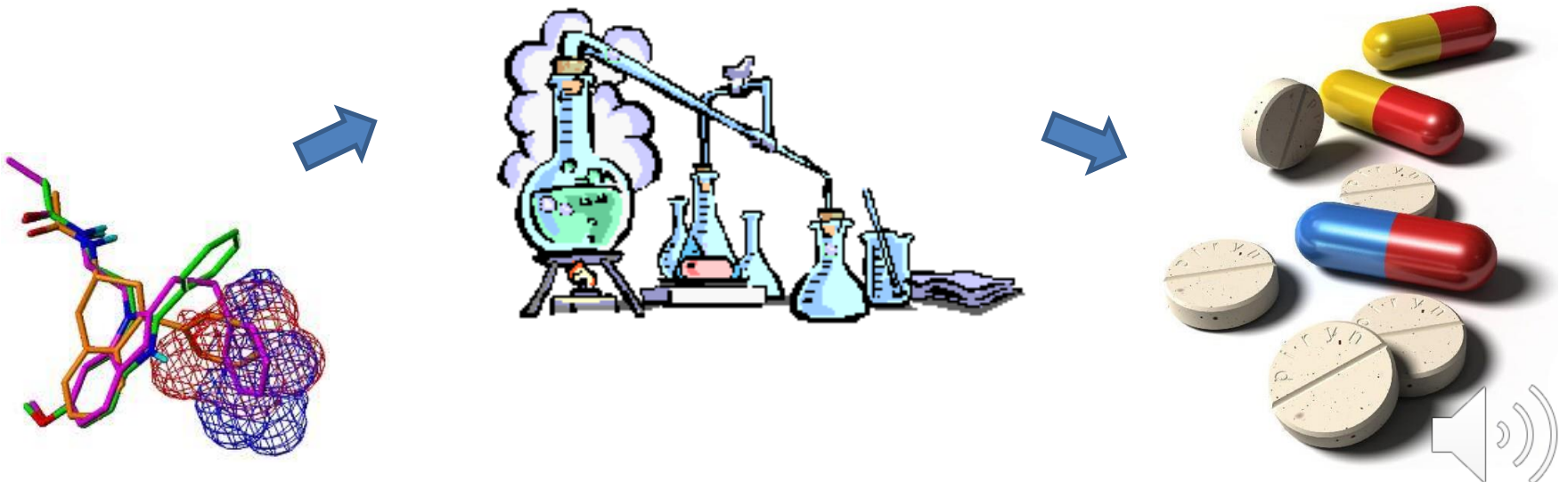
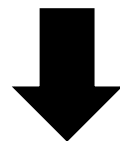


# Ricerca e sviluppo del farmaco e aspetti regolatori



# 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

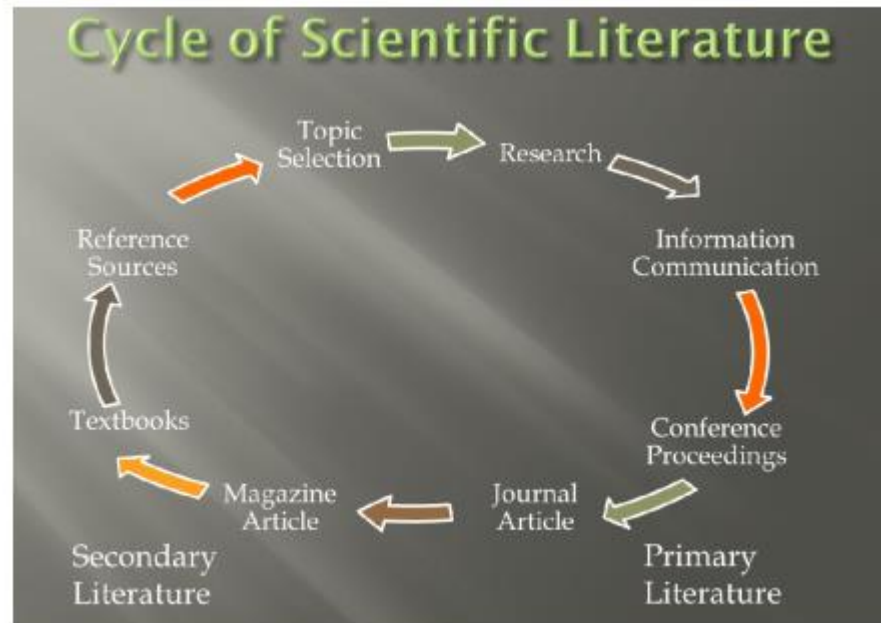
# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ 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.

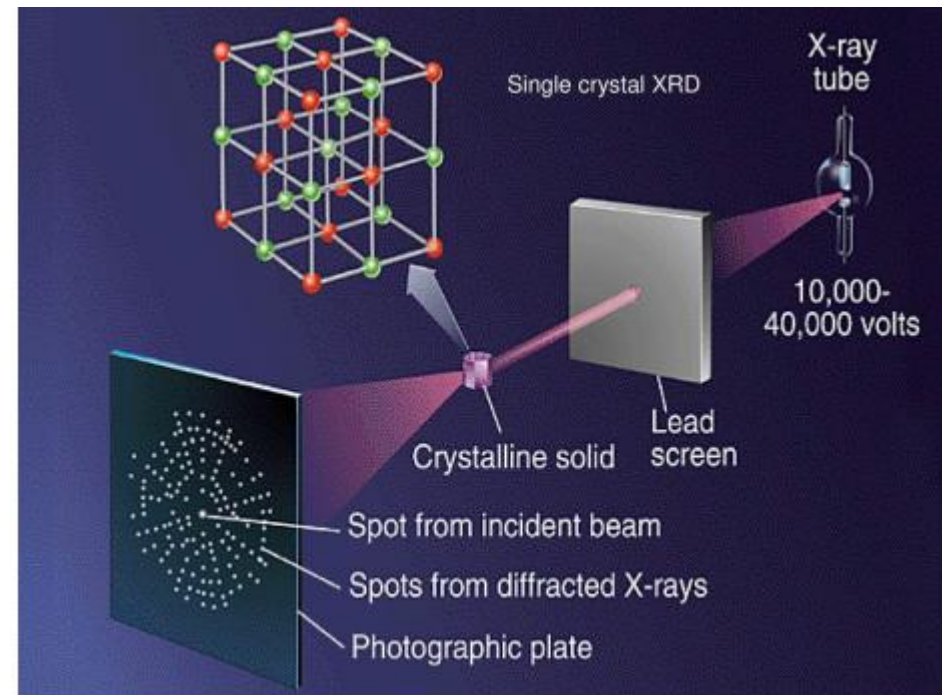


# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ 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



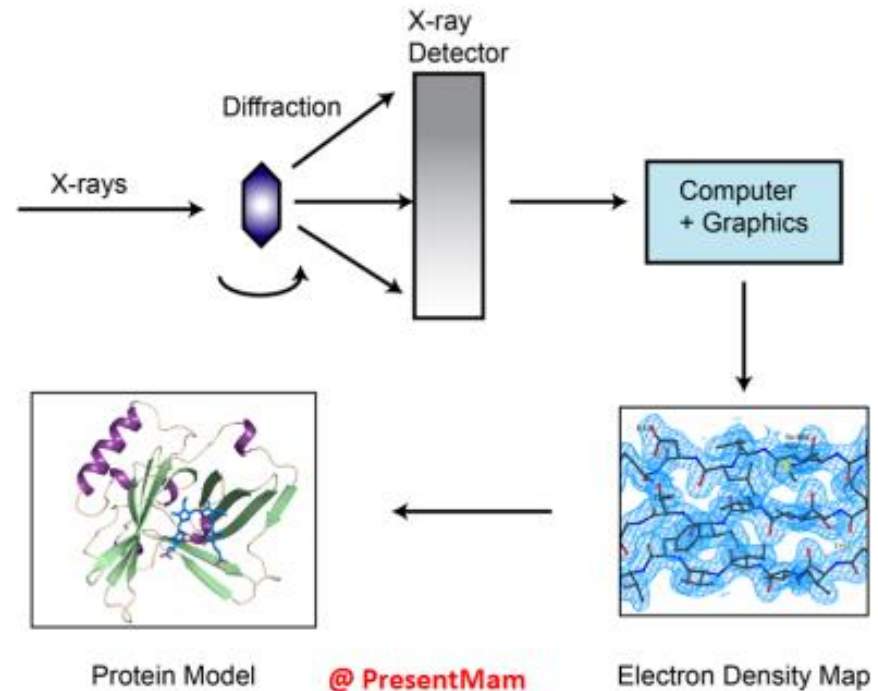
# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ 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

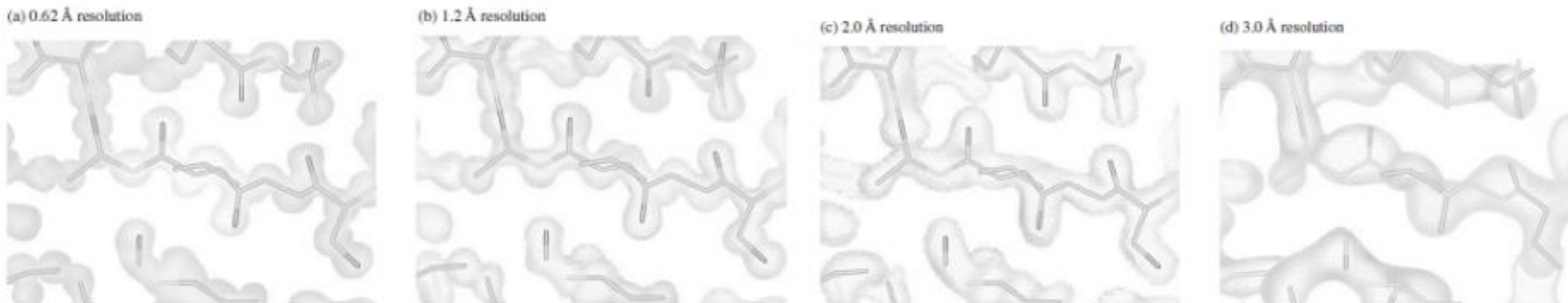
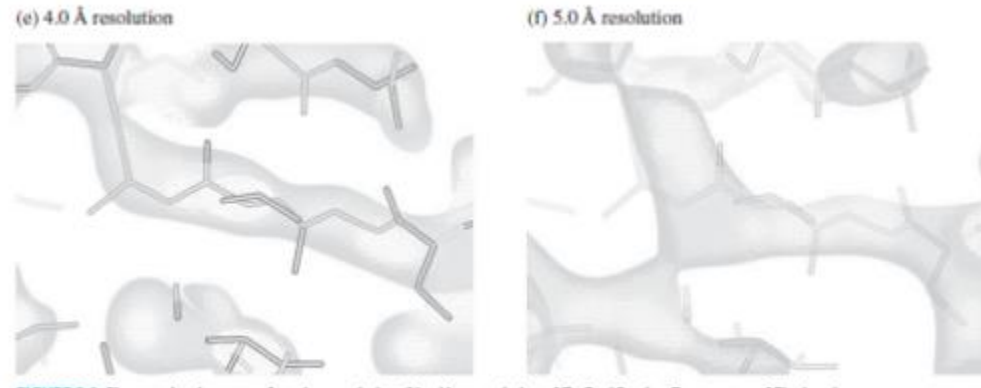


# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ 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.

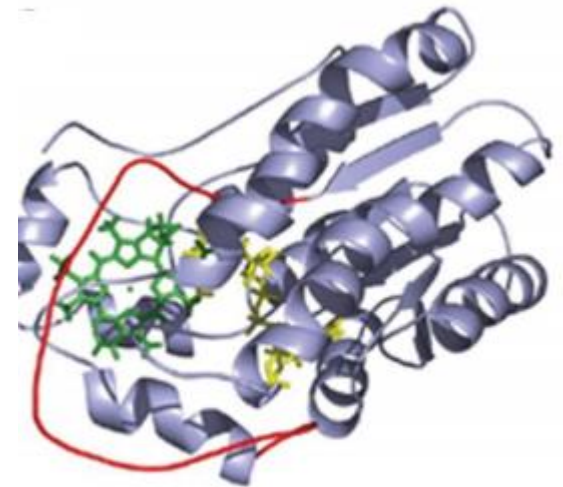


# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ 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.

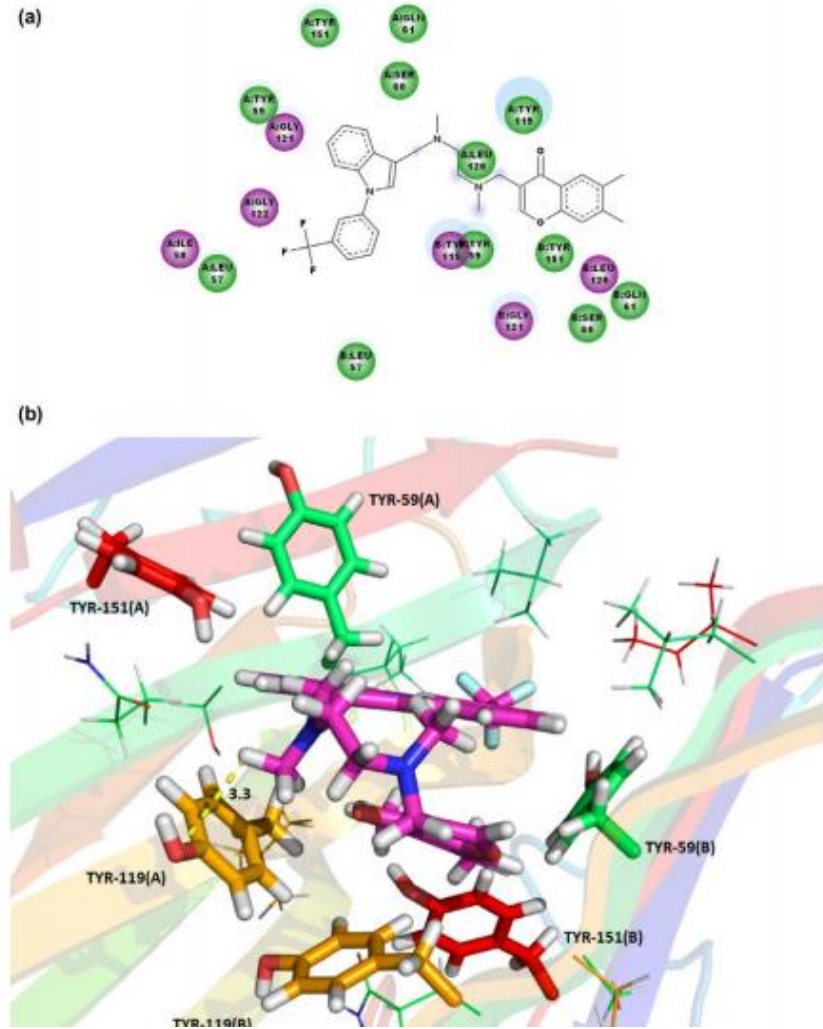


# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ 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.





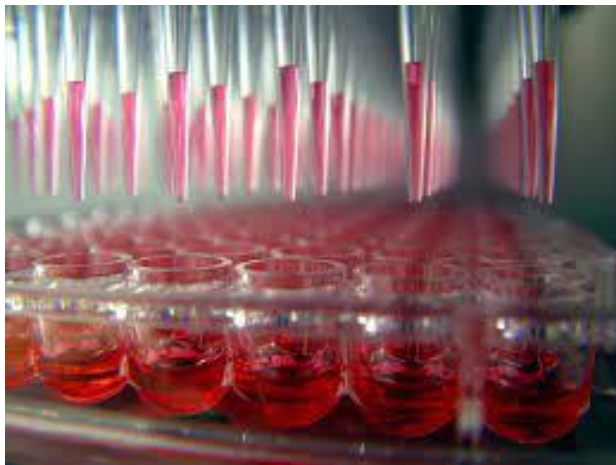
# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

- ✓ 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***



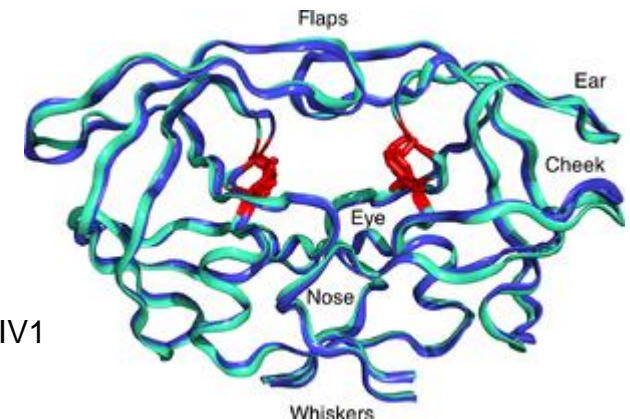
# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

✓ 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.

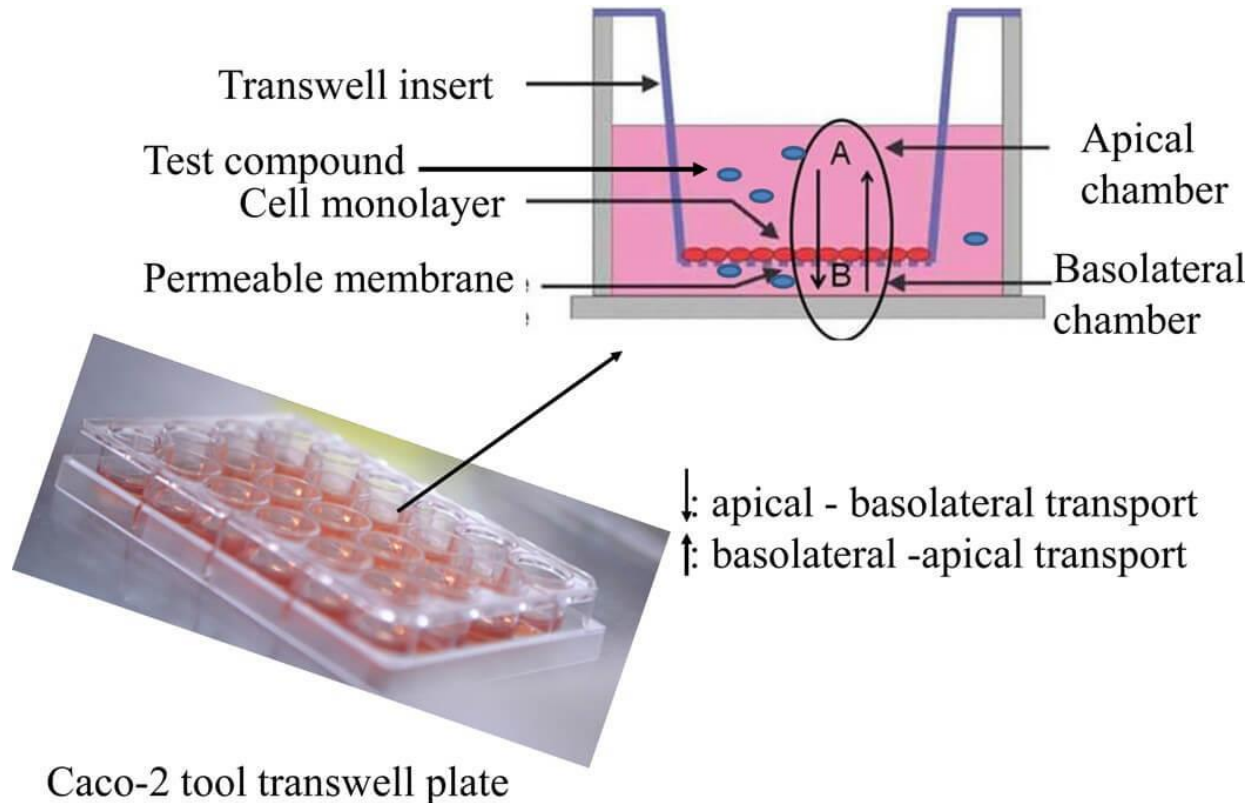
Farmaci antibatterici si saggiano *in vitro*. Si definiscono test *in vivo* solo quelli effettuati sull'uomo o sugli animali.

# 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.

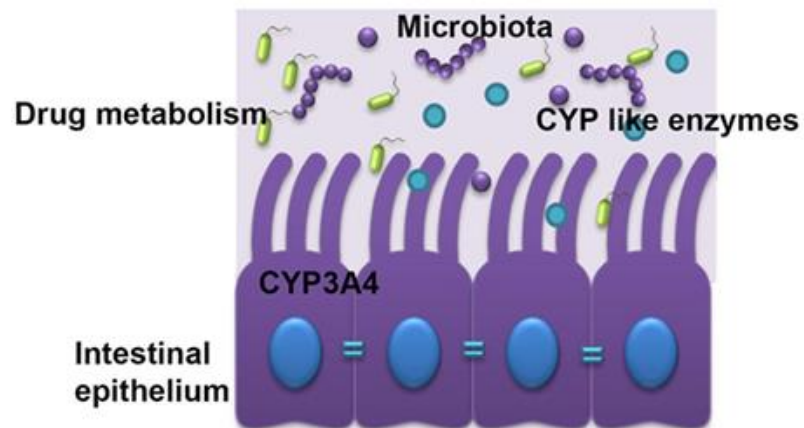
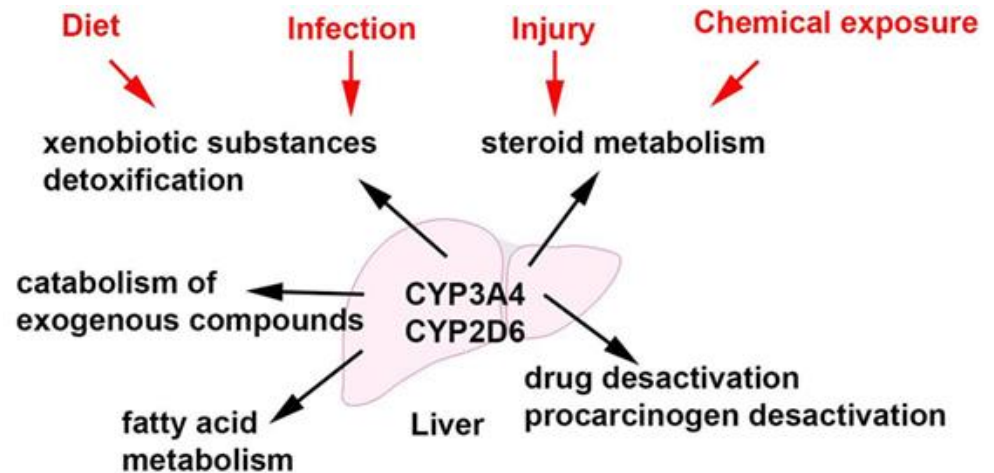


# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

✓ 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.



# 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

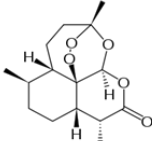

Plants in the News  
October 9 2015

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


**Qinghao**



**Artemisia annua**



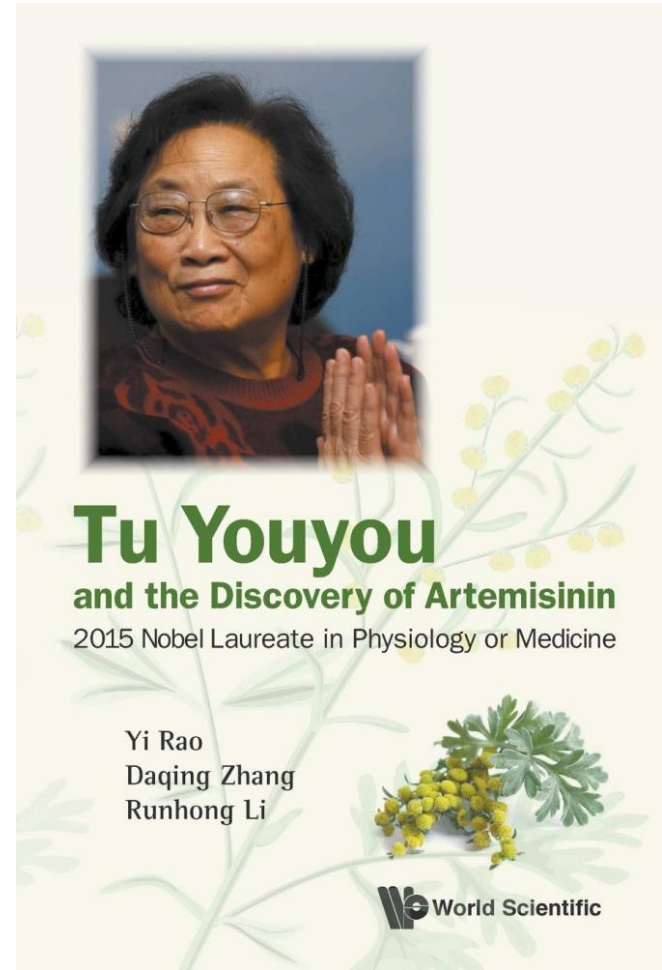
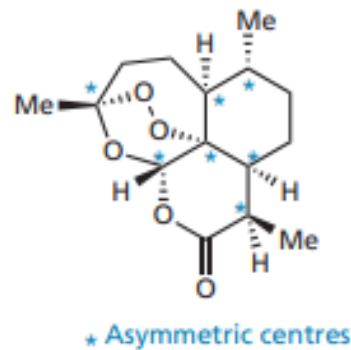
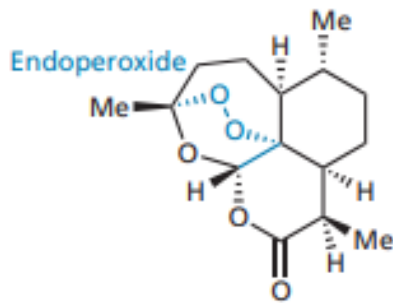
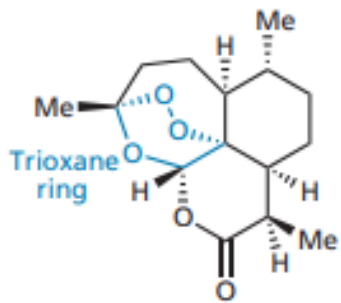
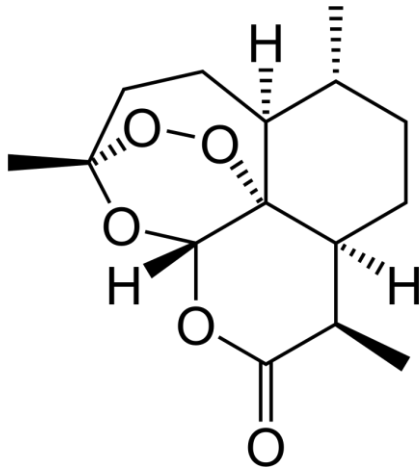
**Artemisinin, for  
the treatment of  
malaria**



0152

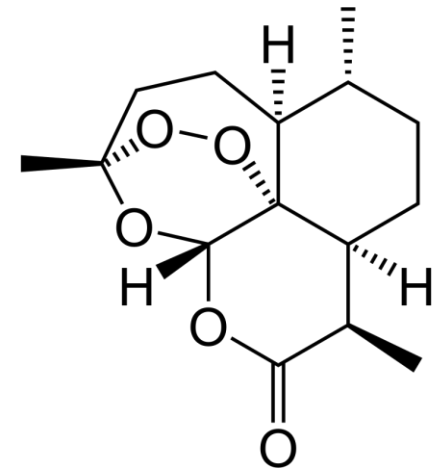
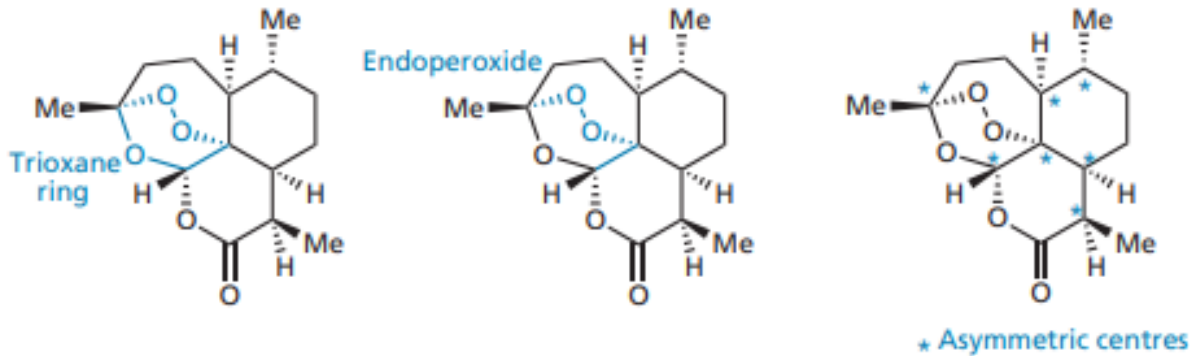
# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

- Screening di sostanze di origine naturale



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

- Screening di sostanze di origine naturale



- artemisinina

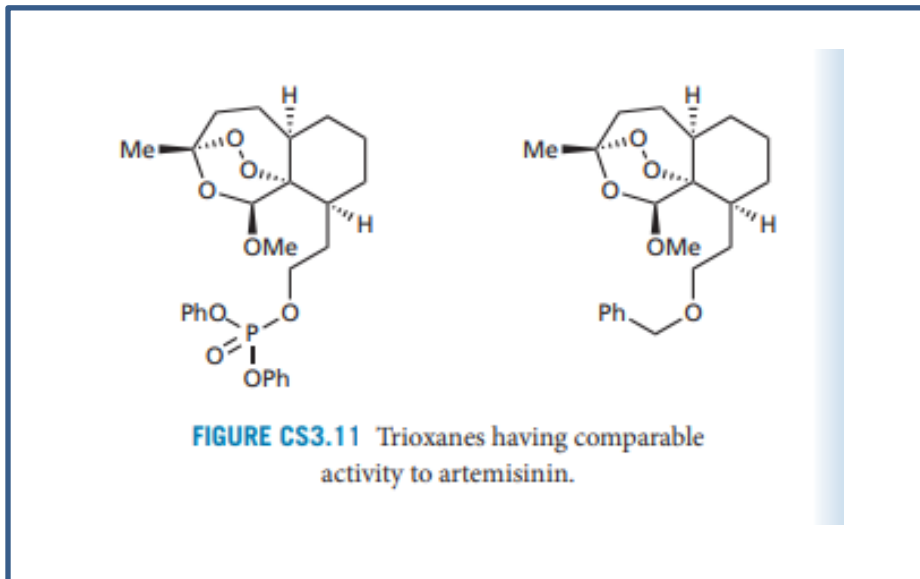
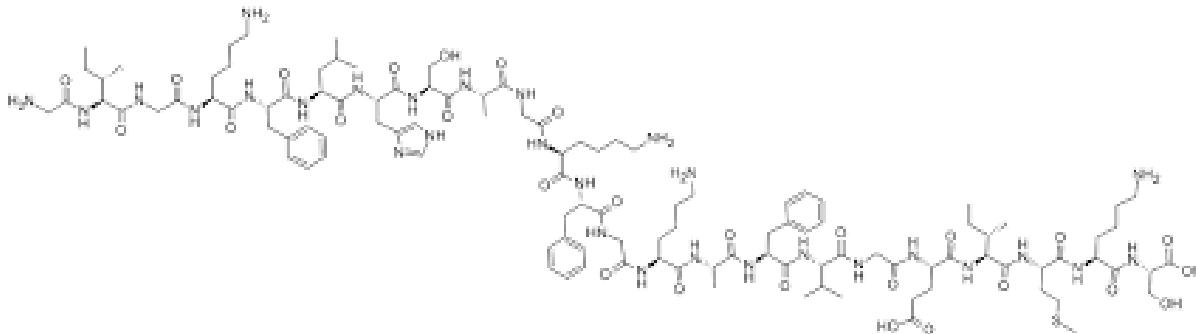


FIGURE CS3.11 Trioxanes having comparable activity to artemisinin.

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## - Screening di sostanze di origine naturale

- Regno vegetale: morfina, cocaina, digitale, chinina.
- Microrganismi: funghi e batteri (penicillina). Producono una grande varietà di agenti antimicrobici.
- Fonti marine: coralli, spugne, pesci e microorganismi marini.
- Fonti animali



- magainine



# 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

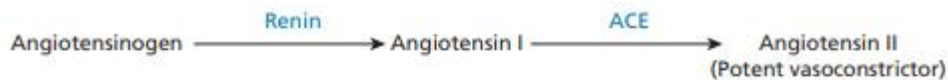
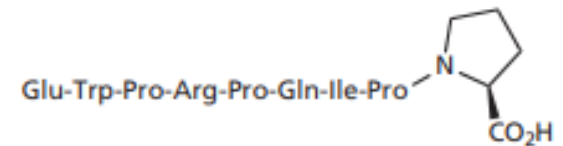


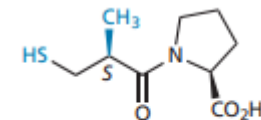
FIGURE CS2.1 Biosynthesis of angiotensin II.



FIGURE CS2.2 Reaction catalysed by angiotensin converting enzyme (ACE).



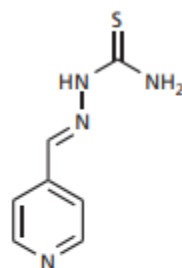
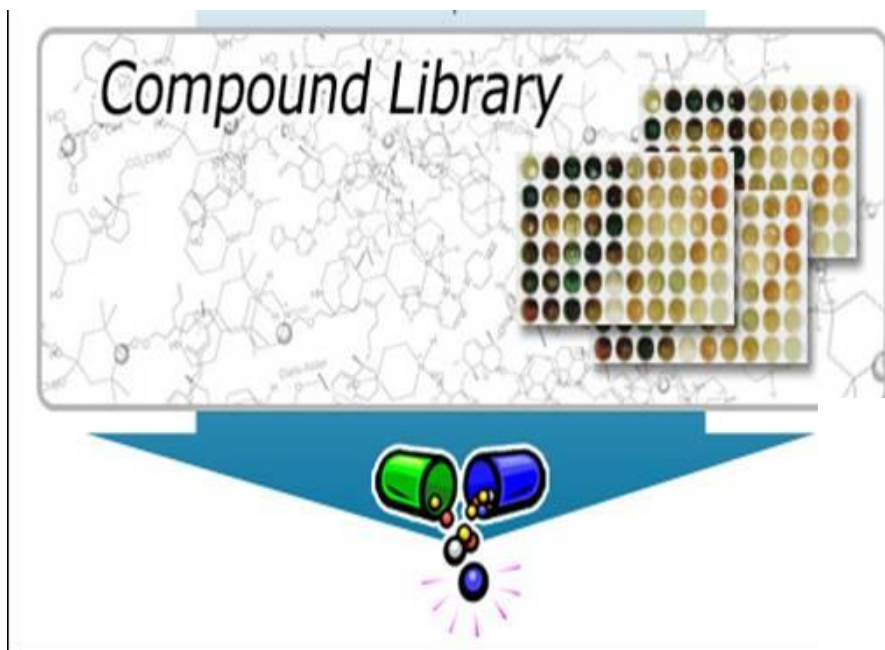
Teprotide;  $IC_{50}$  0.9  $\mu\text{M}$



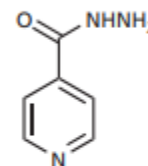
Captopril;  $IC_{50}$  23 nM

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

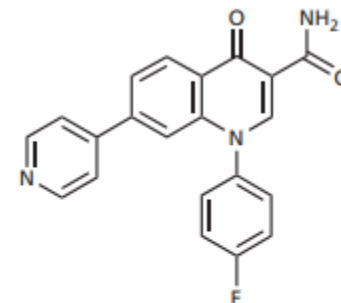
- Screening di «librerie» di prodotti di sintesi.



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

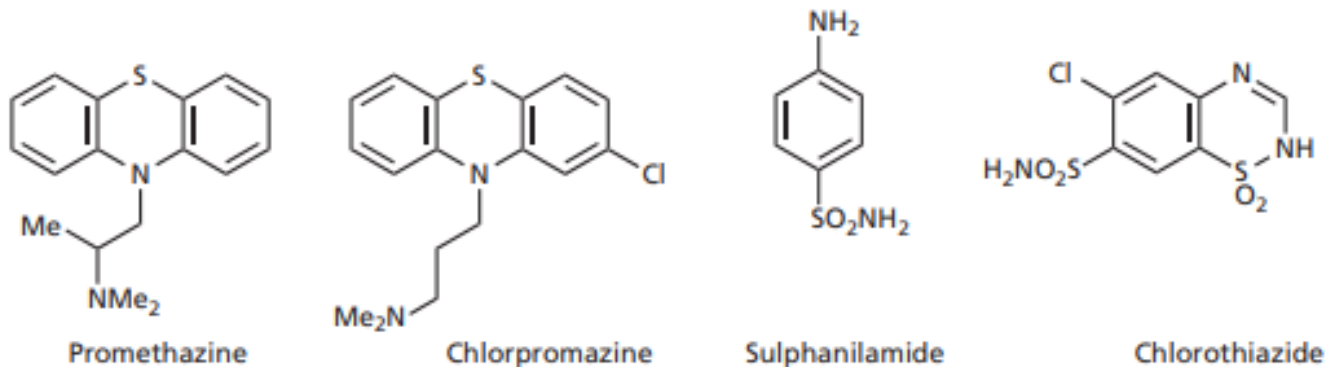


FIGURE 1 Drugs developed by enhancing a side effect.

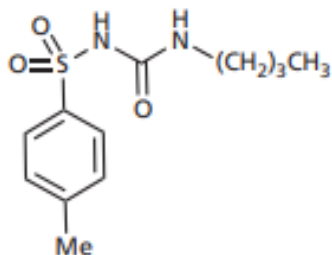


# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

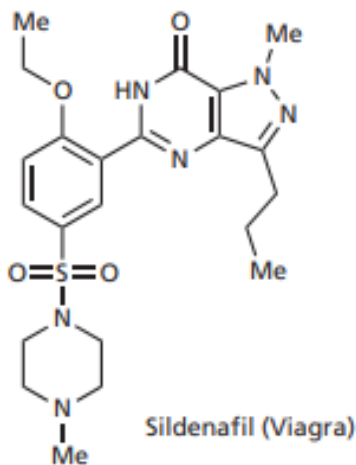
Farmaci già esistenti:

✓ L'amplificazione di un effetto collaterale

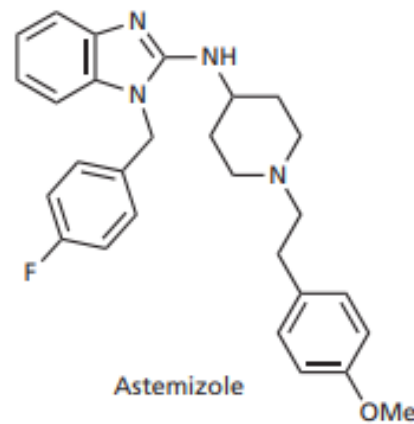
SOSA: Selective Optimization Of Side Activity



Tolbutamide



Sildenafil (Viagra)

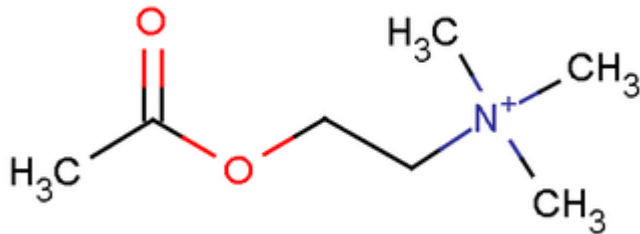
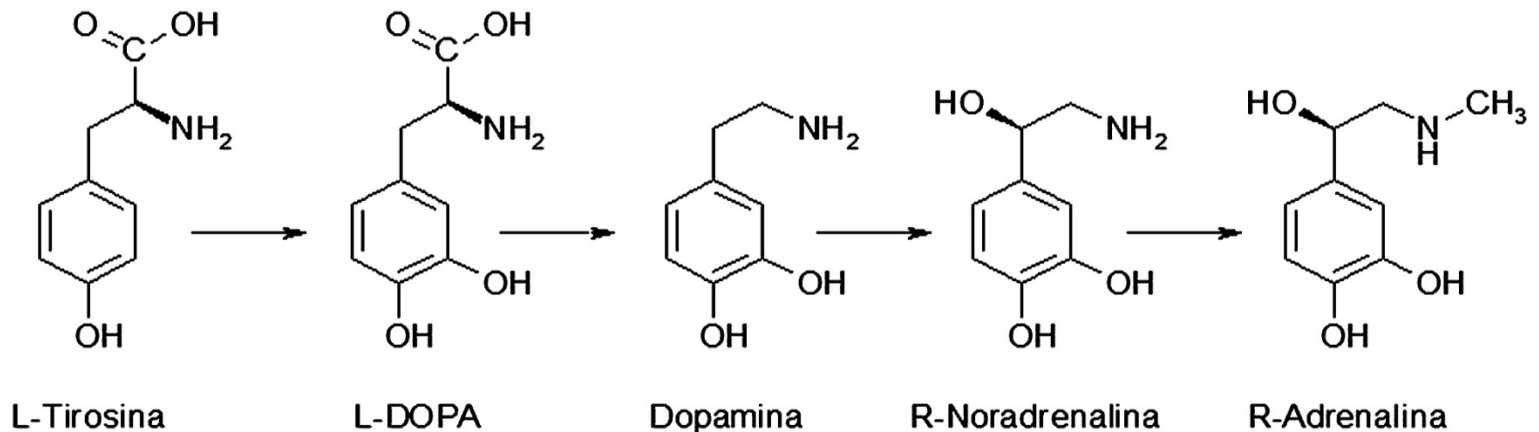


Astemizole

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:



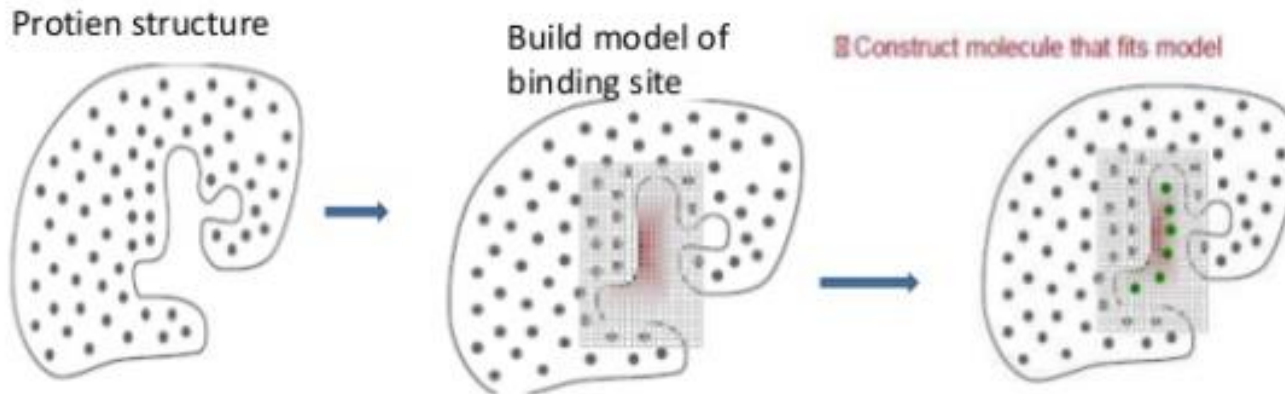
# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## 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.

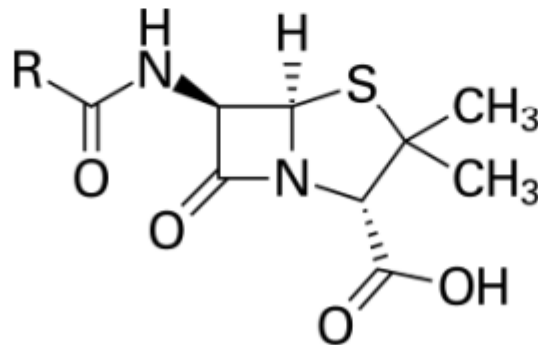
# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

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.

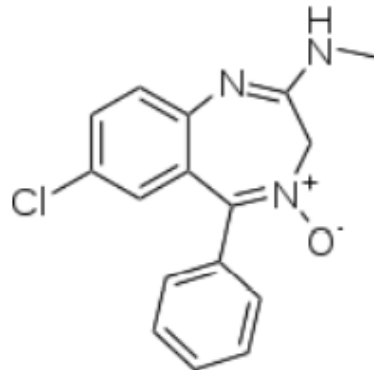


# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## 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**

- ✓ **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 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.

