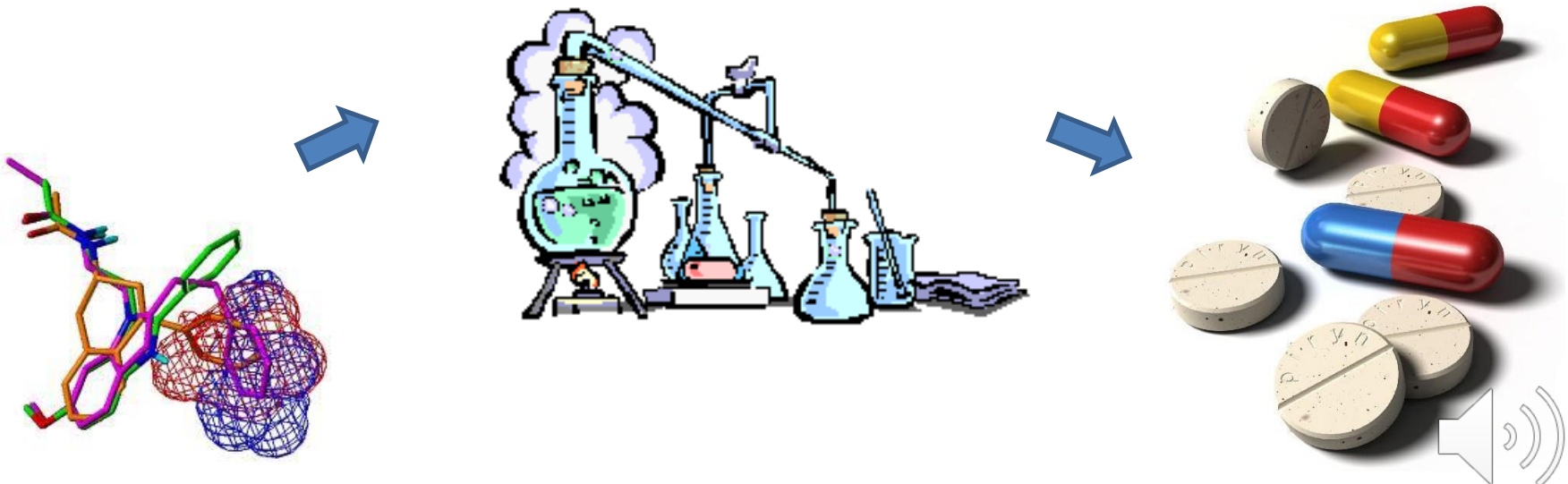


# Ricerca e sviluppo del farmaco e aspetti regolatori



# Scoperta dei farmaci

**Prima di cominciare:**

## **The Drug Discovery Process**

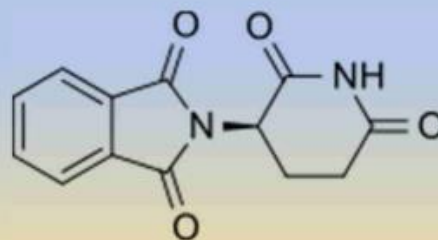
- ❖ L'argomento è molto vasto e da solo può costituire materia di un corso
- ❖ L'obiettivo è dare una visione generale del processo, dalla scelta dell'oggetto della ricerca fino all'individuazione di un candidato allo sviluppo
- ❖ Quanto riportato lo si ritrova su differenti sorgenti di informazione.

# Scoperta dei farmaci

## The Drug Discovery Process

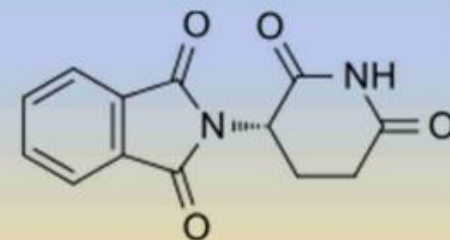
Oggi per portare una molecola sul mercato è necessario un tempo che va dai **12 ai 15 anni e oltre 1 miliardo di euro di investimenti**. Solo **1 molecola su 1 milione** diventa un farmaco e questo fa sì che il farmaceutico sia uno dei campi a più alto rischio di impresa.

.....Ma il gioco vale la candela?



(R)-thalidomide

Effetto sedativo



(S)-thalidomide

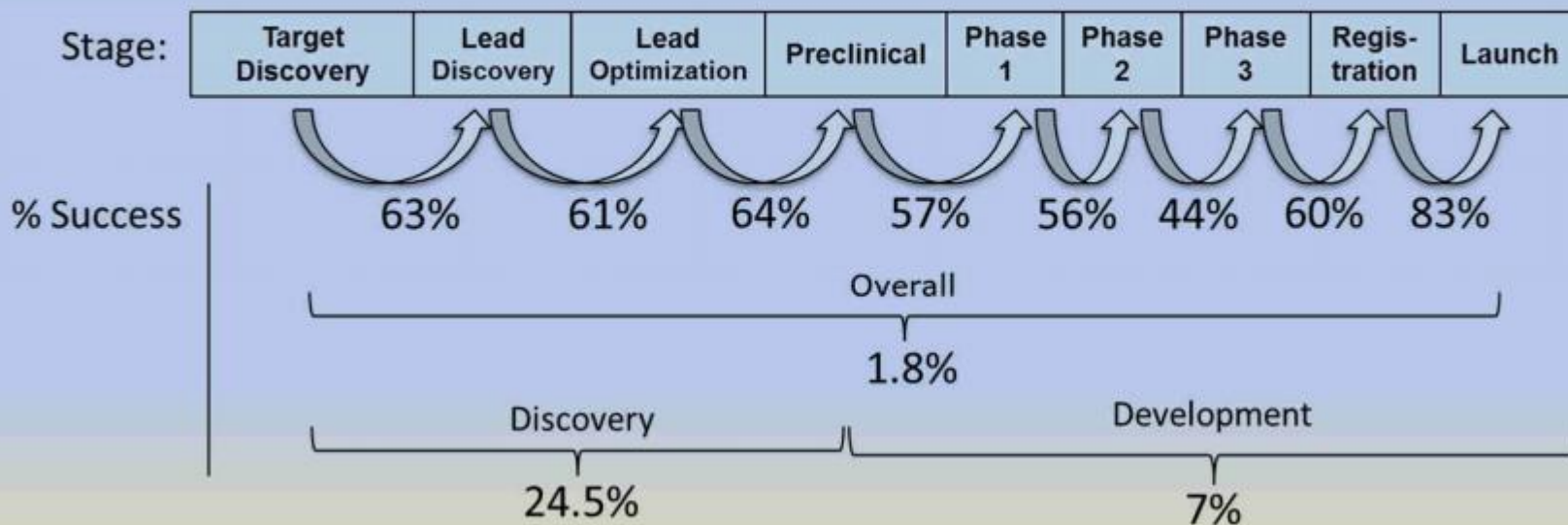
Effetto teratogeno

Sul mercato nel 1950, ritirato nel 1961

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## The Drug Discovery Process

### Progetti che raggiungono il successo



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

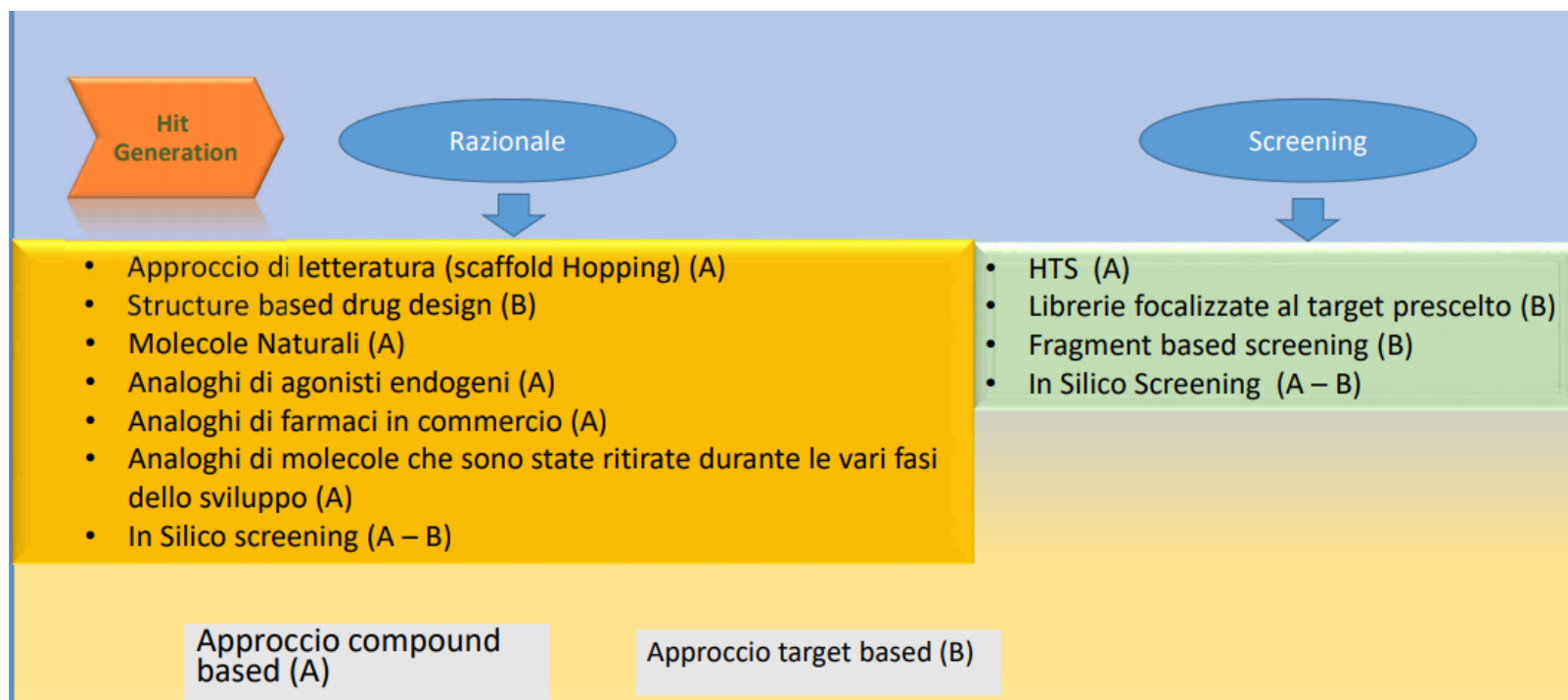
## ✓ Individuazione dell'hit

Una volta stabilito il target da colpire, è necessario individuare uno o più composti; in grado di interagire ed inibire lo stesso (hit compound/s). Si tratta di una molecola con modesta attività (solitamente nell'ordine del micromolare) in saggi biologici (enzimatici o cellulari). Di per sé, l'hit può presentare un profilo non ottimale (in termini di citotossicità, selettività, proprietà PK). Tuttavia, trattandosi di una fase primordiale nel contesto del lungo processo di scoperta di un farmaco, la valutazione di tali aspetti e l'ottimizzazione di tali caratteristiche verrà effettuata solo in un secondo momento (hit-to-lead optimization).

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## ✓ Individuazione dell'hit

Solitamente, la scoperta può derivare da uno screening biologico più o meno casuale (random o semi-random screening) condotto sulla libreria di composti a disposizione (importanza di avere a disposizione una libreria di composti ampia e con composti chimicamente eterogenei).



# Scoperta dei farmaci: Identificare il saggio biologico opportuno

## Aspetti dello screening

I composti vengono saggiati in soluzione solitamente disciolti in DMSO. I vantaggi nell'utilizzo di tale solvente includono:

- Basso punto di fusione ( $18^{\circ}$  C) con la possibilità di congelare i composti e ridurre la degradazione;
- Solubilizza la maggior parte dei composti organici;
- Elevato punto di ebollizione, dunque la concentrazione delle soluzioni stock rimane costante nel tempo (importante poiché il valore di attività desunto si basa su una relazione concentrazione-effetto)

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Aspetti dello screening

La purezza dei composti deve essere elevata. La presenza di impurezze quali catalizzatori o tracce di solvente può interferire con i risultati dei saggi e dare falsi positivi (o negativi).

Inoltre, la presenza di tali impurezze può contribuire alla degradazione dei composti in stock.



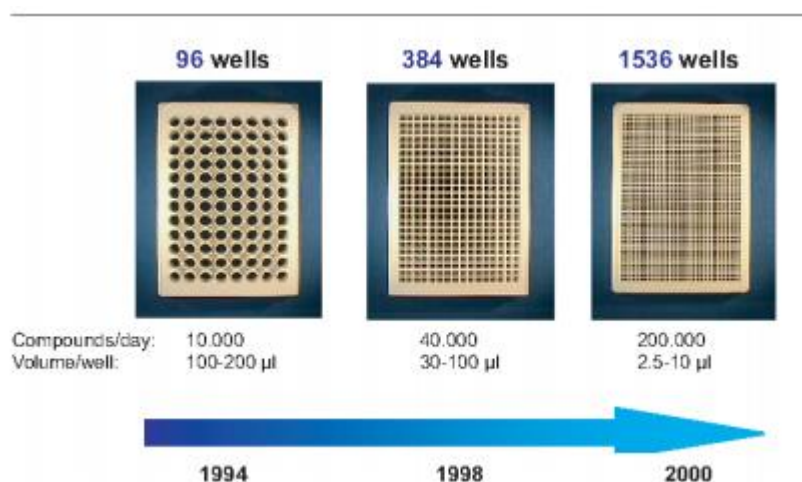
# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Aspetti dello screening

Lo screening è condotto in piastre da 96, 384, 1536 pozzetti, a seconda del numero di composti saggiati.

Ogni pozzetto è occupato da un composto.

HTS richiedono piccole quantità di composto e permettono di saggiare un elevato numero di molecole.



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Library

La library di composti di un gruppo di ricerca è costruita nel tempo, campionando le quantità residue di prodotti finali ed intermedi di sintesi. Librerie di composti possono anche essere acquistate o vendute da fornitori commerciali e aziende.

Allo stesso modo è possibile «affittare» delle librerie: il fornitore della libreria entra in accordo con il gruppo di ricerca interessato a testare i composti nei confronti di un dato target; in casi di risultati positivi, il fornitore (es azienda) riceve un bonus.

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Fragment-based screening

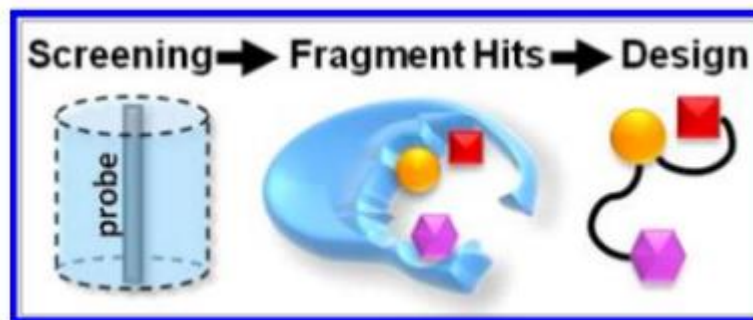
Esso prevede l'analisi di frammenti molecolari piuttosto che vere e proprie molecole.

Essi hanno massa molecolare inferiore (120-250 uma) e dunque una minore complessità strutturale.

Di conseguenza, stabiliscono minori interazioni con un dato target rispetto a molecole più complesse.

Inoltre, l'attività dei frammenti sarà inferiore a quella di molecole finite e più complesse.

Tuttavia tale approccio può guidare la costruzione di un hit a partire dai singoli frammenti.

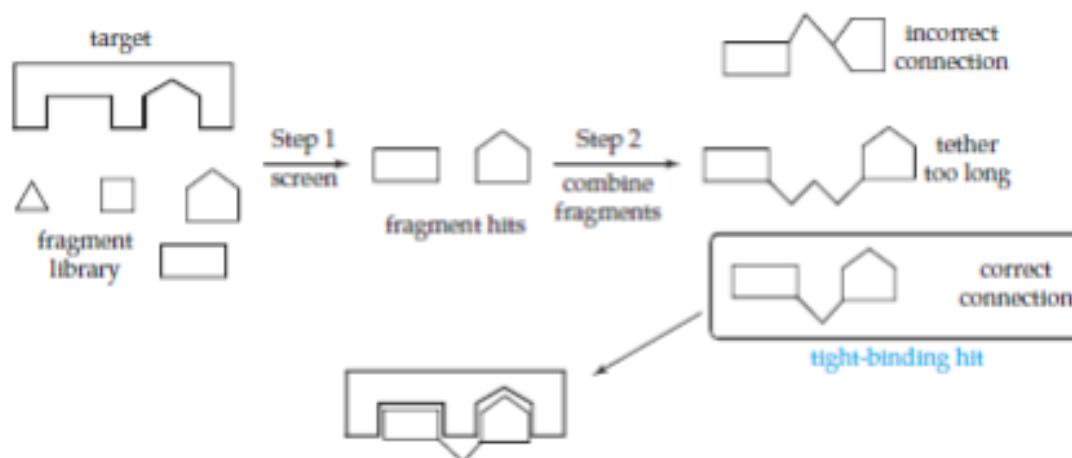


# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Fragment-based screening

Se due o più frammenti molecolari presentano una buona attività inibitoria (solitamente nell'ordine del mM), è possibile connetterli per generare una molecola dotata di migliore attività.

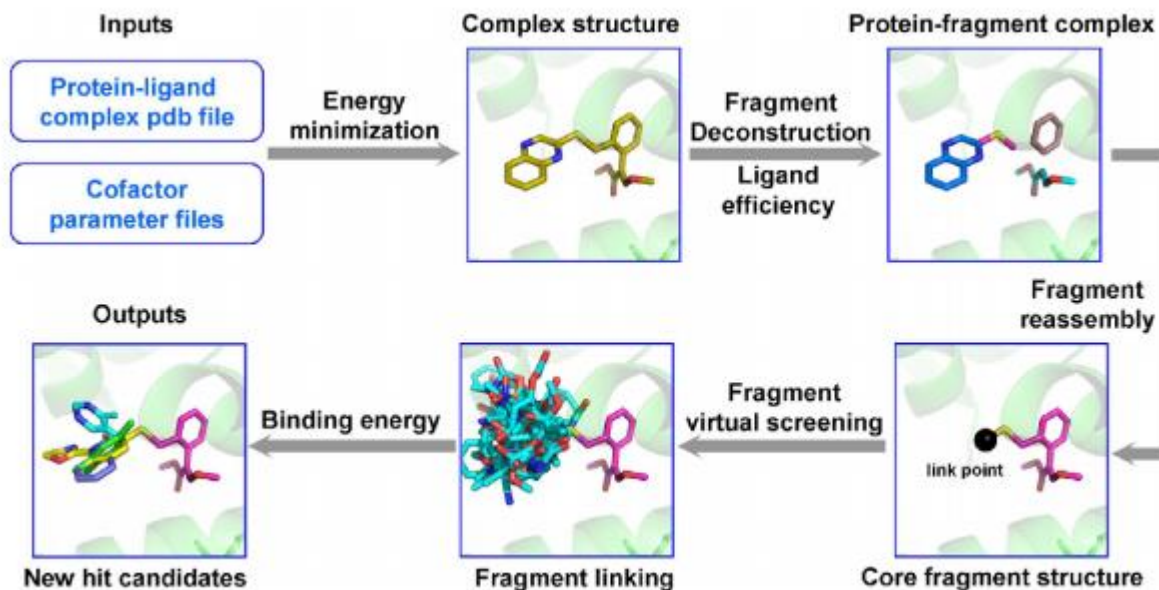
Tale approccio di hit discovery risulta particolarmente utile nel caso di target con due o più tasche di legame al sito attivo, ognuna in grado di legare i singoli frammenti



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Fragment-based screening

La difficoltà può consistere nella modalità di connessione dei frammenti (linkers e lunghezza degli stessi). A tal fine è necessario un modello 3D del target; studi NMR, di molecular modeling o cristallografici (es frammento co-cristallizzato con il target) possono aiutare in tale processo.



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Dinamic combinatorial chemistry

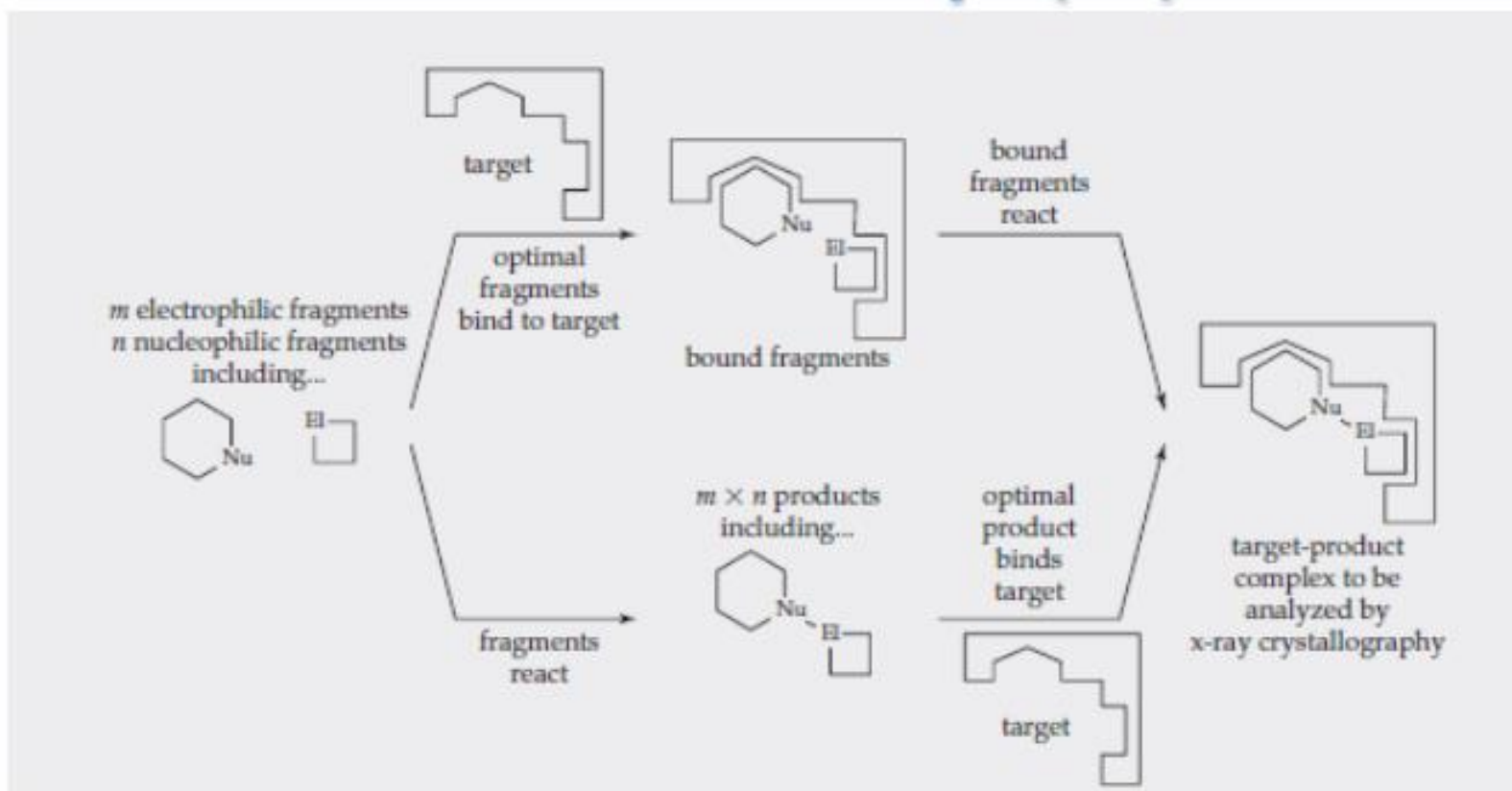
Tramite la tecnica di dinamic combinatorial chemistry è il target stesso a «scegliere» i frammenti ottimali per il binding.

Frammenti con reattività complementare (nucleofilo-elettrofilo) reagiscono in presenza del target.

La proteina può legare i frammenti separatamente ed indurre successiva reazione tra gli stessi o selezionare il miglior prodotto ottenuto da reazione preliminare tra i frammenti stessi.

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

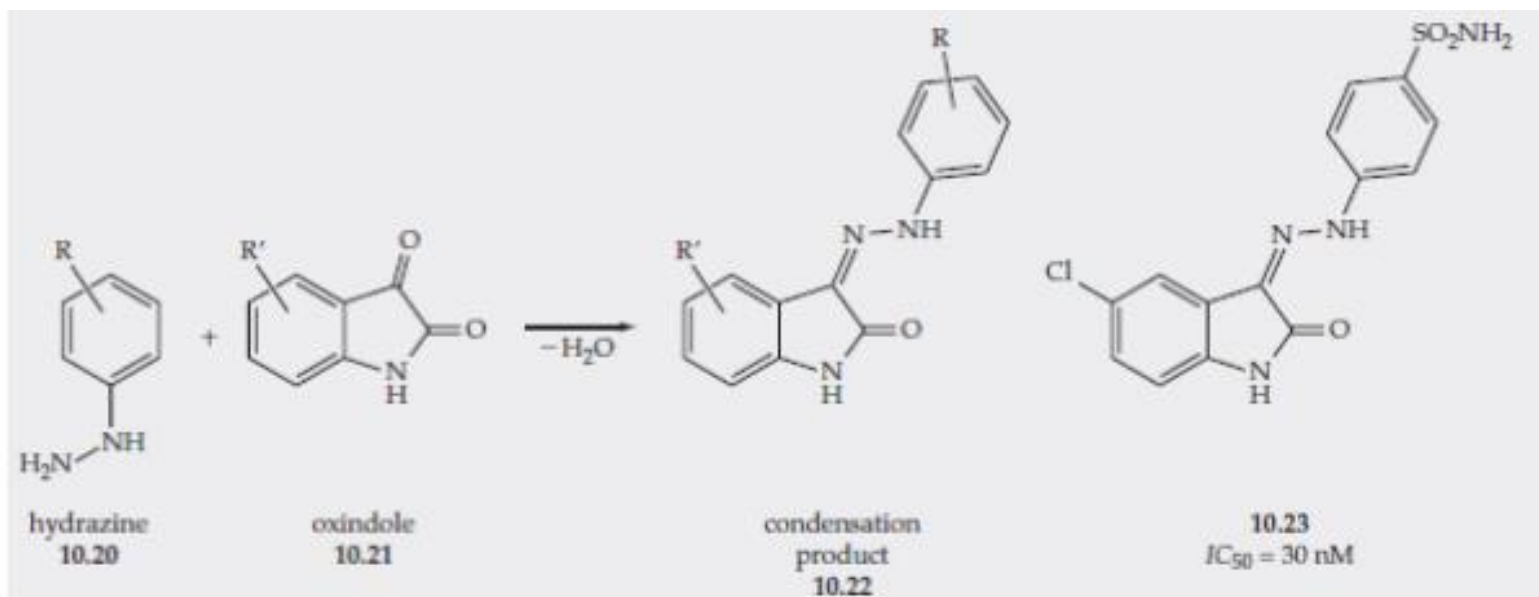
Dinamic combinatorial chemistry



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Dinamic combinatorial chemistry

L'analisi cristallografica del complesso consente di individuare il prodotto di reazione e stabilire la modalità di binding.



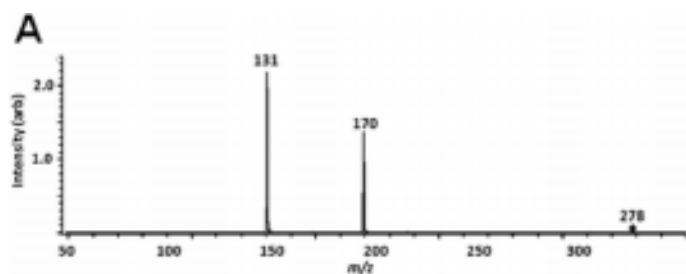


# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Spettrometria di massa

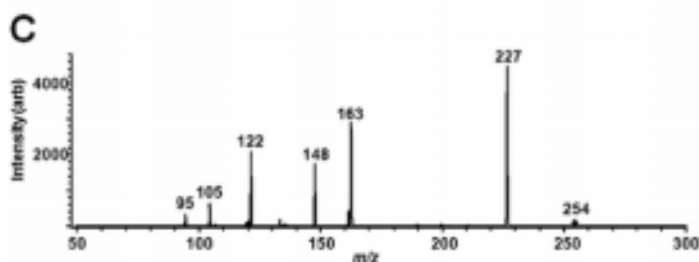
Anche la spettrometria di massa può essere impiegata per lo screening di una serie di frammenti.

In presenza del target, vengono a costruirsi dei legami tra i frammenti grazie alla presenza di linkers reattivi; i complessi frammenti-proteina generano picchi molecolari individuabili dallo strumento.



**B**

+ve ESI		
m/z	Adduct	Structure
278	+Na <sup>+</sup>	
131	+Na <sup>+</sup>	
170	+Na <sup>+</sup>	



**D**

-ve ESI		
m/z	Adduct	Structure
254	-H <sup>+</sup>	
95	-H <sup>+</sup>	
105	-H <sup>+</sup>	
122	-H <sup>+</sup>	
148	-H <sup>+</sup>	
163	-H <sup>+</sup>	
227	-H <sup>+</sup>	

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Virtual screening

E' un approccio computazionale; vengono simulate al computer le interazioni possibili tra molecole di una library ed il target di interesse.

Le molecole più promettenti (score migliore) vengono selezionate, sintetizzate e sottoposte a screening.

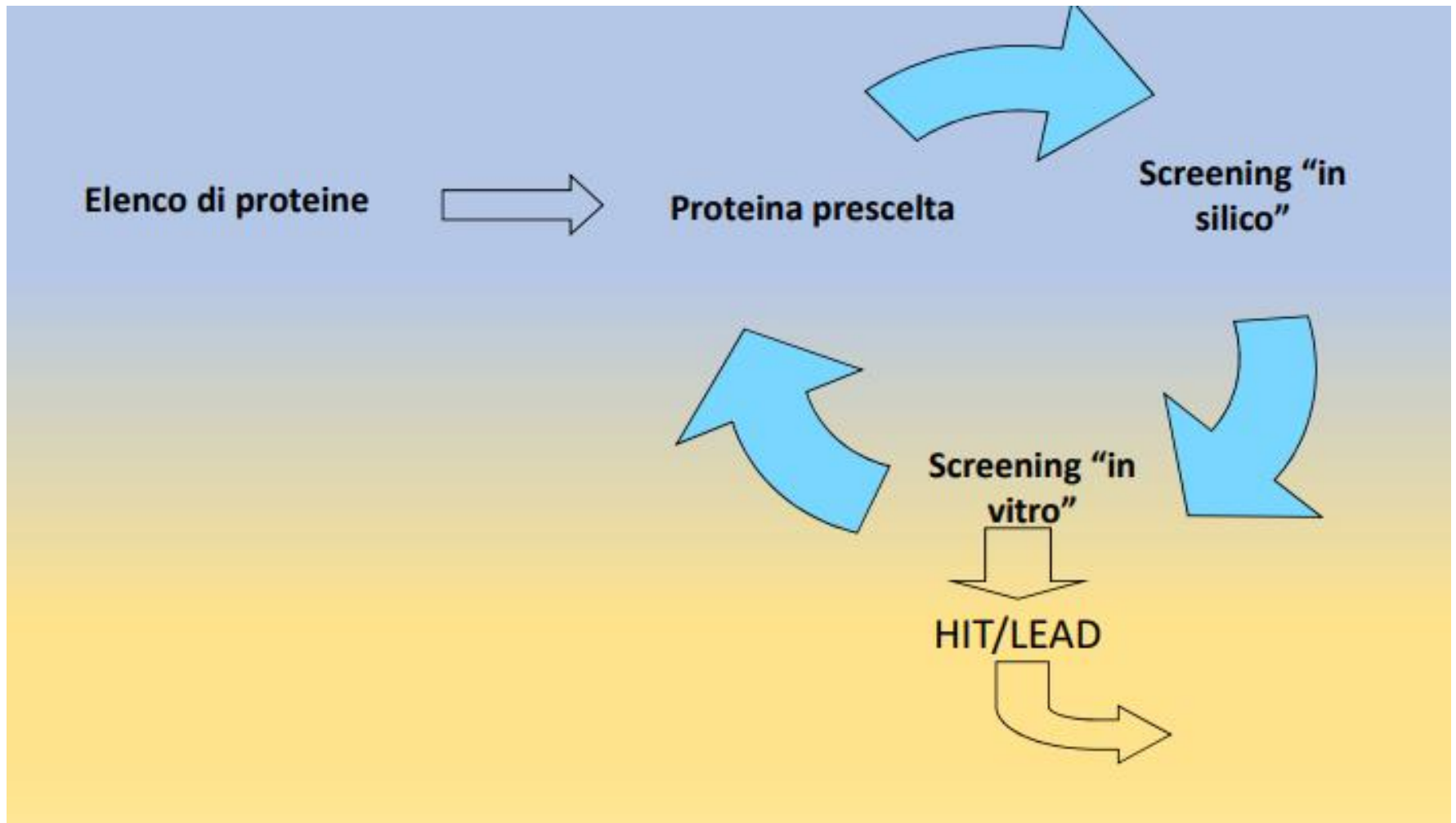
Tale approccio implica l'esatta conoscenza del target (cristallo, studi NMR).

Al contrario, trattandosi di una previsione, è possibile simulare l'interazione di una qualsiasi molecola, anche se essa non è stata ancora sintetizzata.

D'altronde, è necessario fare una previsione su molecole accessibili da un punto di vista sintetico.

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Virtual screening



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Virtual screening

Bisogna considerare diverse aspetti, tra cui la conformazione assunta dal target e dalla molecola nell'interazione.

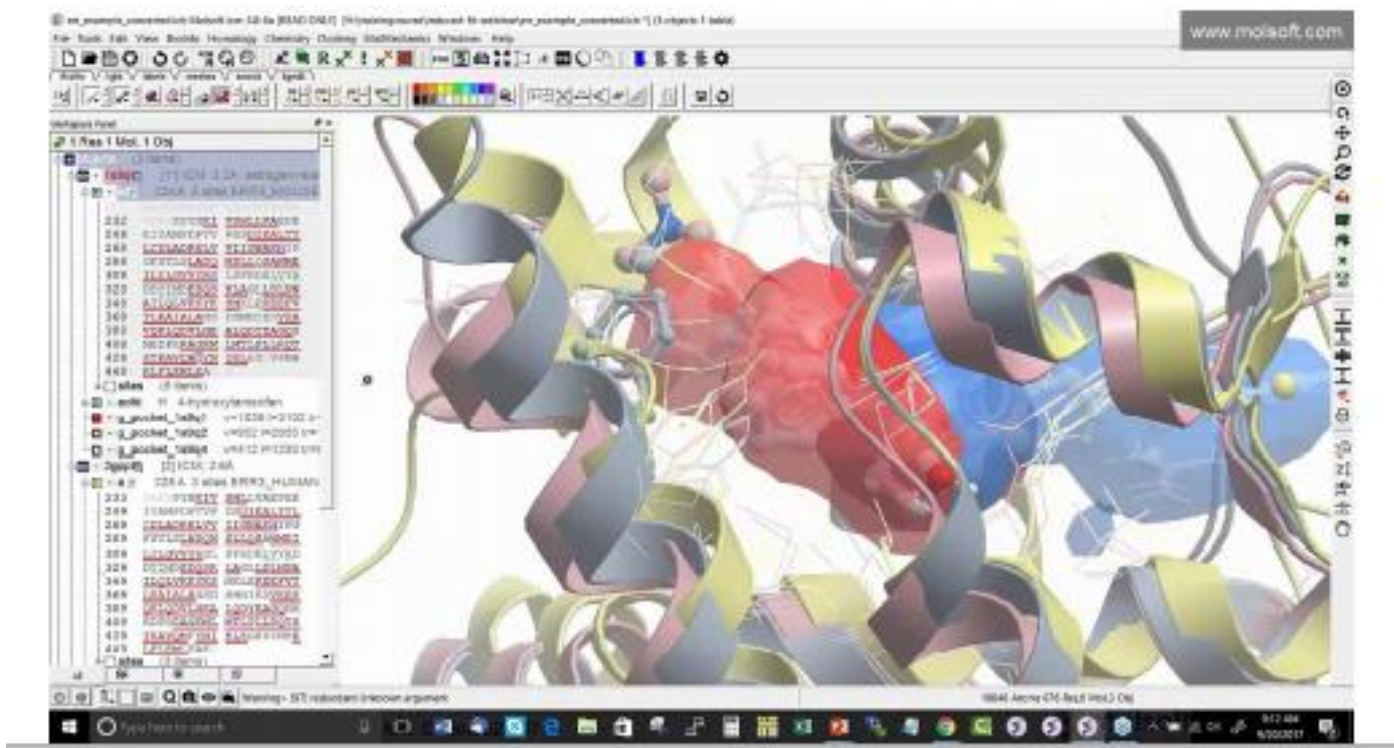
Le possibili conformazioni che essi possono assumere sono molteplici ma solo una (o poche) sono quelle che effettivamente il ligando tenderà ad assumere all'interno del target.

Affinchè le previsioni siano quanto più possibili affidabili, i programmi odierni più avanza; tengono conto di tale aspetti nonché altri fattori quali pH, tautomeria, stereochimica.

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Virtual screening

Una volta stabilite le conformazioni ottimali di target e ligando, si procede al docking vero e proprio, ponendo a contatto proteina e molecola e consentendo l'induced-fit, per cui il legame del ligando induce cambiamenti conformazionali nel target e viceversa fino a raggiungere una condizione di minimo energetico.



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Virtual screening

Il contributo delle varie interazioni instaurate tra ligando e target costituiscono uno score; lo score migliore è proprio dei ligandi più promettenti. Ovviamente, trattandosi di una previsione, è possibile incorrere in falsi positivi, per cui ligandi con score molto buono in studi di docking potrebbero non essere altrettanto promettenti in seguito ad effettiva valutazione biologica del prodotto di sintesi. Per questo, è bene valutare lo score attraverso diversi algoritmi di calcolo del punteggio per non incorrere in falsi positivi.

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Virtual screening

Una volta identificati i prodotti con score più alto, si procede alla sintesi (o all'acquisto, qualora si tratti di composti noti e commerciali) ed alla successiva valutazione biologica/biochimica (es inibizione enzimatica)

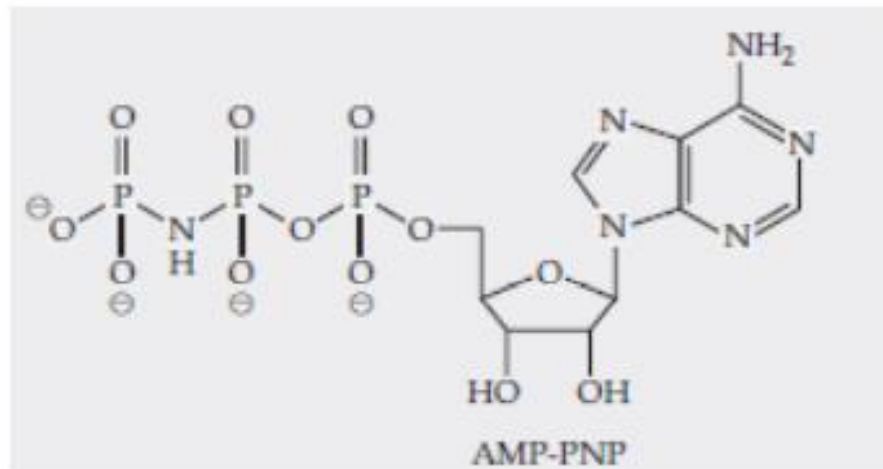
# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Virtual screening

La protein chinasi B utilizza ATP per fosforilare altri enzimi.

Alterazioni dell'attività enzimatica sono associate a patologie quali il cancro.

Fu iniziato un virtual screening a partire dalla struttura cristallografica della proteina in complesso AMP-PNP, un analogo non reattivo dell'ATP.





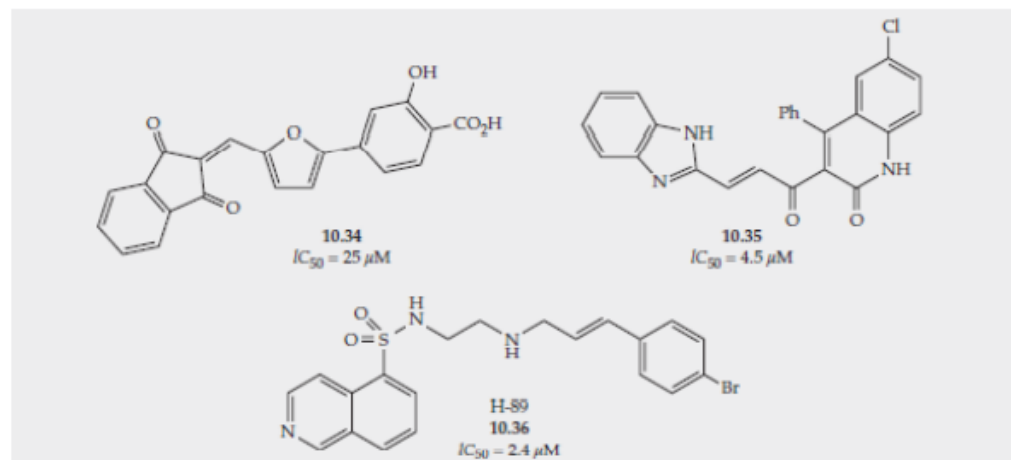
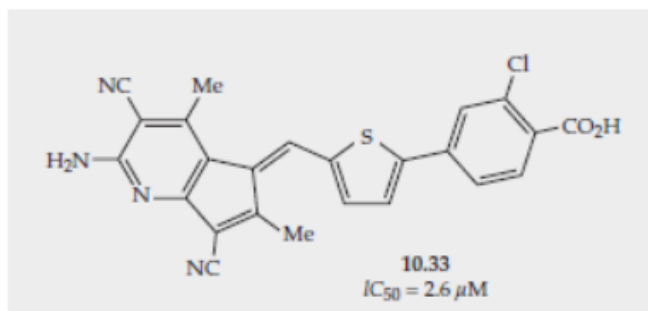
# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Virtual screening

Una libreria di 50000 composti fu soggetta a docking e lo score fu calcolato tramite algoritmo Drugscore.

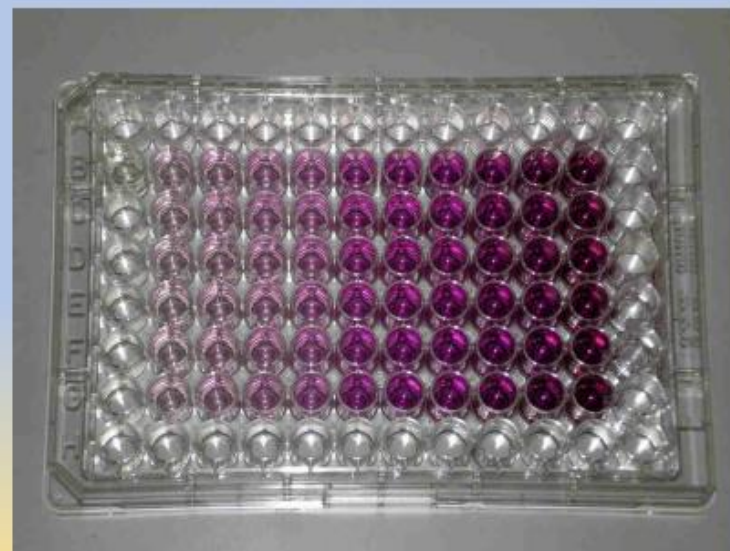
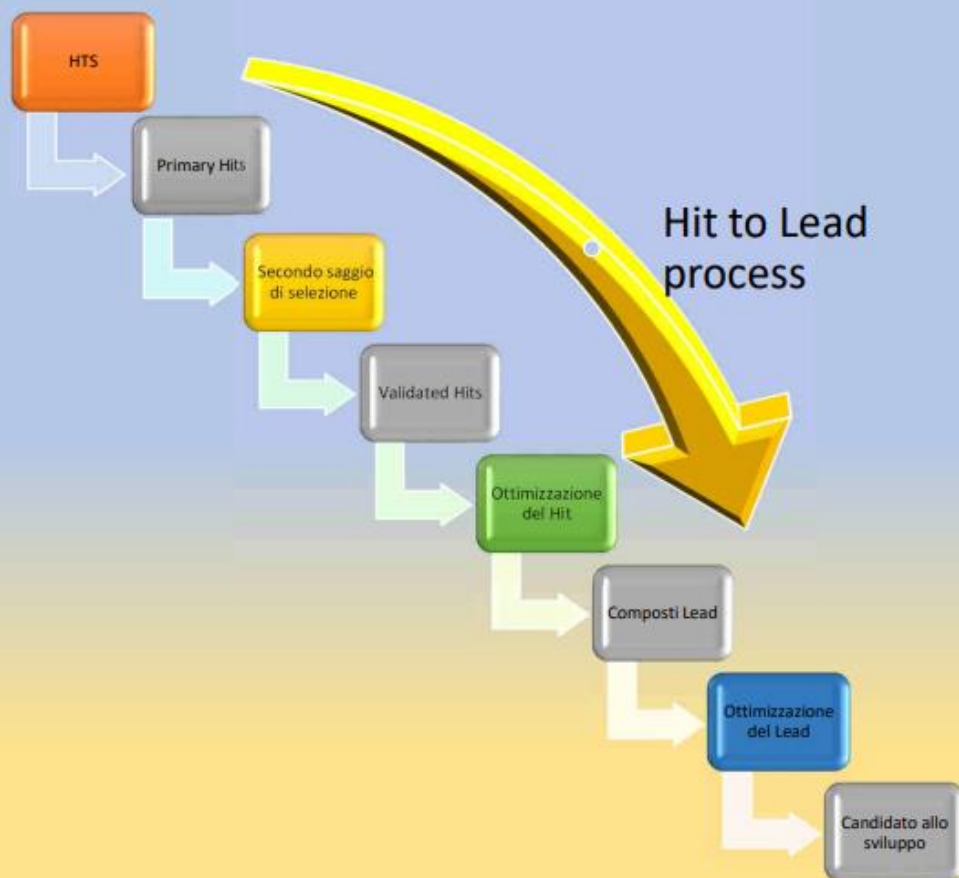
Lo score dei migliori 4000 composti fu valutato anche con altri due metodi, Goldscore e Chemscore che risultarono in accordo (assegnando il migliore score) a 200 composti.

Valutando tali 200 composti ne furono esclusi 100 a causa di interazioni sfavorevoli. I rimanenti furono sottoposti a screening, individuando hit con attività paragonabile a quella di un noto inibitore di PKB descritto in letteratura.



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Hit to lead process



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Hit to lead process

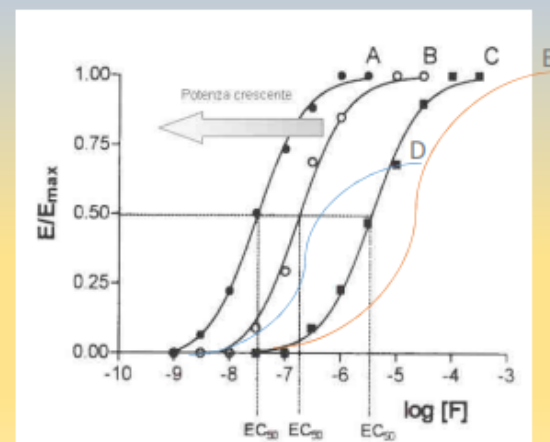


Risultato intermedio: Confirmed Hit cioè una molecola che si è confermata positiva quando il *saggio di screening in vitro* è ripetuto e mostra un grado di specificità, cioè il risultato non è dovuto ad effetti generici (ad es. citotossicità) o interferenze con il sistema di lettura del test.

## Obiettivo: ridurre drasticamente il numero di molecole per la Hit Optimization

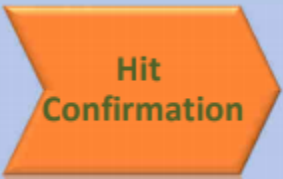
Processo molto rigoroso. Dare priorità in base a un profilo esteso:

- ❖ Farmacologia: Efficacia e Potenza, valutazione preliminare
- ❖ Caratteristiche Chimico-fisiche: sperimentali e predizione
- ❖ ADME-Tox in silico
- ❖ Caratteristiche strutturali
- ❖ Brevettabilità
- ❖ Trattabilità sintetica



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Hit to lead process

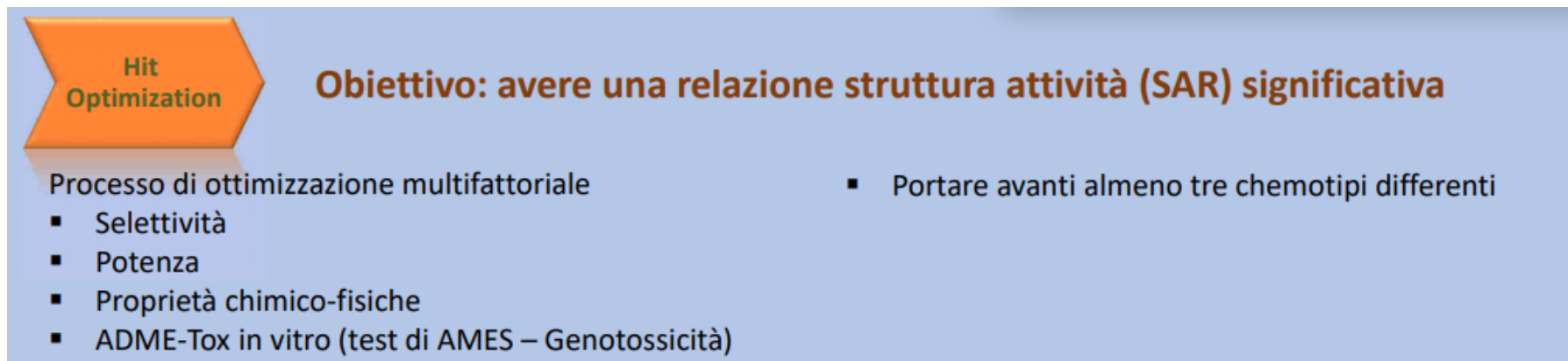


Risultato finale: Validated Hit: Un *confirmed Hit* che mostra selettività e una curva concentrazione-effetto nei confronti di un secondo test correlato al target selezionato. Generalmente il primo è un test enzimatico o di binding recettoriale; il secondo può essere la stessa tipologia ma in presenza di altri attori del contesto biochimico di riferimento. Oppure può essere un test cellulare o un test funzionale (organo isolato).

La struttura chimica deve essere provata in maniera inequivocabile

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

## Hit to lead process



The diagram shows a blue rectangular area with a light blue background. On the left, there is an orange arrow pointing right, containing the text 'Hit Optimization'. To the right of the arrow, the text 'Obiettivo: avere una relazione struttura attività (SAR) significativa' is written in a dark brown font. Below this, there are two columns of bullet points. The left column lists 'Processo di ottimizzazione multifattoriale' followed by four sub-bullets: 'Selettività', 'Potenza', 'Proprietà chimico-fisiche', and 'ADME-Tox in vitro (test di AMES – Genotossicità)'. The right column has a single bullet point: 'Portare avanti almeno tre chemotipi differenti'.

**Hit Optimization**

**Obiettivo: avere una relazione struttura attività (SAR) significativa**

Processo di ottimizzazione multifattoriale

- Selettività
- Potenza
- Proprietà chimico-fisiche
- ADME-Tox in vitro (test di AMES – Genotossicità)

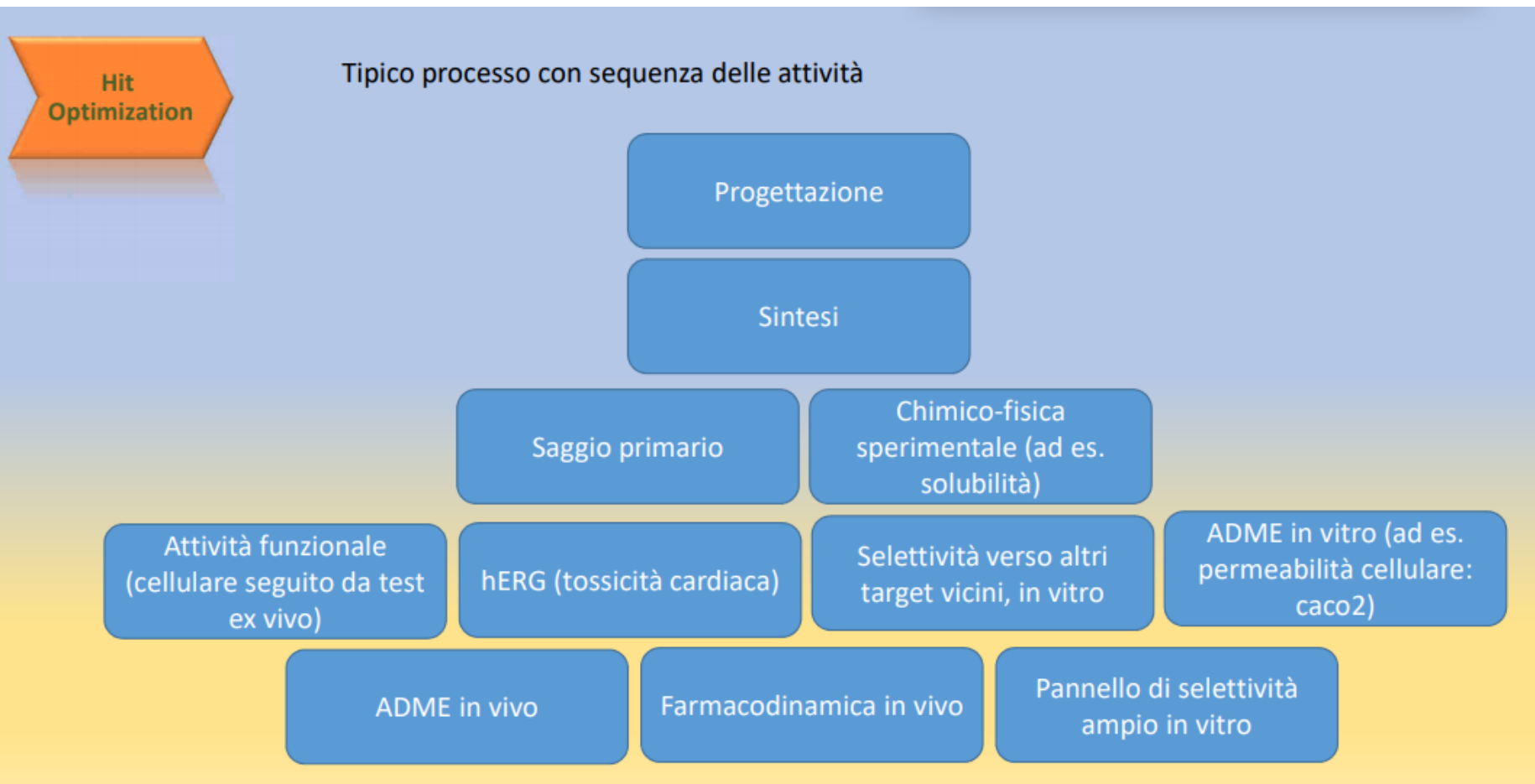
- Portare avanti almeno tre chemotipi differenti

**Lead compound/Lead Series: una molecola o una serie che oltre a rispondere ai precedenti, rispondono a ulteriori criteri:**

- Alta affinità per il target ( $\ll 1$  micromolare)
- Buona trattabilità chimica
- Strutture brevettabili
- Le molecole devono rispettare le regole di Lipinsky o altri criteri chimico-fisici appropriati alla via di somministrazione scelta
- No interferenze con i citocromi
- No citotossicità e genotossicità
- Basso o moderato legame con le proteine del sangue (a volte può essere vantaggioso il contrario in caso di molecole con emivita breve)
- Solubilità in acqua  $> 100$  micromolare
- Chimicamente e metabolicamente stabili
- Non devono avere caratteristiche conosciute essere associate a problematiche tossicologiche
- Chiara evidenza di relazione struttura attività (SAR)
- Accettabili proprietà chimico-fisiche e ADME sperimentali

# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Hit to lead process



# Scoperta dei farmaci: Identificazione del prototipo

Hit to lead process

Il ruolo della sintesi chimica nel drug discovery process - 1

Chimica classica

Sintesi combinatoriale per ottenere librerie focalizzate (metodo ad es. «split and mix»)

Sintesi parallela

Librerie di molecole

