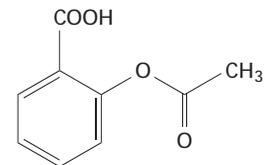


Capitolo supplementare B

Lo sviluppo di nuovi farmaci



Molti farmaci sono derivati di prodotti naturali. L'acido acetilsalicilico (formula in alto) è un composto chimico derivato da un componente isolato dalla corteccia del salice (parte destra della figura a lato). Le proprietà terapeutiche della corteccia del salice erano note da lungo tempo. Il principio attivo è stato isolato, modificato chimicamente e, a partire dal 1899, è stato messo in commercio (parte sinistra della figura). [Fonti: (foto a sinistra) per gentile concessione della Bayer Corporation; (foto a destra) Image Ideas/Picture Quest.]

Lo sviluppo di nuovi farmaci costituisce una delle più importanti interfacce tra la biochimica e la medicina. Nella maggioranza dei casi i farmaci agiscono legandosi a specifici recettori o enzimi, inibendone oppure modulandone l'attività biologica. Pertanto la conoscenza dei recettori, degli enzimi e delle vie metaboliche di cui fanno parte è essenziale per lo sviluppo di nuovi farmaci. Ma un farmaco efficace è molto di più che un potente modulatore della sua molecola bersaglio. I farmaci devono essere somministrati al paziente in modo semplice, possibilmente per via orale, sotto forma di piccole compresse, e devono sopravvivere sufficientemente a lungo nel corpo umano, in modo da poter raggiungere intatti i loro bersagli. Inoltre, affinché non provochino effetti indesiderati, non devono modulare le proprietà di biomolecole diverse da quelle bersaglio. Queste imprescindibili caratteristiche limitano fortemente il numero dei composti che potrebbero potenzialmente essere di uso clinico.

I farmaci sono stati fin qui scoperti attraverso due opposti approcci sperimentali (figura B1). Il primo approccio identifica la sostanza che determina l'effetto fisiologico desiderato quando somministrata all'uomo, a un animale o a cellule isolate. Queste sostanze possono essere scoperte per osservazione casuale (serendipità), attraverso il frazionamento di estratti di piante o di altro materiale biologico, di cui sono già note le proprietà terapeutiche, oppure attraverso lo screening di prodotti naturali o di collezioni («librerie») di composti. Tale approccio comporta che l'effetto biologico sia noto prima che il bersaglio molecolare sia stato identificato.

Sommario

- B1 Lo sviluppo di nuovi farmaci comporta la risoluzione di problemi assai complessi
- B2 Si possono scoprire potenziali farmaci per serendipità (osservazione fortuita), screening o progettazione
- B3 L'analisi del genoma promette importanti sviluppi verso la scoperta di nuovi farmaci
- B4 Lo sviluppo di nuovi farmaci procede attraverso diversi stadi

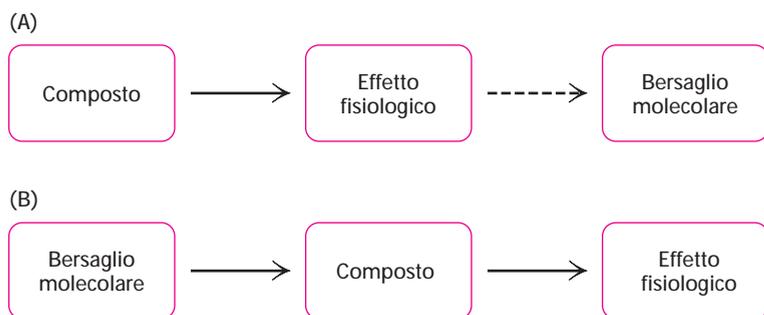


Figura B1 I due approcci sperimentali per la scoperta dei farmaci

(A) È già noto che un determinato composto produce l'effetto terapeutico desiderato. Il bersaglio molecolare viene scoperto solo successivamente, attraverso una sperimentazione appropriata. (B) Viene prima selezionato il bersaglio molecolare. I possibili farmaci che si legano al bersaglio vengono identificati successivamente e quindi vengono esaminati gli effetti fisiologici.

farmacologia

La scienza che si occupa della scoperta, della chimica, della composizione, dell'identificazione, degli effetti biologici e fisiologici, e dell'utilizzo e della fabbricazione dei farmaci.

Una successiva sperimentazione servirà a chiarire il meccanismo d'azione del composto. Il secondo approccio trae inizio da un bersaglio molecolare noto. I composti vengono scelti o mediante uno screening, oppure attraverso la progettazione di molecole che possiedano le proprietà desiderate, cioè in grado di legarsi alla molecola bersaglio e modularne le proprietà. Una volta disponibili, se ne potranno studiare gli effetti su colture cellulari appropriate o su organismi. Man mano che la complessità dei sistemi biologici aumenta, è prevedibile che ci si possa imbattere in risultati inaspettati.

In questo capitolo ci occuperemo di argomenti farmacologici. Esamineremo un certo numero di esempi tipici, che aiutano a capire come si giunge alla scoperta dei farmaci, ivi inclusi aspetti concettuali e metodologici e i possibili sviluppi futuri. Vedremo anche come i concetti e le metodiche propri della genomica stiano influenzando gli approcci sperimentali che conducono alla scoperta dei farmaci. Concluderemo il capitolo riassumendo i diversi stadi attraverso i quali si giunge alla realizzazione di un farmaco.

B1 LO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI COMPORTA LA RISOLUZIONE DI PROBLEMI ASSAI COMPLESSI

Molti composti producono effetti significativi nell'uomo, ma solo pochi sono destinati a di-

ventare farmaci di largo uso. Ogni composto estraneo, come spesso è un farmaco, che durante un lungo periodo evolutivo non ha trovato un suo ruolo nella cellula, dovrà possedere tutta una serie di proprietà peculiari, per poter svolgere la sua azione senza provocare alcun danno. Vedremo quali sono le difficoltà che si trovano ad affrontare i ricercatori che si occupano della produzione di nuovi farmaci.

I potenziali farmaci devono essere potenti modulatori dei loro bersagli molecolari

La maggior parte dei farmaci si lega a specifiche proteine, in genere recettori o enzimi. Per risultare efficace, un farmaco deve legarsi a un numero sufficiente delle sue proteine bersaglio, se assunto in una dose ragionevole. Un importante fattore, che determina l'efficacia del farmaco, è la forza di legame, spesso governata da principi cinetici correlati al modello di Michaelis-Menten, introdotto nel capitolo 8.

Una molecola che riconosce e si lega a una molecola bersaglio viene spesso denominata *ligando*. Una tipica curva di legame è riportata nella figura B2. Le molecole di ligando occupano via via sempre più siti di legame, man mano che la concentrazione del ligando aumenta, fino a che tutti i siti disponibili sono occupati. La tendenza di un ligando a legarsi al suo bersaglio molecolare si misura per mezzo della *costante di dissociazione*, K_d , definita dall'espressione

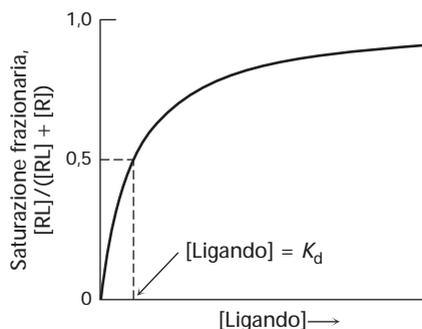
$$K_d = [R][L]/[RL]$$

dove $[R]$ è la concentrazione del recettore, $[L]$ è la concentrazione del ligando, e $[RL]$ è la concentrazione del complesso recettore-ligando. La costante di dissociazione è una misura della forza di interazione tra il potenziale farmaco e il bersaglio molecolare; più basso è il suo valore, più forte è l'interazione. La concentrazione del ligando libero alla quale la metà dei siti di legame sono occupati è uguale alla costante di dissociazione, se la concentrazione dei siti di legame è sostanzialmente inferiore alla costante di dissociazione.

In condizioni fisiologiche intervengono diversi fattori che complicano la sperimentazione. Molti dei bersagli molecolari a cui i farmaci si legano, riconoscono anche altri ligandi normalmente presenti nei tessuti: ne consegue che tali ligandi e i potenziali farmaci competono per gli stessi siti di legame presenti sul bersaglio molecolare. Abbiamo già incontrato una situazione simile, quando abbiamo preso in considerazione l'inibizione enzimatica del tipo competitivo nel

Figura B2 Curva di legame

La titolazione di un recettore, R, con un ligando, L, risulta nella formazione del complesso RL. Nei casi semplici la reazione descrive una semplice curva di saturazione. La metà dei recettori sono legati al ligando quando la concentrazione del ligando è uguale alla costante di dissociazione, K_d , del complesso RL.



capitolo 8. Supponiamo che il bersaglio del farmaco sia un enzima, e che il potenziale farmaco agisca da inibitore competitivo. La concentrazione che il potenziale farmaco deve raggiungere per inibire efficacemente l'enzima dipenderà dalla concentrazione fisiologica del substrato dell'enzima (figura B3). Quanto più elevata è la concentrazione del substrato endogeno, tanto maggiore è la concentrazione che il potenziale farmaco deve raggiungere perché l'enzima possa essere efficacemente inibito. L'effetto della concentrazione del substrato viene espresso dalla *costante di dissociazione apparente*, K_d^{app} , espressa dall'equazione

$$K_d^{app} = K_d(1 + [S]/K_M)$$

dove $[S]$ è la concentrazione del substrato e K_M è la costante di Michaelis per il substrato. Si noti che la K_d per l'inibitore di un enzima viene spesso indicata come *costante di inibizione*, K_i .

In molti casi il saggio enzimatico diretto o la titolazione col ligando non bastano; bisogna ricorrere a saggi più complessi, al fine di determinare l'efficacia di un potenziale farmaco. Per esempio, la frazione di batteri uccisi potrebbe essere utilizzata come indice dell'efficacia di un antibiotico. In questi casi vengono utilizzati altri parametri, come l' EC_{50} , che indica la concentrazione del potenziale farmaco richiesta per raggiungere il 50% della risposta biologica (figura B4). Analogamente l' EC_{90} indica la concentrazione del potenziale farmaco richiesta per raggiungere il 90% della risposta biologica. Nell'esempio dell'antibiotico, l' EC_{90} indica la concentrazione dell'antibiotico richiesta per uccidere il 90% dei batteri. Nel caso degli inibitori vengono spesso utilizzati i termini IC_{50} e IC_{90} per indicare le concentrazioni dell'inibitore necessarie per ridurre la risposta rispettivamente del 50% o del 90%, rispetto ai valori misurati in assenza di inibitore.

I valori di EC_{50} , EC_{90} , IC_{50} e IC_{90} sono una misura della capacità di un potenziale farmaco di modulare l'attività del bersaglio molecolare desiderato. Per prevenire effetti indesiderati, spesso chiamati *effetti collaterali*, un potenziale farmaco ideale non dovrebbe legarsi in modo apprezzabile a molecole diverse dalla molecola bersaglio. Realizzare un tale farmaco costituisce una vera e propria sfida, soprattutto se la molecola bersaglio fa parte di una famiglia di proteine correlate evolutivamente tra loro. Il grado di specificità può essere valutato misurando il rapporto tra i valori di K_d per il legame del potenziale farmaco con qualsiasi altra molecola controllo e il valore di K_d per il legame del poten-

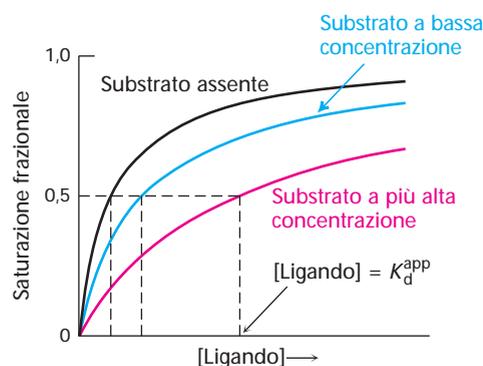


Figura B3 Gli inibitori competono col substrato per i siti di legame

Le curve di legame mostrate qui descrivono l'andamento del legame di un inibitore col recettore in assenza del substrato e in presenza di concentrazioni crescenti di substrato.

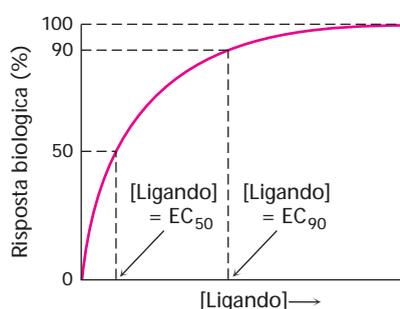


Figura B4 Concentrazioni efficaci

La concentrazione di un ligando che provoca la risposta biologica può essere quantificata in termini di EC_{50} , che corrisponde alla concentrazione alla quale si raggiunge il 50% della risposta massima, e in termini di EC_{90} , la concentrazione alla quale si raggiunge il 90% della risposta massima.

ziale farmaco con la molecola bersaglio desiderata.

I farmaci devono possedere proprietà adatte al raggiungimento dei loro bersagli

Finora ci siamo soffermati sulla capacità di alcune molecole di agire su specifici bersagli molecolari. Però i farmaci devono possedere anche altre caratteristiche. Per essere efficaci devono poter essere somministrati agevolmente, e inoltre devono raggiungere i loro bersagli in concentrazioni adeguate. Prima di raggiungere il suo bersaglio ogni farmaco incontra diversi ostacoli dovuti al suo assorbimento, alla sua distribuzione, al suo metabolismo e alla sua escrezione. Questi processi, tutti correlati tra loro, vengono riportati in forma schematica nella figura B5. Nel loro insieme, le proprietà di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione di un farmaco vengono collettivamente denominate proprietà *ADME*.

Somministrazione e assorbimento Idealmente, i farmaci dovrebbero essere assunti per via orale, sotto forma di piccole compresse. Il composto attivo deve poter resistere alle condizioni acide dello stomaco, per essere poi assorbito attraverso l'epitelio intestinale. Ne consegue che il composto deve attraversare le membrane cellulari a velocità apprezzabile. Macromolecole come le proteine

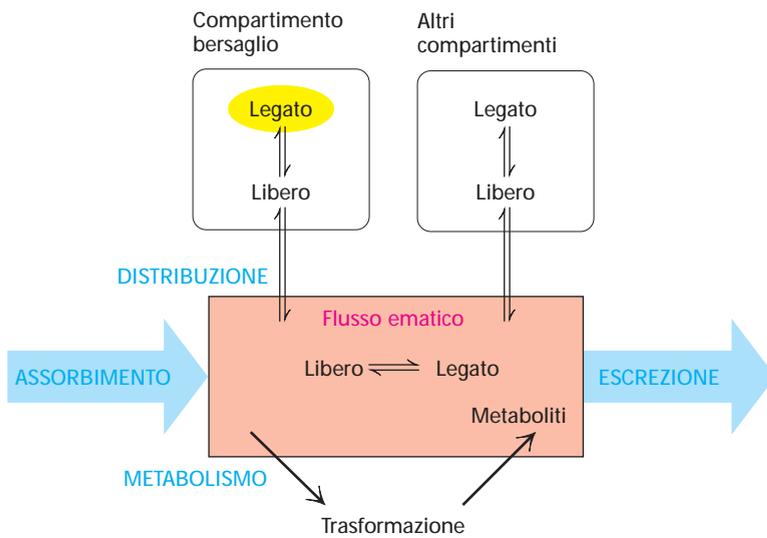


Figura B5 Assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME)

La concentrazione di un composto a livello del suo sito bersaglio (in giallo) è il risultato delle velocità del suo assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione.

non possono essere somministrate oralmente, perché vengono denaturate nell'ambiente acido dello stomaco, e comunque non potrebbero essere assorbite. La capacità di un composto di essere assorbito viene spesso quantificata come *biodisponibilità orale*. Questo termine definisce il rapporto tra la massima concentrazione raggiunta da un composto somministrato oralmente e la massima concentrazione raggiunta dallo stesso composto somministrato per via endovenosa. La biodisponibilità può variare notevolmente da specie a specie, quindi è difficile estrapolare all'uomo i risultati ottenuti nell'animale. Tuttavia è stato possibile dedurre qualche regola generale. A tal proposito sono di grande utilità le *regole di Lipinski*.

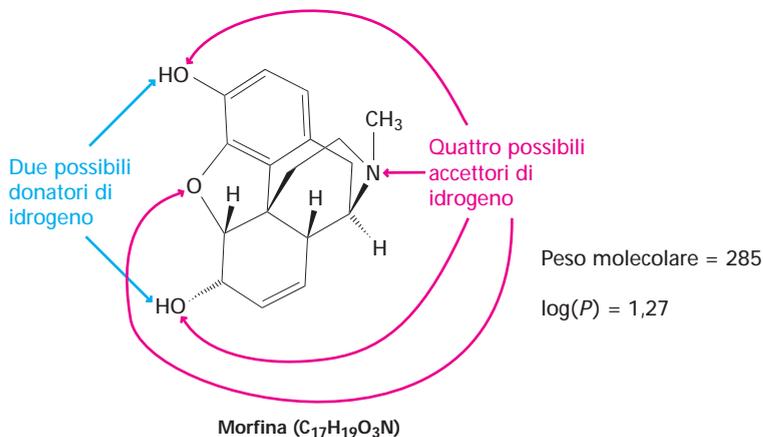


Figura B6 Le regole di Lipinski applicate alla morfina

La morfina soddisfa tutte e quattro le regole di Lipinski. La sua biodisponibilità orale per l'uomo è del 33%.

Le regole di Lipinski stabiliscono che si ha un cattivo assorbimento quando

1. il peso molecolare del composto in esame è superiore a 500;
2. il numero dei gruppi donatori per la formazione di legami a idrogeno è maggiore di 5;
3. il numero dei gruppi accettori per la formazione di legami a idrogeno è maggiore di 10;
4. il coefficiente di ripartizione [misurato come $\log(P)$] è maggiore di 5.

Il coefficiente di ripartizione è una misura della tendenza di una molecola a «solubilizzarsi» nel doppio strato lipidico delle membrane, ed è correlato con la sua solubilità nei solventi organici. Si determina lasciando equilibrare il composto tra l'acqua e una fase organica, costituita dall'*n*-ottanolo. Il valore del $\log(P)$ viene definito come il \log_{10} del rapporto della concentrazione di un composto in *n*-ottanolo e la concentrazione del composto in acqua. Per esempio, se la concentrazione del composto in *n*-ottanolo è 100 volte superiore a quella nella fase acquosa, il $\log(P)$ è 2.

Per esempio, la morfina soddisfa le regole di Lipinski e ha una discreta biodisponibilità (figura B6). Tuttavia, anche se un farmaco non soddisfa una o più di una delle regole su elencate, può ancora avere una soddisfacente biodisponibilità. Le regole di Lipinski vanno considerate come principi guida ai fini di valutare nuovi possibili farmaci.

La distribuzione I composti che attraversano la membrana delle cellule epiteliali intestinali passano nel torrente circolatorio. Però i composti idrofobi, e molti altri ancora, hanno bassa solubilità. Essi si legano ad alcune proteine che, come l'albumina (figura B7), sono presenti nel siero a concentrazioni elevate, e vengono trasportate in ogni distretto corporeo raggiunto dalla circolazione sanguigna.

Una volta che un composto ha raggiunto il torrente circolatorio, si distribuisce nei differenti fluidi e tessuti, spesso denominati *compartimenti*. Alcuni composti si concentrano soprattutto nei loro compartimenti bersaglio, o legandosi alle loro specifiche molecole bersaglio, o attraverso altri meccanismi. Altri si distribuiscono in modo più uniforme (figura B8). Perché un farmaco risulti efficace, dovrà raggiungere il compartimento bersaglio in quantità sufficiente; ma la concentrazione del composto si riduce tutte le volte che si distribuisce anche in compartimenti diversi dal compartimento bersaglio.

Talvolta risulta difficile per un farmaco raggiungere il compartimento bersaglio. Molti composti non raggiungono il sistema nervoso centrale, perché vengono trattenuti dalla *barriera emato-encefalica*, formata dalle strette giunzioni tra le cellule endoteliali che rivestono il lato luminale dei vasi sanguigni nel cervello e nel midollo spinale.

Metabolismo ed escrezione L'ultimo ostacolo che molti potenziali farmaci devono superare è quello di eludere le difese dell'organismo contro le sostanze estranee. Tali composti (frequentemente denominati *composti xenobiotici* o semplicemente *xenobiotici*) vengono spesso eliminati con le urine o con le feci, dopo essere stati metabolizzati, cioè degradati o comunque modificati per agevolarne l'escrezione. Questo processo, denominato *metabolismo del farmaco*, pone forti limiti alla sua efficacia, perché ne diminuisce la concentrazione, via via che il farmaco viene metabolizzato. Ne consegue che i composti che vengono metabolizzati rapidamente devono essere somministrati con maggior frequenza e a dosi più elevate.

Gli xenobiotici vengono metabolizzati attraverso due vie metaboliche principali: l'*ossidazione* e la *coniugazione*. Le reazioni di ossidazione possono favorire l'escrezione in almeno due modi: aumentando la solubilità in acqua, e quindi facilitando il trasporto, e introducendo un gruppo funzionale, che verrà coinvolto in successivi passaggi metabolici. Queste reazioni vengono spesso promosse dagli enzimi del citocromo P450 del fegato (cap. 26, p. 673). Il genoma umano codifica più di 50 differenti citocromi P450, enzimi contenenti un gruppo eme, molti dei quali partecipano al metabolismo degli xenobiotici. Una

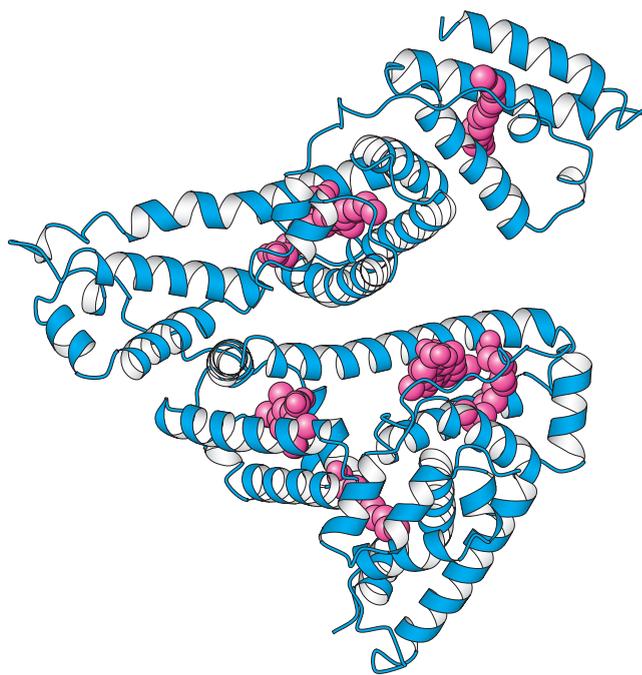


Figura B7 Struttura della sialalbumina umana, una proteina che funge da trasportatore di farmaci

Sette molecole idrofobe (in rosso) sono legate alla proteina. [Fonte: 1BKE.pdb.]

tipica reazione, catalizzata da una delle forme isoenzimatiche del P450 è l'ossidazione dell'ibuprofene (figura B9).

La coniugazione consiste nell'aggiunta di un particolare gruppo al composto xenobiotico. I gruppi utilizzati più comunemente sono il glutatone (cap. 20, p. 520), l'acido glucuronico e il solfato (figura B10). L'aggiunta spesso aumenta la solubilità in acqua e fornisce una sorta di marcatura che viene riconosciuta per favorire il processo di escrezione del farmaco. Esempi di reazioni di coniugazione sono l'aggiunta del glutatone alla molecola antitumorale ciclofosfamide, l'aggiunta del glucuronidato all'analgico morfina, e l'aggiunta di un gruppo solfato

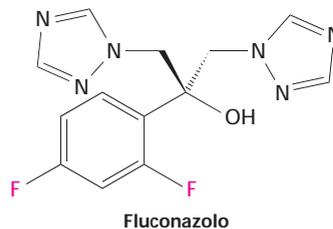
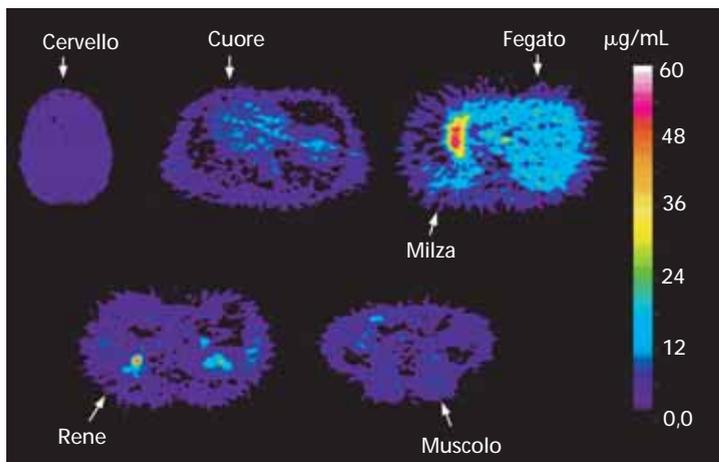
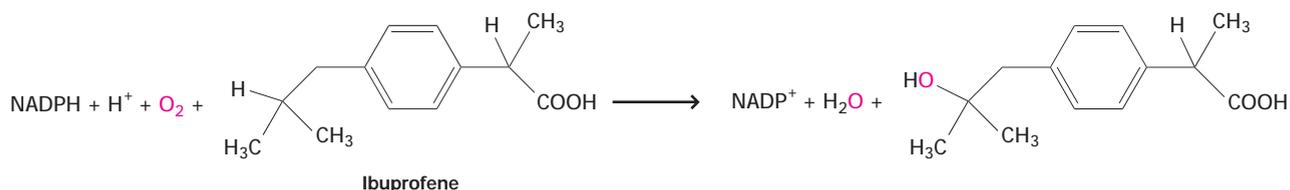
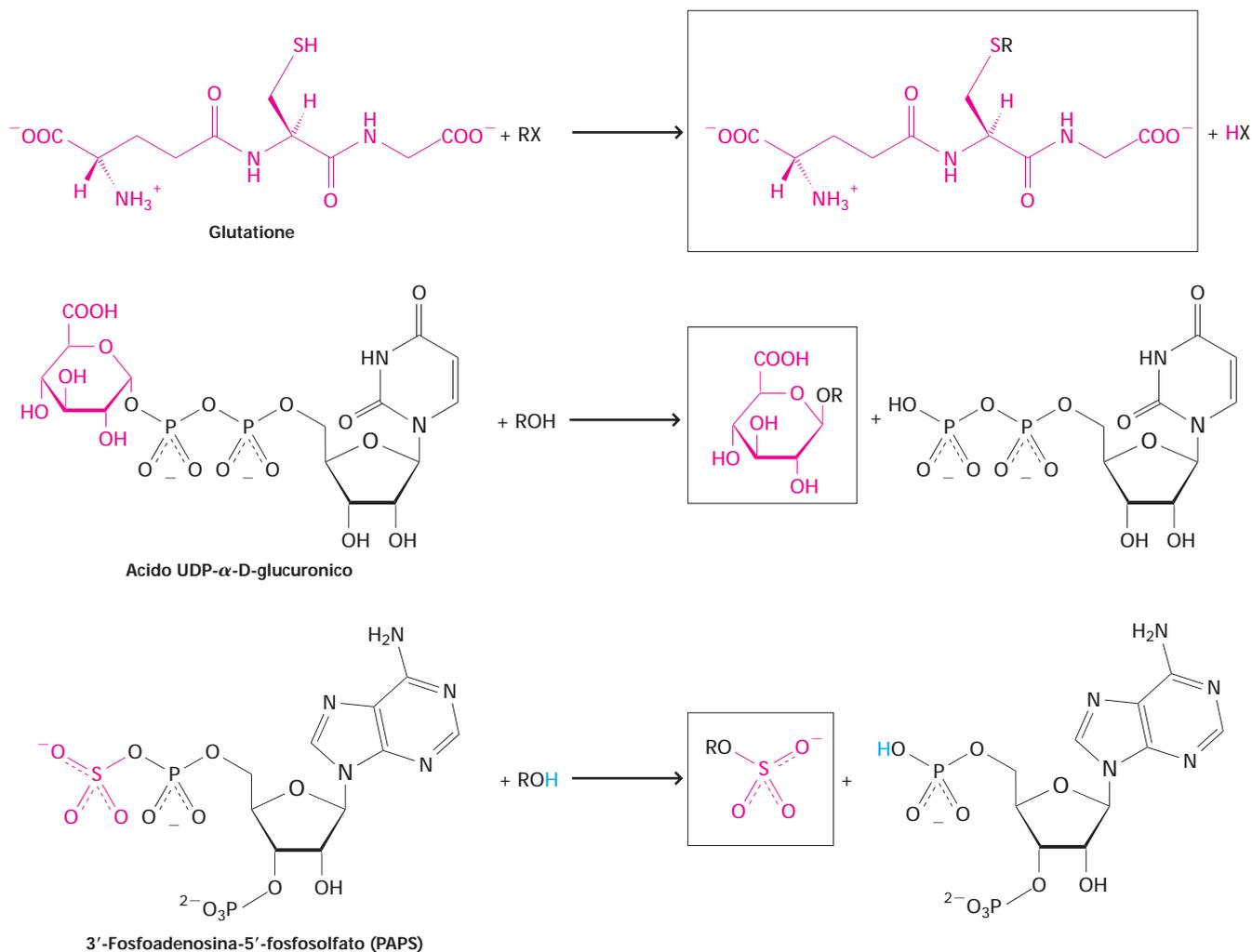


Figura B8 Distribuzione del fluconazolo

Una volta assorbiti, i composti attivi si distribuiscono nei vari organi. La figura mostra la distribuzione del fungicida fluconazolo, monitorata attraverso l'uso della tomografia a emissione di positroni (PET). Le immagini sono state ottenute da un soggetto umano sano volontario, 90 minuti dopo l'iniezione di una dose di 5 mg kg^{-1} di fluconazolo, contenente tracce di fluconazolo marcato con l'isotopo ^{18}F emittente positroni. [Fonte: A. J. Fischman et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(1993): 1270-1277.]

**Figura B9 Modificazione dell'ibuprofene catalizzata dal sistema del citocromo P450**

Le forme isoenzimatiche del sistema del citocromo P450, soprattutto nel fegato, catalizzano reazioni che interessano il metabolismo degli xenobiotici, ad esempio reazioni di ossidrilazione. Tali reazioni introducono un atomo di ossigeno che deriva dall'ossigeno molecolare.

**Figura B10 Reazioni di coniugazione**

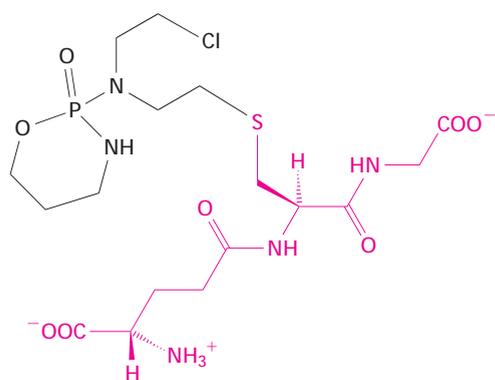
Composti che possiedono gruppi appropriati vengono spesso modificati attraverso reazioni di coniugazione. Tali reazioni includono l'aggiunta del glutathione (in alto), dell'acido glucuronico (al centro), o del solfato (in basso). I prodotti coniugati sono mostrati nel riquadro.

al minoxidil, uno stimolatore della crescita dei capelli.

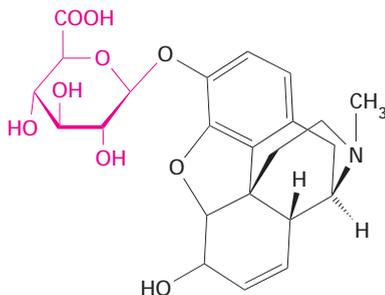
È interessante notare che la solfatazione del minoxidil produce un composto che è più attivo dello stesso minoxidil non modificato nel promuovere la crescita dei capelli. Anche se in genere il farmaco modificato metabolicamente è

meno attivo di quello originario, qualche volta può accadere che sia invece più attivo.

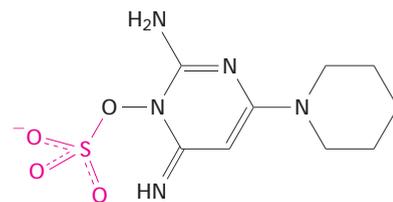
La reazione di ossidazione spesso precede quella di coniugazione, perché può generare un ossidrilico o qualche altro gruppo cui possono legarsi composti come l'acido glucuronico. Le reazioni di ossidazione dei composti xenobiotici vengono



Coniugato ciclofosfamide-glutazione



Morfina glucuronidato



Minoxidil solfato

spesso denominate *trasformazioni di fase I*, e le reazioni di coniugazione *trasformazioni di fase II*. Queste reazioni hanno luogo principalmente nel fegato. Poiché il sangue fluisce dall'intestino direttamente nel fegato attraverso la vena porta, il metabolismo degli xenobiotici modifica i farmaci prima che questi raggiungano la circolazione vera e propria. Questa *trasformazione metabolica primaria* può limitare in modo sostanziale la disponibilità dei composti assunti oralmente.

Una volta entrati nel torrente circolatorio, i composti possono essere rimossi dal circolo, ed escreti attraverso due meccanismi principali. Primo, possono attraversare il filtro renale ed essere escreti con le urine. In questo processo il sangue passa attraverso i *glomeruli*, costituiti da una fitta rete di capillari che nei reni agiscono appunto come filtri. Composti di peso molecolare inferiore a 60000 possono passare attraverso i glomeruli renali. Molte molecole idrosolubili, come il glucosio, i nucleotidi e altri composti a basso peso molecolare, passano attraverso i glomeruli e vengono riassorbiti nel torrente circolatorio, o per mezzo di trasportatori ad ampio spettro di specificità, o tramite il trasferimento passivo di molecole idrofobe attraverso le membrane. Farmaci e metaboliti che vanno incontro alla prima tappa di filtrazione, e non subiscono il processo di riassorbimento, vengono invece escreti.

Tramite il secondo meccanismo i composti vengono attivamente trasportati nella bile, un processo che ha luogo nel fegato. Dopo aver subito una fase di concentrazione, la bile fluisce nell'intestino. Nell'intestino i farmaci e i metaboliti possono essere escreti attraverso le feci, oppure riassorbiti nel torrente circolatorio e ulteriormente degradati dagli enzimi digestivi. Talvolta i composti vengono riciclati dal sangue nell'intestino, e di qui di nuovo nel sangue, un processo spesso denominato *circolo entero-epatico* (figura B11). Questo processo può diminuire in modo

significativo la velocità di escrezione di alcuni composti, in quanto questi eludono il processo di escrezione e rientrano in circolo.

La cinetica di escrezione è spesso complessa. In alcuni casi una percentuale fissa del composto viene escreti in un dato periodo di tempo (figura B12). Questa via di escrezione risulta nella perdita esponenziale del composto dal torrente circolatorio, che può essere caratterizzata dal tem-

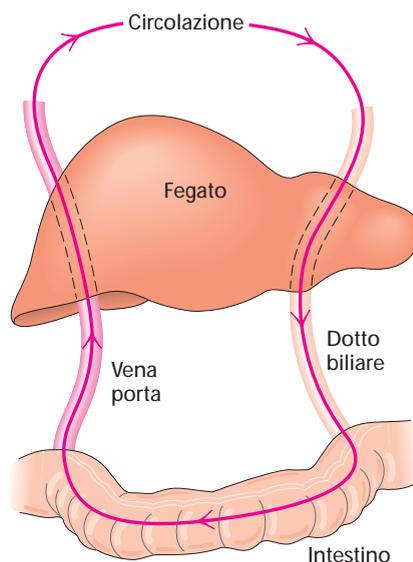


Figura B11 Circolo entero-epatico

Alcuni farmaci possono passare dal torrente circolatorio nel fegato, quindi nella bile, nell'intestino, nel fegato e di nuovo nel torrente circolatorio. Tale forma di riciclo rallenta la velocità di escrezione.

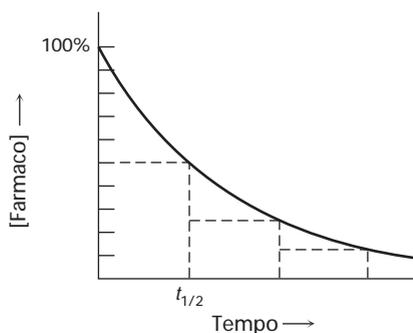


Figura B12 Tempo di emivita dell'escrezione di un farmaco

Nel caso mostrato, la concentrazione del farmaco nel torrente circolatorio diminuisce della metà del suo valore durante un periodo di tempo, $t_{1/2}$, denominato tempo di emivita.

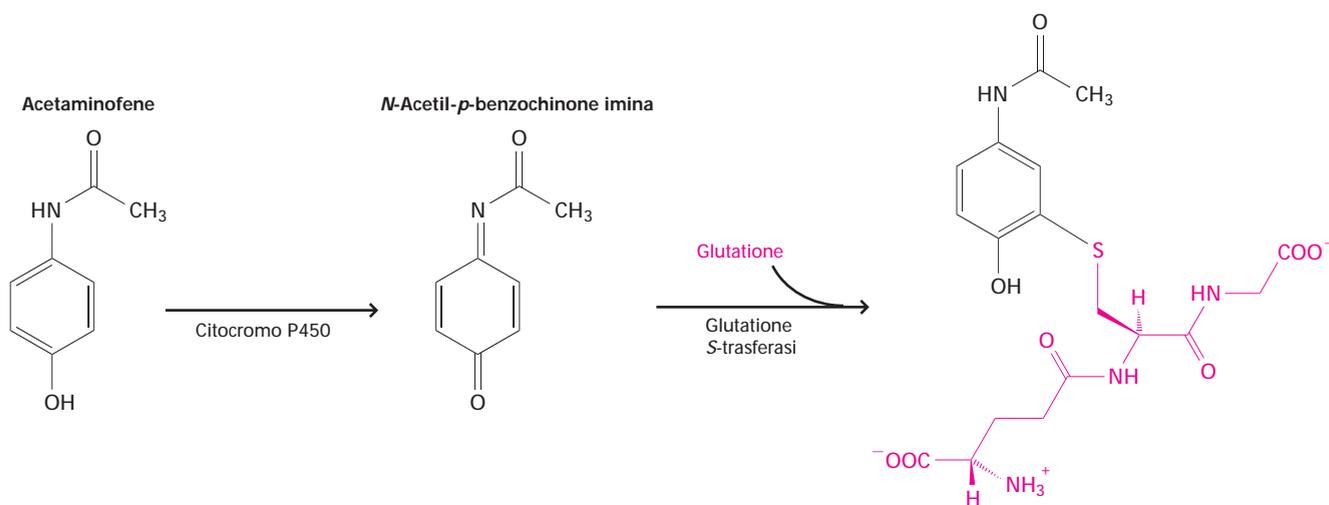


Figura B13 Tossicità dell'acetaminofene

Un prodotto secondario del metabolismo dell'acetaminofene è la *N*-acetil-*p*-benzochinone imina, che si coniuga col glutatione. Forti dosi di acetaminofene possono quindi diminuire le riserve di glutatione.

po di emivita (o tempo di dimezzamento, $t_{1/2}$), cioè il periodo di tempo richiesto per eliminare il 50% del composto che via via viene escreto. Esso è una misura di quanto a lungo una concentrazione efficace del composto rimane nel sistema dopo la somministrazione. Pertanto il tempo di emivita costituisce il fattore più importante per determinare la frequenza con cui si deve assumere un farmaco. Un farmaco con un tempo di emivita sufficientemente lungo può essere assunto solo una volta al giorno, mentre un farmaco con un tempo di emivita breve dovrà essere assunto 3 o 4 volte al giorno.

La tossicità può limitare l'efficacia di un farmaco

La tossicità di un farmaco non deve essere tale da danneggiare l'organismo che lo assume. Un farmaco può essere tossico per molte ragioni. Può provocare un *eccesso* di modulazione della molecola bersaglio. Per esempio, un eccesso del farmaco anticoagulante coumadin può provocare una emorragia pericolosa e incontrollata, che può risultare mortale. Oppure il farmaco può modulare le proprietà di proteine diverse, ma correlate alla molecola bersaglio. Composti diretti a interagire con un membro di una famiglia di enzimi o di recettori, spesso si legano ad altri membri della famiglia. Per esempio, un farmaco antivirale diretto contro le proteasi virali può diventare tossico se inibisce anche proteasi normalmente presenti nei tessuti, come quelle che regolano la pressione sanguigna.

Un composto può risultare tossico anche tramite la modulazione dell'attività di proteine non correlate con il suo bersaglio molecolare. Per esempio, molti composti bloccano i canali ionici, come

il canale per il potassio HERG (l'omologo umano di un canale della *Drosophila* trovato in un mutante chiamato «ether-a-go-go»), e causano alterazione della frequenza cardiaca. Per evitare gli effetti collaterali sul cuore, la capacità di bloccare tali canali viene provata su molti potenziali farmaci.

Infine, anche se il composto non è di per sé tossico, lo possono essere i prodotti del suo metabolismo. Anche i processi metabolici della fase I possono generare dei prodotti con gruppi chimici dannosi. Un esempio importante è quello della tossicità epatica che si osserva assumendo forti dosi di acetaminofene (figura B13). Una particolare isoforma del complesso del citocromo P450 ossida l'acetaminofene in *N*-acetil-*p*-benzochinone imina. Questo composto si coniuga col glutatione. Però, quando si usano forti dosi di acetaminofene, la concentrazione di glutatione nel fegato diminuisce drammaticamente, e il fegato non è più in grado di proteggersi sia dall'*N*-acetil-*p*-benzochinone imina, sia da altri composti. La nausea e il vomito sono i primi sintomi conseguenti a un'assunzione eccessiva di acetaminofene. Nel giro di 24-48 ore possono insorgere sintomi di insufficienza epatica. Il 35% dei casi di insufficienza epatica negli Stati Uniti è dovuto all'avvelenamento da acetaminofene. Il trapianto di fegato costituisce spesso il solo trattamento possibile.

La tossicità di un farmaco può essere studiata determinando il suo *indice terapeutico*. Tale misura di tossicità si effettua su animali da esperimento, in genere topi o ratti. L'indice terapeutico viene definito come il rapporto tra la dose del composto che risulta letale per la metà degli animali da esperimento utilizzati per il test (riferita come LD₅₀) e la dose terapeutica efficace, in ge-

nere l'EC₅₀. Pertanto un indice terapeutico di 1000 sta a indicare che la letalità risulta significativa solo quando si somministrano dosi 1000 volte maggiori rispetto alla dose terapeutica.

Molti composti mostrano proprietà favorevoli in vitro, ma falliscono quando vengono somministrati a un organismo vivente, a causa delle loro proprietà ADME sfavorevoli e della loro tossicità. Sono necessari lunghi e costosi esperimenti sugli animali per verificare se un composto è o non è tossico, ma le differenti risposte che si ottengono da specie animali diverse spesso rendono problematico decidere se proseguire gli studi sull'uomo. Tuttavia si spera che, con l'approfondimento e l'ampliamento delle conoscenze biochimiche, si potranno un giorno progettare modelli computerizzati in grado di sostituire o di superare la sperimentazione animale. Tali modelli dovrebbero accuratamente predire il destino metabolico di un composto all'interno di un organismo, sulla base della sua struttura molecolare, o di altre proprietà facilmente misurabili in laboratorio, senza far uso di animali.

B2 SI POSSONO SCOPRIRE POTENZIALI FARMACI PER SERENDIPITÀ (OSSERVAZIONE FORTUITA), SCREENING O PROGETTAZIONE

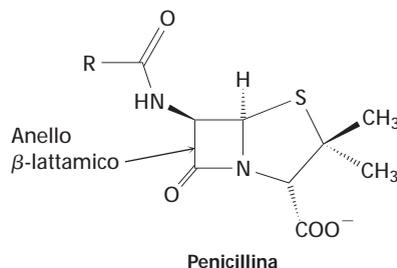
Per lungo tempo molti farmaci sono stati scoperti per osservazione casuale o serendipità. Oggi invece, si ricorre allo screening di raccolte (librerie) di prodotti naturali o di altri composti, al fine di individuare quelli che presentano le proprietà terapeutiche desiderate. Alternativamente, si possono progettare farmaci specifici, utilizzando i dati disponibili sulla struttura del bersaglio molecolare preselezionato. Esamineremo qui di seguito alcuni esempi di ciascuna delle suddette modalità, al fine di trarne principi generali.

Le osservazioni fortuite possono indirizzare la ricerca sui farmaci

Forse l'osservazione fortuita più famosa nella storia dello sviluppo dei farmaci è quella che Alexander Fleming fece nel 1928 sulle colonie di *Staphylococcus aureus*, un batterio patogeno. Fleming notò che la crescita di alcune colonie batteriche, venute accidentalmente a contatto con spore del *Penicillium notatum*, veniva inibita. Subito Fleming ne dedusse che la muffa produceva una sostanza in grado di uccidere i batteri patogeni. Questa scoperta portò a un approccio del tutto innovativo per il trattamento delle infezioni bat-

teriche. In seguito Howard Flory ed Ernest Chain ottennero dal *Penicillium* una sostanza in forma di polvere, denominata penicillina, che entrò in uso nel 1940 come antibiotico.

La struttura della penicillina fu delucidata nel 1945. La sua caratteristica più interessante è l'anello β -lattamico a 4 termini. Questa struttura non comune è essenziale per la funzione della penicillina (cap. 8, p. 195).



La vastissima applicazione della scoperta di Fleming si basa su tre punti cruciali. Primo: venne realizzato un processo industriale per la produzione del fungo *Penicillium* su larga scala. Secondo: la penicillina e molti suoi derivati vennero sintetizzati chimicamente. La disponibilità di derivati sintetici della penicillina aprì la strada allo studio della relazione tra struttura e funzione delle biomolecole. Molti derivati della penicillina hanno trovato ampia applicazione in medicina. Terzo: Jack Strominger e James Park, indipendentemente l'uno dall'altro, chiarirono il meccanismo d'azione della penicillina nel 1965 (figura B14), come già riferito nel capitolo 8.

Molti altri farmaci sono stati scoperti per osservazione casuale. Il farmaco antineurolettico clorpromazina (Torazina[®]) è stato scoperto nel corso di alcune ricerche sul trattamento dello shock chirurgico. Nel 1952 il chirurgo francese Henri Laborit notò che, dopo aver assunto il farmaco, i pazienti diventavano più calmi. Questa osservazione suggerì che la clorpromazina potesse essere utilizzata nella pratica psichiatrica. In realtà il farmaco è stato utilizzato per molti anni per il trattamento di pazienti schizofrenici o af-

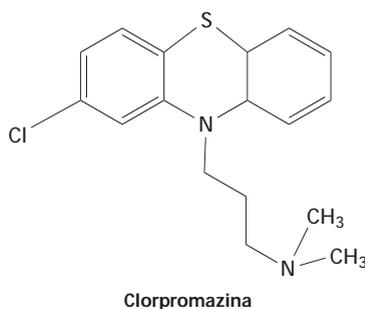
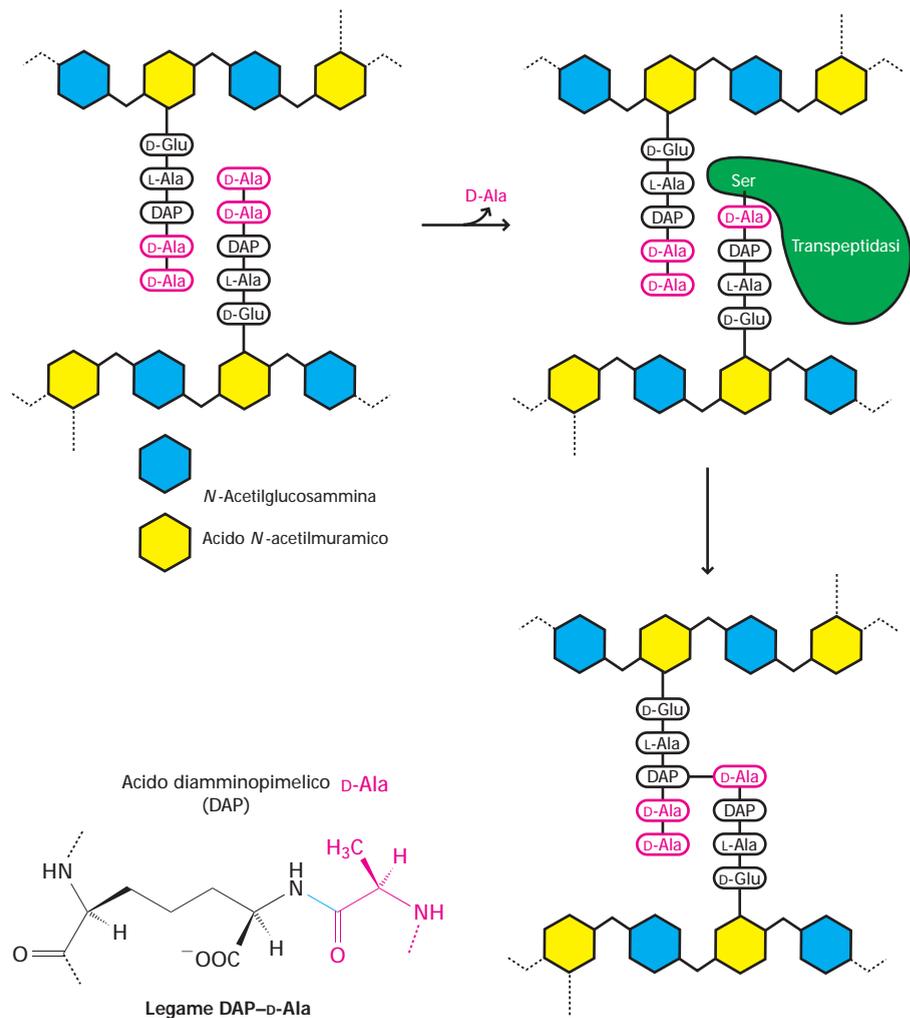


Figura B14 Meccanismo di biosintesi della parete cellulare

L'enzima transpeptidasi catalizza la formazione di un legame crociato tra gruppi peptidoglicanici. Nell'esempio mostrato, la transpeptidasi catalizza la formazione di un legame covalente tra la D-alanina terminale di una catena peptidica e l'acido diaminopimelico (DAP), che fa parte di un'altra catena peptidica. Il legame tra l'acido diaminopimelico e l'alanina (in basso a sinistra) si trova nei batteri gram-negativi, come l'*E. coli*. Nei batteri gram-positivi i legami crociati si formano tra peptidi ricchi in glicina. La penicillina inibisce l'azione della transpeptidasi; in tal modo i batteri esposti al farmaco vengono a possedere pareti cellulari deboli, e quindi suscettibili alla lisi.



fetti da altri disturbi. Però la clorpromazina ha molti effetti collaterali, e oggi il suo uso è stato largamente superato da farmaci di più recente realizzazione.

La clorpromazina agisce legandosi ai recettori della dopamina, un neurotrasmettitore, bloccandone la funzione (figura B15). I recettori D2 della dopamina fungono da bersaglio di molti altri farmaci usati in psichiatria. Al fine di trovare farmaci con effetti collaterali più limitati, sono stati effettuati studi intesi a correlare gli effetti del farmaco con parametri biochimici, quali le costanti di dissociazione e le costanti di velocità di formazione e di demolizione.

L'esempio più recente di una scoperta avvenuta per caso è il sildenafil (Viagra®). Inizialmente questo composto è stato utilizzato come inibitore della fosfodiesterasi 5, un enzima che catalizza l'idrolisi del cGMP a GMP (figura B16). Si pensava che il sildenafil potesse essere utilizzato per il trattamento dell'ipertensione e dell'angina, essendo noto che il cGMP svolge un ruolo cen-

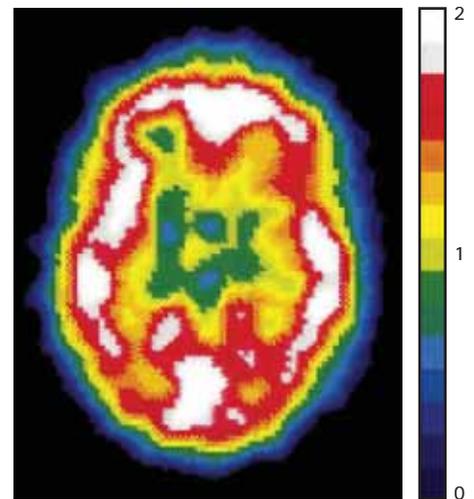
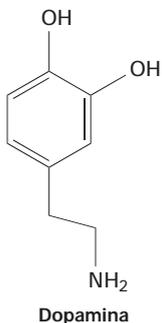


Figura B15 Bersagli della clorpromazina

Questa immagine ottenuta per tomografia a emissione di positroni mostra la distribuzione dei recettori D2 della dopamina nel cervello. I siti recettoriali vengono bloccati a seguito del trattamento con la clorpromazina. [Fonte: C. Trichard et al., *Am. J. Psychiatry* 155 (1998): 505-508; riproduzione autorizzata dal Copyright Clearance Center, Inc.]

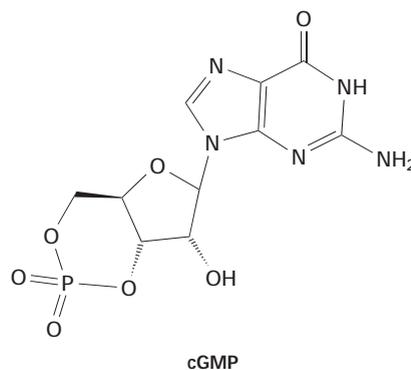
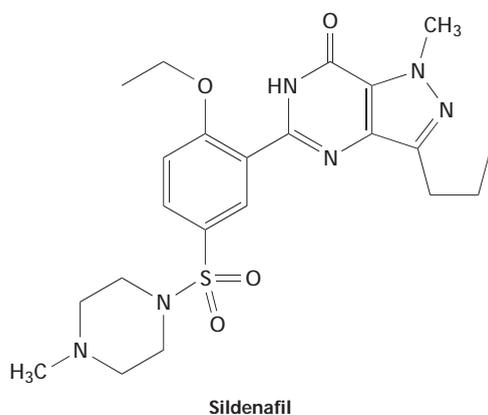


Figura B16 Il sildenafil, un analogo del cGMP

La molecola del sildenafil è stata progettata come analogo del cGMP, il substrato della fosfodiesterasi 5.

trale nel processo di rilassamento delle cellule della muscolatura liscia dei vasi sanguigni (figura B17). Ci si aspettava quindi che, inibendo la fosfodiesterasi 5 e quindi bloccando la degradazione del cGMP, i suoi livelli aumentassero. Nel corso delle prime sperimentazioni cliniche effettuate nel Galles, in alcuni soggetti di sesso maschile si verificò una abnorme erezione del pene. Non risultò subito chiaro se questa osservazione casuale fatta su pochi soggetti fosse da ascrivere al composto o ad altri fattori. Però l'osservazione aveva un certo fondamento biochimico, poiché si sapeva che il rilassamento della muscolatura liscia, dovuto all'aumento dei livelli del cGMP, gioca un ruolo nel processo di erezione del pene. Prove cliniche successive, intese a valutare l'effetto del sildenafil nelle disfunzioni erettili, ebbero successo. Il caso del sildenafil dimostra quanto sia importante osservare attentamente i pazienti sottoposti ai test clinici. Un'osservazione accidentale ha condotto a un nuovo trattamento per le disfunzioni erettili, e ha aperto un mercato di molti miliardi di euro all'anno.

Lo screening di collezioni di composti può condurre alla scoperta di nuovi farmaci

Nessun farmaco ha una diffusione così ampia come l'acido acetilsalicilico. Fin dai tempi di Ippocrate (~400 a.C.) era stato notato che l'uso di estratti della corteccia e delle foglie del salice serviva ad alleviare il dolore. Nel 1829 fu isolata dalla corteccia di salice una miscela chiamata *salicina*. Analisi successive permisero di identificare come acido salicilico il componente attivo della miscela. In un primo momento l'acido salicilico venne usato per il trattamento del dolore, ma spesso provocava irritazioni allo stomaco. Alcuni ricercatori tentarono di trovare un modo per neutralizzare questo effetto collaterale dell'acido

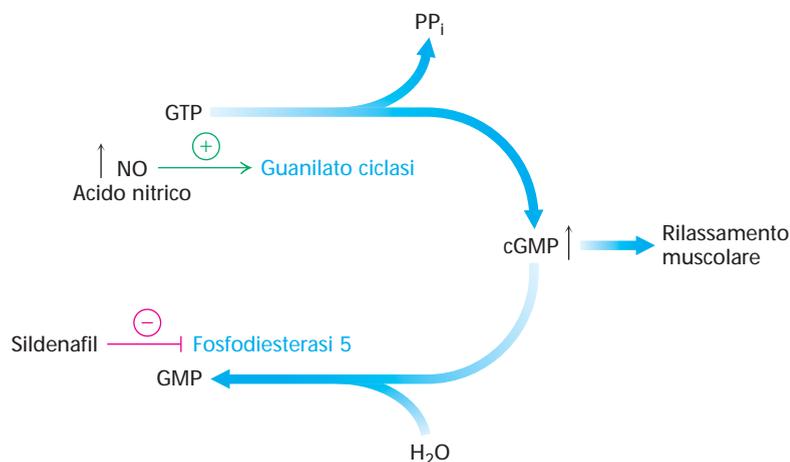
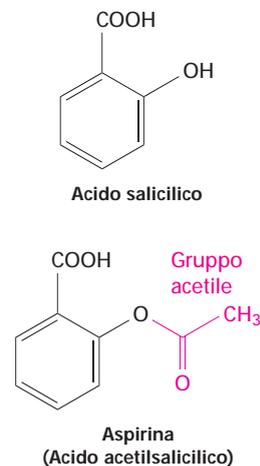


Figura B17 Biochimica del rilassamento muscolare

L'aumento dei livelli di NO stimola la guanilato ciclasti, che catalizza la sintesi del cGMP. L'aumento della concentrazione del cGMP conduce a rilassamento muscolare. La fosfodiesterasi 5 idrolizza il cGMP con conseguente diminuzione della concentrazione del nucleotide ciclico. L'inibizione della fosfodiesterasi 5 da parte del sildenafil mantiene elevati i livelli di cGMP.

salicilico. Felix Hoffmann, un chimico che lavorava in Germania presso la Bayer, sintetizzò un derivato meno irritante, trattando l'acido salicilico con una base e con acetil cloruro. Al composto che ne derivò, l'acido acetilsalicilico, fu attribuito il nome commerciale *aspirina* da «a» che sta per acetil cloruro, «spir», che sta per *Spiraea ulmaria* (una pianta che contiene acido salicilico), e «ina» (un suffisso comune a molti farmaci). Ogni anno si consumano 35 000 tonnellate di aspirina in tutto il mondo, corrispondenti quasi al peso del *Titanic*.

Come discusso nel capitolo 12, il gruppo acetilico dell'aspirina viene trasferito su un residuo di serina che fa parte del sito attivo della cicloossigenasi, un componente della prostaglandina H₂ sintasi (cap. 12, p. 301). In tal modo il gruppo acetilico blocca l'accesso del substrato al sito attivo. Pertanto, anche se l'aspirina e l'acido salicilico si legano nello stesso sito dell'enzima, il grup-



po acetilico dell'aspirina ne aumenta di molto l'efficacia terapeutica. Questo esempio illustra l'importanza di effettuare screening di estratti di piante o di altre fonti biologiche, che si pensa possano avere proprietà terapeutiche per la presenza di composti attivi. Il gran numero di fitopreparati e di rimedi usati nella medicina tradizionale popolare costituisce una vera fonte per la scoperta di nuovi farmaci.

Più di 100 anni fa venne scoperta nelle pareti arteriose di pazienti morti per malattie vascolari la presenza di un materiale grasso-giallastro, che fu chiamato *ateroma*, dalla parola greca corrispondente a «pappa». Tale materiale fu identificato come colesterolo. Gli studi di Framingham sull'apparato cardiaco, iniziati nel 1948, documentarono una netta correlazione tra i livelli elevati del colesterolo ematico e l'alta mortalità per malattie cardiache. Questa osservazione condusse al convincimento che, bloccando la sintesi del colesterolo, si potesse abbassare il suo livello ematico, e quindi diminuire il rischio di malattie cardiache. Ma i primi tentativi, intesi a bloccare la sintesi del colesterolo inibendo una delle reazioni finali della via biosintetica, dovettero essere abbandonati a causa dell'insorgenza di effetti collaterali, come la cataratta, provocati dall'accumulo del substrato dell'enzima inibito, dotato di scarsa solubilità. Venne allora identificato un bersaglio più favorevole, l'enzima HMG-CoA riduttasi (cap. 26, p. 661). Questo enzima agisce sul substrato, l'HMG-CoA (3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A), che può essere utilizzato anche in altre vie metaboliche ed è solubile in acqua.

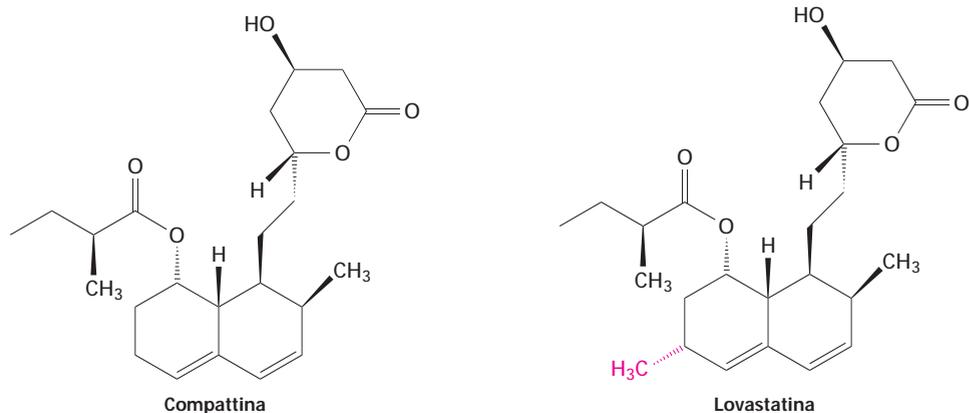
Un prodotto naturale promettente, la compattina, fu scoperto durante la ricerca di agenti antibatterici presenti nel brodo di fermentazione del *Penicillium citrinum*. La sperimentazione sugli animali dimostrò che in alcune specie la compattina inibisce l'HMG-CoA riduttasi e abbassa i livelli sierici del colesterolo. Nel 1982 fu trova-

to nel brodo di fermentazione di *Aspergillus cereus* un nuovo inibitore dell'HMG-CoA riduttasi. Tale composto, ora denominato lovastatina, è strutturalmente molto simile alla compattina, da cui differisce semplicemente perché possiede un gruppo metilico in più.

Le prove cliniche hanno dimostrato che la lovastatina riduce i livelli di colesterolo sierico con pochi effetti collaterali, la maggior parte dei quali può essere prevenuta per trattamento con mevalonato (il prodotto dell'HMG-CoA riduttasi), a dimostrazione che gli effetti collaterali sono dovuti molto probabilmente al blocco quasi completo dell'enzima. Uno di questi effetti collaterali, la cui causa è però ancora da stabilire, è costituito da dolore e debolezza muscolare (che vanno sotto il nome di *miopatia*). Dopo una serie di lunghe ricerche, la Food and Drug Administration (FDA) ha ammesso la lovastatina per il trattamento dell'ipercolesterolemia.

Un altro inibitore correlato strutturalmente con la lovastatina diminuisce in modo statisticamente significativo il numero dei decessi dovuti a malattie coronariche. Un risultato, questo, che dimostra gli effetti benefici provocati dall'abbassamento della colesterolemia. Ulteriori studi sul meccanismo d'azione hanno rivelato che l'inibitore dell'HMG-CoA riduttasi agisce non solo diminuendo la velocità di biosintesi del colesterolo, ma anche inducendo l'espressione dei recettori delle lipoproteine a bassa densità (LDL) (cap. 26, p. 667). Le cellule che possiedono tali recettori rimuovono le particelle di LDL dal torrente circolatorio, che quindi non possono più contribuire alla formazione dell'ateroma.

La lovastatina e i composti correlati possono essere prodotti naturali o composti facilmente ottenibili dai prodotti naturali. Il passo successivo è stato lo sviluppo di molecole totalmente sintetiche, che inibiscono ancora più efficacemente l'HMG-CoA riduttasi (figura B18), che agisco-



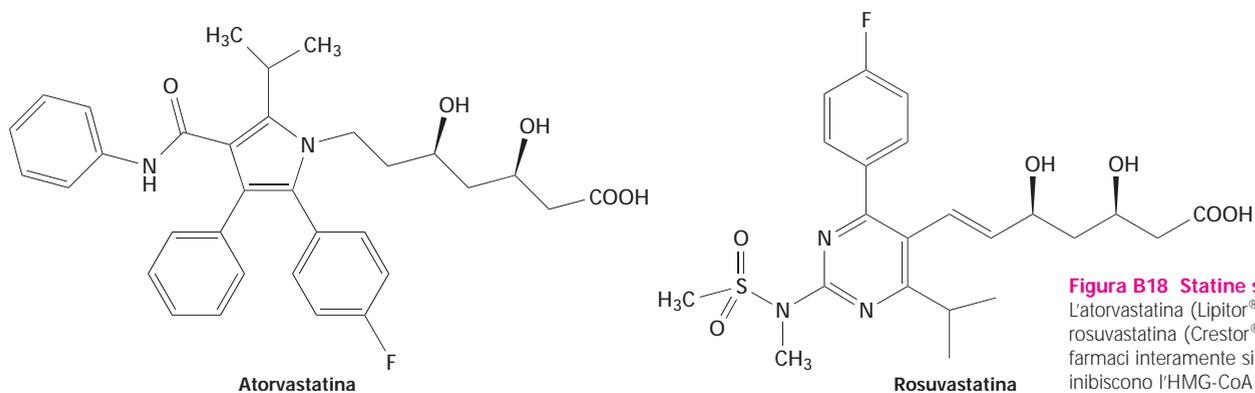


Figura B18 Statine sintetiche
L'atorvastatina (Lipitor®) e la rosuvastatina (Crestor®) sono farmaci interamente sintetici che inibiscono l'HMG-CoA riduttasi.

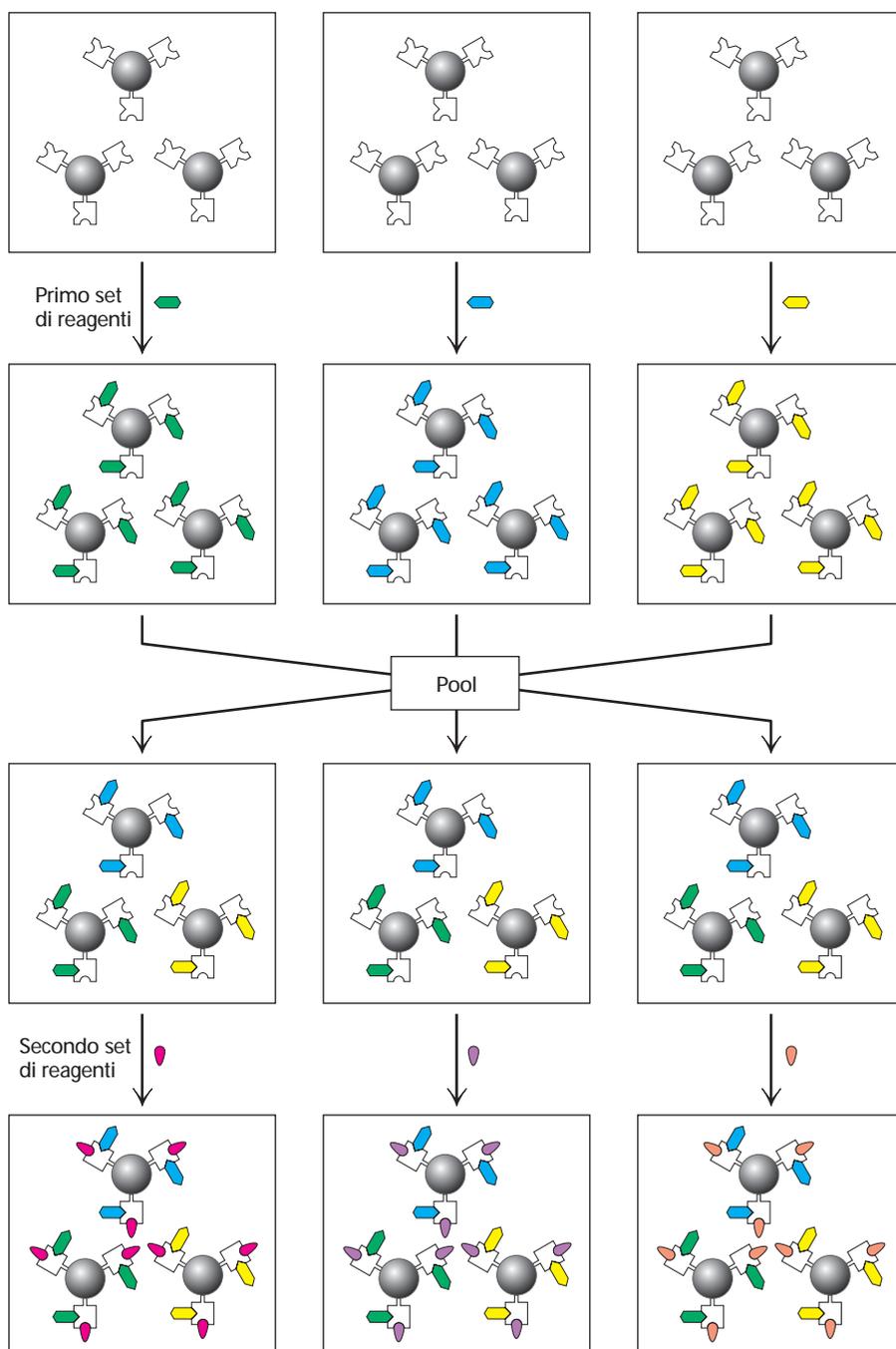
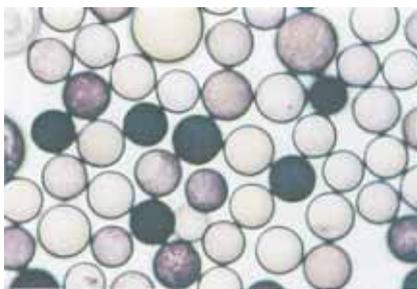


Figura B19 Sintesi per separazione e rimescolamento (split-pool)

Le reazioni vengono fatte avvenire su granuli. La reazione col primo set di reagenti si fa avvenire su diverse aliquote di granuli, separatamente. I granuli vengono poi riuniti, mescolati, e di nuovo divisi in diverse aliquote. Si aggiunge ora il secondo set di reagenti. Verranno prodotti diversi composti, ma i composti legati a ogni singolo granulo saranno identici.

Figura B20 Screening di una libreria di carboidrati di sintesi

Al fine di identificare i carboidrati che hanno la proprietà di legarsi saldamente alle lectine delle arachidi, una piccola libreria combinatoria di carboidrati sintetizzati sulla superficie di granuli del diametro di 130 μm viene fatta reagire con le lectine. I granuli dove sono presenti carboidrati in grado di legarsi alle lectine assumono una colorazione scura, dovuta all'azione di un enzima previamente fissato sulle lectine stesse. [Fonte: R. Liang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(1997): 10544-10559; © 2004 National Academy of Sciences, USA.]



no a dosi più basse e inducono meno effetti collaterali.

I primi inibitori dell'HMG-CoA riduttasi, come pure i loro precursori, sono stati scoperti attraverso lo screening di raccolte (librerie) di prodotti naturali. Oggi si tenta di effettuare lo screening di ampie librerie non solo di prodotti naturali, ma anche di composti sintetici ottenuti nel corso di ricerche programmate per lo sviluppo dei farmaci. Attraverso questa procedura, denominata *screening ad altissimo rendimento*, centinaia di migliaia, o anche milioni, di composti possono essere sperimentati in condizioni favorevoli. Un approccio alternativo consiste nel sintetizzare un gran numero di composti strutturalmente correlati, che differiscono tra loro solo in una o più posizioni. Tale approccio spesso è chiamato *chimica combinatoria*. La tecnica consiste nel sintetizzare diversi composti attraverso le stesse reazioni chimiche, ma utilizzando un set variabile di reagenti. Immaginiamo di avere a disposizione un supporto molecolare di riferimento contenente due siti reattivi e che 20 reagenti possano essere usati per reagire col primo sito e 40 col secondo. Ne consegue che è possibile sintetizzare un totale di $20 \times 40 = 800$ possibili composti.

La metodologia di base della chimica combinatoria consiste nella *sintesi per «separazione e rimescolamento» (split-pool)* (figura B19). La tecnica è basata sulla sintesi in fase solida, già utilizzata per la sintesi dei peptidi (cap. 4, p. 94). I composti vengono sintetizzati su piccoli granuli che recano un appropriato supporto molecolare di riferimento (*scaffold*), dove si faranno avvenire le reazioni. I granuli vengono suddivisi in n aliquote (fase «split»), dove n corrisponde al numero dei reagenti che vengono fatti interagire col primo sito specifico (tre nella figura B19, colorati in verde, blu e giallo). Una volta avvenute le reazioni di addizione al primo sito, i granuli vengono isolati per filtrazione su gel. Le n aliquote di granuli vengono rimescolate (fase «pool»), e divise ancora in m aliquote, dove m corrisponde al numero dei reagenti che vengono fatti intera-

gire col secondo sito specifico (tre nella figura B19, colorati in rosso, viola e arancione). Una volta avvenute le reazioni di addizione al secondo sito, i granuli vengono isolati per filtrazione su gel. Anche se sono stati usati molti granuli, ciascuno di essi contiene un solo tipo di composto. Per esempio, se si considerano i tre granuli del riquadro in basso a sinistra della figura B19, si può osservare che uno contiene solo il composto rosso e blu, l'altro solo quello rosso e verde, e il terzo solo quello rosso e giallo. Inoltre, mentre il numero delle reazioni avvenute corrisponde a $n + m$, quello dei composti sintetizzati sarà $n \times m$. Tornando ai valori di n e m per il caso di chimica combinatoria da noi prima ipotizzato, un totale di $20 + 40 = 60$ reazioni produrrà un totale di $20 \times 40 = 800$ composti diversi. In alcuni casi si possono effettuare i saggi direttamente sui composti ancora legati al granulo, per trovare quelli con le proprietà desiderate (figura B20). Alternativamente, ciascun granulo può essere isolato, il composto può essere staccato dal granulo, e ottenuto in forma libera per essere analizzato. Una volta trovato un composto interessante, verranno utilizzati metodi analitici di vario tipo, per identificarlo nell'insieme degli $n \times m$ composti sintetizzati.

L'«universo» dei potenziali farmaci è molto vasto. In teoria sarebbe possibile sintetizzare più di 10^{40} composti con peso molecolare inferiore a 750. Quindi, anche se milioni di composti sono disponibili nelle «ampie» librerie oggi esistenti, in realtà solo una minuscola frazione di tutti i composti chimici possibili è disponibile per essere studiata.

Si possono progettare farmaci sulla base delle informazioni disponibili sulla struttura tridimensionale dei loro bersagli molecolari

Molti farmaci si legano ai loro bersagli molecolari con una modalità che ricorda il modello della chiave e serratura di Emil Fischer. Su questa base dovrebbe essere possibile progettare la chiave avendo sufficienti informazioni sulla forma e sulla composizione chimica della serratura. In altri termini, in teoria dovrebbe essere possibile progettare una piccola molecola, complementare per forma e per struttura elettronica a una regione di una proteina bersaglio, in modo che sia effettivamente in grado di legarsi. Ma, nonostante sia possibile definire abbastanza rapidamente strutture tridimensionali, la realizzazione di un simile progetto non è ancora a portata di mano. È difficile infatti progettare composti stabili, che ab-

biano la forma e le proprietà giuste per interagire correttamente e con precisione col sito di legame di una proteina, perché è difficile predire qual è in realtà la struttura del composto che meglio si adatta al sito. Predire l'affinità di legame richiede che siano note in dettaglio non solo le possibili interazioni tra il composto e il sito di legame, ma *anche* quelle tra il composto e il solvente, una volta che il composto viene a trovarsi libero in soluzione.

Ciò nonostante, la *progettazione basata su dati strutturali* è risultata molto utile per lo sviluppo di nuovi farmaci. Un importante successo è stata la sintesi dei farmaci che inibiscono la proteasi del virus HIV. Consideriamo in particolare l'inibitore denominato indinavir (Crixivan®; cap. 9, p. 216). Erano già state scoperte due serie di composti che avevano elevata capacità inibitoria, ma bassa solubilità e biodisponibilità. L'analisi cristallografica ai raggi X e la modellistica molecolare avevano suggerito che una molecola ibrida avrebbe dovuto possedere un'alta capacità inibitoria unita a una buona biodisponibilità (figura B21). Una volta sintetizzata, la molecola in effetti si dimostrò efficace, pur avendo bisogno di essere ottimizzata. I dati strutturali suggerivano che esisteva una zona della molecola che avrebbe potuto tollerare modifiche strutturali. Fu allora sintetizzata tutta una serie di composti da esa-

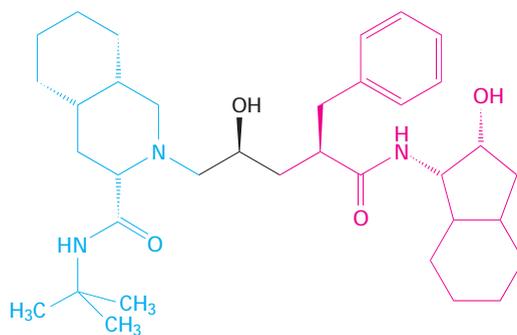


Figura B21 La prima molecola progettata per inibire la proteasi dell'HIV

La molecola è stata progettata combinando la porzione di un composto dotata di buona attività inibitoria ma bassa solubilità (porzione della molecola mostrata in rosso) e la porzione di un altro composto dotato di buona solubilità (porzione della molecola mostrata in blu).

minare (figura B22). Quelli più attivi presentavano però anche una bassa biodisponibilità, eccetto uno, che mostrò una accettabile biodisponibilità, unita a una buona attività inibitoria. La massima concentrazione sierica dopo somministrazione orale risultò significativamente più elevata dei livelli richiesti per inibire la moltiplicazione virale. Questo farmaco, come pure altri inibitori della proteasi virale sintetizzati nello stesso periodo, sono stati usati in combinazione con altri farmaci per il trattamento dell'AIDS, con risultati molto più incoraggianti rispetto quelli ottenuti in precedenza (figura B23).

Il bersaglio molecolare dell'aspirina, come già detto in precedenza, è il sito cicloossigenasico della prostaglandina H₂ sintasi. Studi condotti su-

R =	IC ₅₀ (nmol)	log (P)	C _{max} (μM)
	0,4	4,67	< 0,1
	0,01	3,70	< 0,1
	0,3	3,69	0,7
	0,6	2,92	11

Figura B22 Ottimizzazione dei composti

Per i quattro composti mostrati in rosso sono stati determinati nel siero di cane i seguenti parametri: la IC₅₀ (la concentrazione richiesta per ridurre la replicazione dell'HIV fino al 50% del valore massimo raggiungibile), il log P, e la C_{max} (la concentrazione massima raggiunta dal composto). Il composto mostrato in basso possiede il potere inibitorio minore (misurato come IC₅₀), ma di gran lunga la migliore biodisponibilità (misurata come C_{max}). Tale composto è stato scelto come punto di partenza per la realizzazione di altri farmaci, fino alla produzione dell'indinavir (Crixivan®).

Figura B23 Effetti dovuti all'introduzione dei farmaci anti-HIV

La diminuzione della mortalità da infezione da HIV (AIDS), verificatasi subito dopo l'introduzione degli inibitori della proteasi dell'HIV in combinazione con gli inibitori della trascrittasi inversa, dimostra il fortissimo impatto che tali farmaci hanno avuto sulla diffusione dell'AIDS. I grafici si riferiscono alla mortalità dovuta alle cause più frequenti tra i soggetti affetti da AIDS di età compresa tra i 24 e i 44 anni negli Stati Uniti. [Fonte: Centers for Disease Control.]

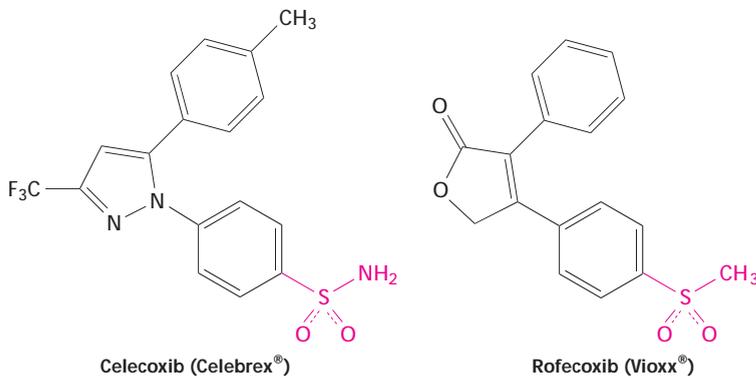
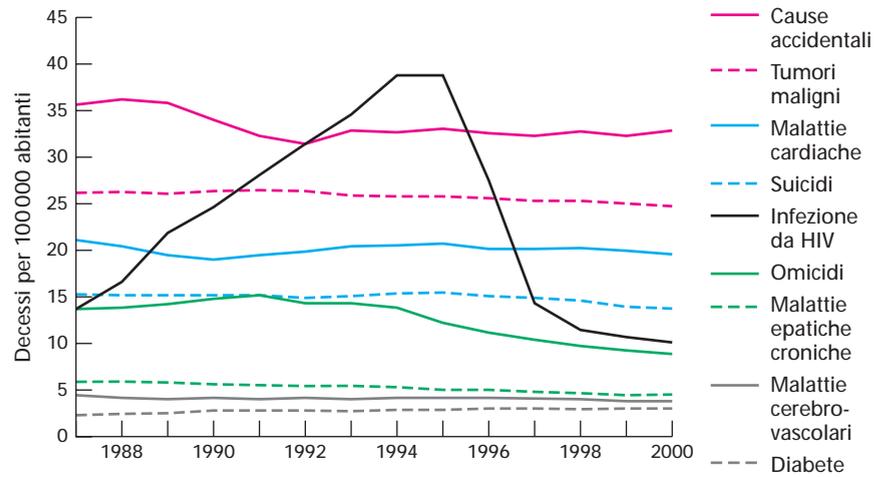


Figura B24 Inibitori specifici della COX2

I due composti presentano protuberanze (indicate in rosso), in grado di posizionarsi esattamente nella tasca dell'isozima COX2, che nel contempo impediscono stericamente l'interazione con l'isozima COX1.

gli animali hanno evidenziato che i mammiferi contengono non una, ma due distinte cicloossigenasi. Ambedue fungono da bersaglio dell'aspirina. Ma l'enzima scoperto più di recente, la cicloossigenasi 2 (COX2), viene espresso soprattutto in risposta a un episodio infiammatorio, mentre l'espressione della cicloossigenasi 1 (COX1) ha un carattere più generale. Perciò un ipotetico inibitore specifico per la COX2 dovrebbe essere in grado di ridurre l'infiammazione che si riscontra in malattie come l'artrite, senza produrre gli effetti collaterali a livello gastrico, di cui è responsabile l'aspirina.

Le sequenze amminoacidiche della COX1 e della COX2, dedotte dai rispettivi cDNA, mostrano una omologia di oltre il 60%, il che suggerisce che le due proteine enzimatiche hanno una struttura spaziale simile. Tuttavia sono state trovate alcune differenze nella natura dei residui che circondano il sito per l'aspirina. La cristallografia a raggi X ha dimostrato che nella COX2 è presente una estensione della tasca dove si posiziona l'aspirina, che non è presente nella COX1. Questa differenza strutturale tra i due enzimi ha suggerito una strategia per la sintesi di inibitori

specifici della COX2: la progettazione di composti dotati di una protuberanza che sia in grado di posizionarsi esattamente nella tasca della COX2, ma non in quella della COX1. Composti con tali caratteristiche sono stati infatti progettati, sintetizzati e, una volta perfezionati, sono diventati farmaci di uso comune, come il Celebrex® e il Vioxx® (figura B24). Il successo di questa tecnica innovativa ha dimostrato le grandi potenzialità della progettazione, basata sulle conoscenze strutturali, di farmaci altamente specifici, in grado di riconoscere bersagli molecolari strutturalmente correlati.

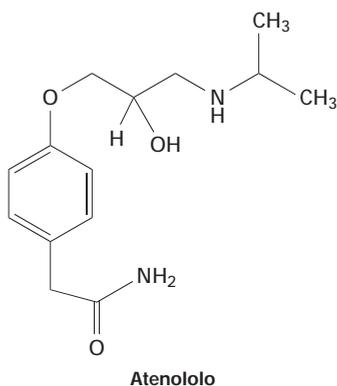
B3 L'ANALISI DEI GENOMI PROMETTE IMPORTANTI SVILUPPI VERSO LA SCOPERTA DI NUOVI FARMACI

Il sequenziamento dell'intero genoma umano e di altri genomi, portati a termine di recente, ha messo a disposizione dei ricercatori un mezzo potentissimo per la scoperta di nuovi farmaci. Il sequenziamento del genoma umano di per sé, e anche tutto il lavoro analitico a esso correlato, hanno aumentato considerevolmente le nostre conoscenze sulle proteine codificate dal genoma stesso. Si tratta di una nuova fonte di conoscenze, che permetterà di accelerare notevolmente i primi stadi del processo di sviluppo dei farmaci, e perfino di disegnare farmaci a misura del singolo paziente.

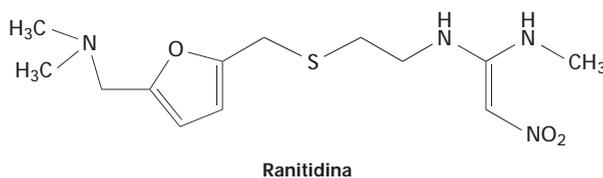
È possibile identificare potenziali bersagli nel proteoma umano

Il genoma umano codifica approssimativamente 23 000 proteine, senza tener conto delle modificazioni prodotte dagli splicing alternativi del-

l'mRNA e delle modificazioni post-traduzionali. Molte di queste proteine, in particolare gli enzimi e i recettori, la cui attivazione o inibizione produce effetti biologici significativi, potrebbero costituire altrettanti bersagli molecolari. Alcune famiglie di proteine a elevato peso molecolare sono una ricca sorgente di bersagli molecolari. Per esempio, più di 500 proteine chinasi sono codificate dal genoma umano. Ciascuna di esse può essere riconosciuta e identificata, confrontando le diverse sequenze amminoacidiche dedotte dalle sequenze nucleotidiche del genoma. È noto che una di queste proteine, la Bcr-Abl chinasi, è implicata nell'insorgenza della leucemia, ed è quindi il bersaglio di un farmaco specifico, l'imatinib mesilato (Gleevec®; cap. 15, p. 382). Altre proteine chinasi svolgono un ruolo centrale in particolari tipi di tumore. Ancora, il genoma umano codifica circa 800 recettori 7TM (cap. 15, p. 363), dei quali circa 350 sono recettori olfattori. Molte altre proteine della stessa famiglia sono potenziali bersagli, o sono già state utilizzate come bersagli molecolari di alcuni farmaci. Per esempio, il recettore β -adrenergico è il bersaglio molecolare del beta bloccante atenololo. Il recettore H_2 dell'istamina, che fa parte della famiglia dei recettori 7TM e partecipa al controllo della secrezione acida gastrica, è il bersaglio molecolare del farmaco antiulcera ranitidina (Zantac®).



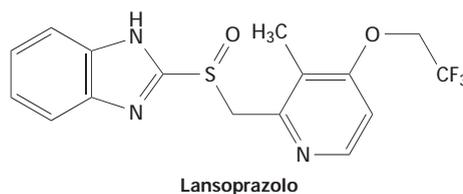
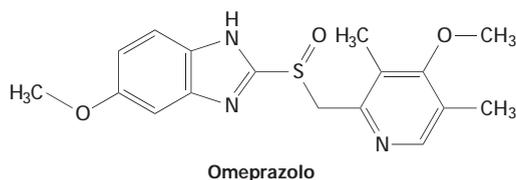
Nuove proteine, che non fanno parte di quelle famiglie proteiche che hanno già fornito bersagli molecolari, possono essere identificate ancora più facilmente, utilizzando informazioni che il genoma umano stesso può fornire. Si possono seguire diverse vie per identificare le proteine che potrebbero fungere da bersagli di potenziali farmaci. Una è quella di studiare, in cellule ottenute da organismi portatori di malattie, le variazioni strutturali che si verificano durante l'espressione e la localizzazione delle proteine, o durante le modificazioni post-traduzionali. Un'altra è quella di condurre studi su tessuti o cellule dove sono espressi geni particolari. L'analisi del geno-



ma umano dovrebbe condurre a un aumento di due o tre volte del numero dei bersagli molecolari riconoscibili dai potenziali farmaci.

Si possono utilizzare modelli animali per verificare la validità dei potenziali bersagli molecolari dei farmaci

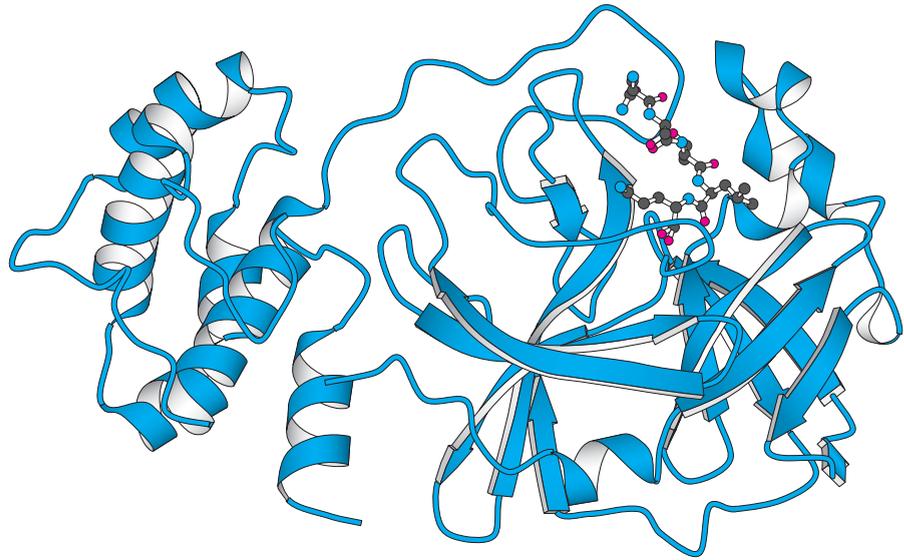
Sono stati sequenziati i genomi di alcuni animali, frequentemente utilizzati come modelli sperimentali. Il più importante ai fini dello sviluppo di nuovi farmaci è il genoma del topo, che per il 70% è identico a quello dell'uomo. Inoltre, più del 98% dei geni umani hanno la loro controparte nel topo. Gli studi sul topo forniscono un potente mezzo di indagine per lo sviluppo di nuovi farmaci, che consiste nella possibilità di sopprimere geni specifici («knockout genico») nel topo (cap. 6, p. 148). Se la soppressione genica produce un effetto interessante, allora il prodotto del gene costituirà un promettente bersaglio molecolare. L'utilità di un tale approccio è stato dimostrato retrospettivamente. Per esempio, la soppressione del gene per la subunità α della H^+ - K^+ ATPasi, una proteina che svolge un ruolo primario nella secrezione di acido cloridrico nello stomaco, dà origine a topi che presentano una bassa concentrazione di acido nello stomaco, corrispondente a un pH di 6,9, contro un pH di 3,2 dei topi controllo. La subunità α della H^+ - K^+ ATPasi è il bersaglio dei farmaci omeprazolo (Prilosec®) e lansoprazolo (Prevacid® e Takepron®), usati per il trattamento del reflusso gastro-esofageo.



Oggi vengono compiuti notevoli sforzi su larga scala, intesi a produrre in laboratorio centinaia

Figura B25 Un bersaglio molecolare emergente

La figura mostra la struttura della proteasi del coronavirus, l'agente patogeno della SARS (*severe acute respiratory syndrome*, «sindrome respiratoria acuta grave»), legata a un inibitore. La struttura è stata risolta meno di un anno dopo la scoperta del virus.



o addirittura migliaia di ceppi murini, ciascuno portatore di una soppressione genica. L'analisi di tali fenotipi suggerisce se la proteina codificata dal gene soppresso è o no un promettente bersaglio molecolare. Questo tipo di approccio permette ai ricercatori che si occupano dello sviluppo di nuovi farmaci di valutare potenziali bersagli senza preve nozioni sulle funzioni fisiologiche.

Nei genomi di organismi patogeni si possono identificare potenziali bersagli

Le proteine umane non sono il solo importante bersaglio molecolare dei farmaci. Farmaci come la penicillina e gli inibitori della proteasi dell'HIV hanno come bersaglio le proteine degli agenti patogeni, anziché dell'uomo. Perciò le centinaia di genomi di organismi patogeni che sono stati sequenziati fino a oggi costituiscono una miniera di potenziali bersagli.

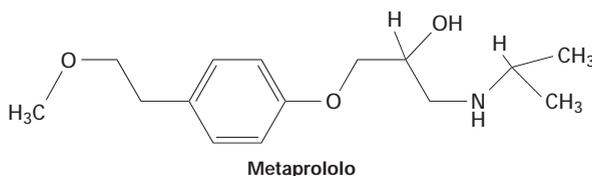
Per combattere la moltiplicazione dei batteri diventati resistenti a un gran numero degli antibiotici fino a oggi disponibili sono necessari nuovi antibiotici. Un approccio è quello di individuare le proteine che risultano conservate nel maggior numero possibile di batteri. I farmaci in grado di inattivarle dovrebbero possedere attività antibiotica ad ampio spettro, quindi risultare uti-

li per il trattamento di infezioni provocate da un gran numero di batteri patogeni. Una di tali proteine è la deformilasi, un enzima che rimuove i gruppi formilici presenti nella terminazione amminica di proteine batteriche subito dopo il processo di traduzione (cap. 29, p. 759).

In alternativa potrebbe essere necessario progettare un farmaco contro uno specifico agente patogeno, per esempio contro la sindrome respiratoria acuta grave (SARS). Appena un mese dopo il riconoscimento di questa nuova sindrome a carattere epidemico, è stato isolato il virus responsabile, e nel giro di settimane ne è stato completamente sequenziato il genoma formato da 29 751 basi. La sequenza ha rivelato la presenza di un gene che codifica la proteasi virale, già noto perché è essenziale per la replicazione di altri membri della famiglia dei coronavirus, a cui appartengono i virus della SARS. La ricerca in questo settore è oggi rivolta alla realizzazione di specifici inibitori della proteasi (figura B25).

Le differenze genetiche influenzano le risposte individuali ai farmaci

Molti farmaci non risultano efficaci in tutti i pazienti, spesso a causa di differenze genetiche individuali. I soggetti che non rispondono a un farmaco possono presentare piccole differenze nella molecola bersaglio o nelle proteine che partecipano al trasporto e al metabolismo del farmaco. Il fine ultimo di discipline emergenti, come la farmacogenetica e la farmacogenomica, è di disegnare farmaci in grado di agire in modo differenziato da persona a persona o specificamente adattabili ai particolari genotipi.



Farmaci come il metoprololo, il cui bersaglio è il recettore β_1 -adrenergico, sono oggi ampiamente utilizzati per il trattamento dell'ipertensione. Ma alcuni soggetti non rispondono adeguatamente. Nella popolazione statunitense sono state trovate due varianti del gene che codifica il recettore β_1 -adrenergico. L'allele più comune presenta una serina in posizione 49 e un'arginina in posizione 349. Però nel recettore di alcuni soggetti la glicina sostituisce uno o l'altro dei due residui. I soggetti che possiedono due copie dell'allele più comune rispondono bene al metoprololo: la loro pressione diastolica si riduce in media di circa $14,7 \pm 2,9$ mm Hg. Per contro, i soggetti che possiedono una delle due varianti alleliche rispondono meno. Infine il farmaco non ha effetti significativi nei soggetti con due varianti alleliche (figura B26). Queste osservazioni suggeriscono l'utilità di conoscere i genotipi individuali. Sarebbe così possibile predire se il trattamento con il metoprololo o altri β -bloccanti avrà o non avrà effetto.

Vista l'importanza che l'ADME e la tossicità hanno nella determinazione dell'efficacia dei farmaci, non sorprende che le variazioni strutturali delle proteine coinvolte nel trasporto e nel metabolismo dei farmaci possano alterarne l'effetto. Un esempio importante è l'uso delle tiopurine, quali la 6-tioguanina, la 6-mercaptopurina e l'azatioprina, per il trattamento di patologie come la leucemia, i disordini immunitari e le sindromi infiammatorie intestinali.

Le comuni dosi di questi farmaci, generalmente ben tollerate dalla grande maggioranza dei pazienti, talvolta risultano tossiche per alcuni soggetti. Tali differenze sono dovute a rare varianti

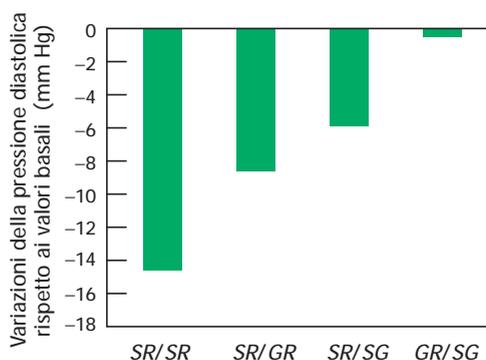
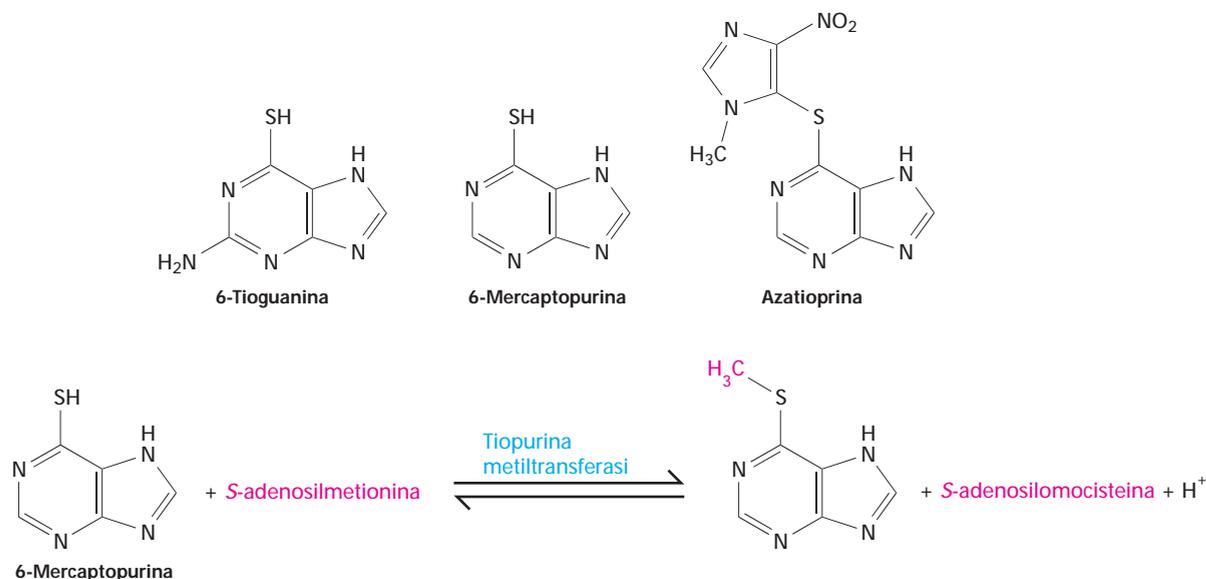


Figura B26 Correlazione fenotipo-genotipo

Variazioni medie della pressione diastolica in soggetti trattati con metoprololo. I soggetti con due copie dell'allele più comune ($S_{49}R_{349}$) rispondono al metoprololo con una diminuzione significativa della pressione. Quelli con una sola variante allelica (GR o SG) rispondono con una diminuzione più modesta, e quelli con due varianti alleliche (GR/SG) non presentavano alcuna diminuzione. [Fonte: J. A. Johnson et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* 74(2003): 44-52.]

del gene che codifica la tiopurina metiltransferasi, un enzima che metabolizza gli xenobiotici, e che catalizza l'aggiunta di un residuo metilico ad atomi di zolfo.

La forma variante dell'enzima è meno stabile. I pazienti che ne sono portatori possono quindi accumulare livelli abnormi dei farmaci se non si prendono opportune precauzioni. Quindi la variabilità genetica di un enzima coinvolto nel metabolismo dei farmaci gioca un ruolo importante nel determinare il grado di tolleranza alle particolari concentrazioni del farmaco. Molti altri enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci e altre proteine coinvolte nel trasporto dei farmaci sono state implicate nel controllo delle reazioni individuali a specifici farmaci. L'identificazione dei fattori genetici permetterà di capire meglio perché alcuni farmaci risultino efficaci in alcuni soggetti, e in altri invece abbiano scarso effetto. È probabile che in futuro i medici, attraverso l'esame del genotipo di ciascun paziente, potranno meglio programmare la terapia.



B4 LO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI PROCEDE ATTRAVERSO DIVERSI STADI

Negli Stati Uniti la FDA (Food and Drug Administration) richiede non solo che i potenziali farmaci dimostrino la loro efficacia, ma anche che non risultino dannosi per l'uomo, se somministrati su larga scala. Queste caratteristiche sono particolarmente importanti per quei farmaci destinati a essere somministrati a soggetti relativamente sani. Un certo numero di effetti collaterali è invece tollerato per quei farmaci progettati per il trattamento di malattie gravi, per esempio alcune gravi forme tumorali, quando è chiaro che il mancato trattamento avrebbe sfavorevoli conseguenze.

La sperimentazione clinica richiede tempi lunghi e ha costi elevati

La sperimentazione clinica serve a saggiare l'efficacia del farmaco in esame, e a evidenziarne i possibili effetti collaterali, prima che la FDA ne autorizzi l'utilizzo in terapia. La sperimentazione clinica procede attraverso almeno tre fasi (figura B27). Nella fase 1 un modesto numero di volontari sani (in genere da 10 a 100) assumono il farmaco per uno studio preliminare sulla sua eventuale tossicità. Si somministrano dosi crescenti del farmaco, per monitorarne gli eventuali effetti tossici. Durante questa fase non viene specificamente valutato l'effetto terapeutico.

Nella fase 2 l'efficacia del farmaco in esame viene valutata su un piccolo campione di soggetti, che si pensa potrebbero trarne giovamento. Anche in questa fase si possono trarre ulteriori deduzioni sulla sua eventuale tossicità. La sperimentazione clinica viene controllata, anche in doppio cieco. Nella normale procedura di controllo i soggetti in esame vengono divisi a caso in due gruppi. Ai soggetti appartenenti a un gruppo viene somministrato il farmaco in esame. I soggetti del gruppo di controllo vengono invece trattati o col placebo, cioè con una compressa contenente zucchero o qualche altro composto di nessun valore intrinseco, oppure col farmaco nelle condizioni standard migliori, se si pensa che

il non somministrare affatto il farmaco non sia eticamente accettabile. Nella sperimentazione in doppio cieco, né i soggetti in esame, né i ricercatori sanno quali sono i soggetti che appartengono al gruppo dei trattati e quali al gruppo di controllo, e non vi è quindi alcuna possibilità che essi vengano in qualche modo influenzati. Una volta terminata la sperimentazione clinica, si aprono le buste che identificano i soggetti sotto trattamento e i soggetti di controllo, e gli effetti sui due gruppi vengono messi a confronto. Spesso nella fase 2 si somministrano dosi diverse del farmaco, per stabilire fino a che dose il farmaco non provoca effetti collaterali di rilievo, e quali dosi risultano efficaci terapeuticamente.

Non si deve trascurare l'effetto placebo, cioè la tendenza a percepire segni di miglioramento da parte di soggetti che pensano di essere stati sottoposti a un trattamento terapeutico potenzialmente efficace. In uno studio di chirurgia artroscopica per alleviare il dolore al ginocchio, i soggetti ai quali era stato fatto credere di essere stati sottoposti a trattamento chirurgico, tramite l'uso di videocassette o con altri mezzi, hanno riferito lo stesso grado di miglioramento dei soggetti effettivamente operati.

Nella fase 3, la stessa sperimentazione clinica viene effettuata su larga scala. Il fine è quello di stabilire in modo definitivo l'efficacia del farmaco in esame, e di determinare gli effetti collaterali che si evidenziano in bassa percentuale nei soggetti trattati. Migliaia di soggetti possono partecipare a una tipica fase 3.

La sperimentazione clinica è estremamente costosa. Si devono reclutare centinaia o migliaia di pazienti, che dovranno essere monitorati durante tutto il periodo della sperimentazione. Medici, infermieri, farmacologi clinici, statistici e ricercatori con diverse competenze partecipano alla progettazione e all'esecuzione dei test. I costi vanno da alcune decine ad alcune centinaia di milioni di euro. Tutte le osservazioni fatte vanno accuratamente registrate, anche quelle che riguardano le reazioni indesiderate. I dati vengono raccolti e sottoposti al giudizio della FDA. La realizzazione di un farmaco, dalla progettazione fino alla commercializzazione, ha un costo complessivo che oscilla tra i 400 e gli 800 milioni di euro.

Figura B27 Le fasi della sperimentazione clinica

La sperimentazione clinica procede attraverso tre fasi che verificano la sicurezza e l'efficacia di un farmaco in gruppi di soggetti sempre più numerosi.



Ma, anche dopo che il farmaco è stato approvato e diventato di uso comune, possono insorgere ulteriori difficoltà. Per esempio, il rofecoxib (Vioxx®) è stato ritirato dal commercio a seguito di evidenti effetti collaterali a livello cardiaco emersi durante ulteriori prove cliniche.

L'insorgenza della resistenza può limitare l'utilità dei farmaci contro le malattie infettive e il cancro

Molti farmaci possono essere assunti per lunghi periodi di tempo, senza che perdano la loro efficacia. Però in alcuni casi, come per le malattie infettive e il cancro, il trattamento terapeutico, inizialmente efficace, col tempo diventa sempre meno efficiente. In altre parole, la malattia diventa resistente al trattamento farmacologico. Qual è l'origine del fenomeno? Le malattie infettive e il cancro hanno una caratteristica in comune: i soggetti colpiti contengono molte cellule (o virus), che possono mutare e riprodursi. Dal punto di vista biologico tali caratteristiche sono necessarie ai fini evolutivi. Quindi una singola cellula batterica o una singola cellula cancerosa può casualmente andare incontro a una variazione genetica che la rende più adatta a crescere e a riprodursi, anche in presenza del farmaco. Tali tipi di cellule tendono quindi a prendere il sopravvento su tutte le altre. Man mano che la pressione selettiva esercitata dalla somministrazione del farmaco procede, la popolazione di cellule batteriche o cancerose resistenti cresce sempre di più rispetto a tutte le altre. La resistenza può instaurarsi attraverso meccanismi diversi.

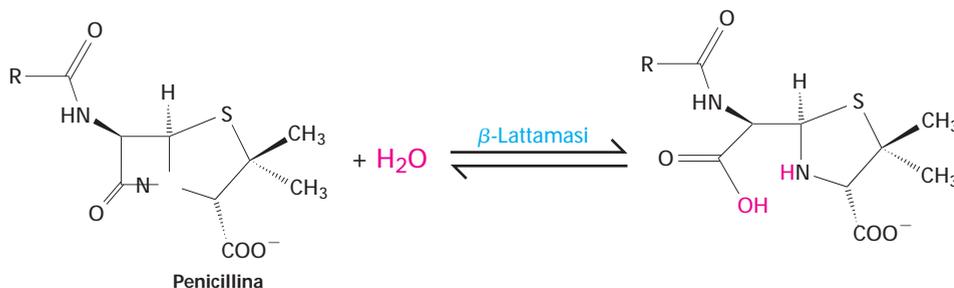
Gli inibitori della proteasi dell'HIV discussi in precedenza sono un esempio importante che illustra il meccanismo di insorgenza della resistenza ai farmaci. I retrovirus vanno facilmente incontro al fenomeno della resistenza, perché la loro trascrittasi inversa, che catalizza la replicazione dell'RNA virale, non possiede il meccanismo della «correzione delle bozze». In un genoma di 9750 basi, come è quello del virus HIV, una mutazione puntiforme può avvenire più di

1000 volte al giorno in un soggetto infetto. Possono avvenire anche diverse mutazioni multiple. Molte di tali mutazioni non hanno effetto, o possono risultare dannose per il virus. Però alcune particelle virali mutanti codificano proteasi che risultano meno suscettibili all'inibizione da parte del farmaco. Quindi, in presenza di un inibitore della proteasi dell'HIV questi virus tendono a replicarsi meglio della restante popolazione virale. Col passare del tempo i virus mutanti diventano dominanti, fino a che tutta la popolazione virale diventa resistente.

I microrganismi patogeni possono diventare resistenti agli antibiotici attraverso meccanismi totalmente differenti. Alcuni di essi possiedono enzimi che inattivano o degradano specificamente certi antibiotici. Per esempio, molti microrganismi sono resistenti ai derivati β -lattamici, come la penicillina, perché contengono enzimi che idrolizzano l'anello β -lattamico (vedi sotto). Idrolizzando tale anello, questi enzimi rendono inattivi i farmaci che lo contengono.

Molti di questi enzimi sono codificati dai plasmidi, piccoli frammenti di DNA circolare, spesso trasportati dai batteri. Molti plasmidi si trasferiscono facilmente da una cellula batterica all'altra, contribuendo così al trasferimento della resistenza agli antibiotici. Il trasferimento dei plasmidi è uno dei principali fattori responsabili della diffusione della resistenza agli antibiotici, ancora oggi una delle sfide più difficili che la medicina moderna si trova a dover affrontare. D'altro canto, i plasmidi vengono ampiamente utilizzati in laboratorio, nella tecnologia del DNA ricombinante (cap. 6, p. 139).

La resistenza ai farmaci insorge comunemente nel corso del trattamento dei tumori. Le cellule cancerose sono caratterizzate dalla capacità di crescere rapidamente, avendo perso alcuni meccanismi inibitori propri delle cellule normali. Molti dei farmaci usati in chemioterapia inibiscono i processi responsabili della rapida crescita cellulare. Però ogni singola cellula cancerosa può accumulare mutazioni genetiche, che mitigano l'effetto dei chemioterapici. Tali cellule mu-



tate tenderanno a crescere più rapidamente delle altre, fino a diventare dominanti. La tendenza delle cellule cancerose a mutare rapidamente costituisce uno dei maggiori ostacoli a una delle più importanti scoperte nel campo della terapia dei tumori: l'uso di inibitori di proteine specifiche delle cellule tumorali, presenti in certi tipi di leucemia (cap. 15, p. 381). Per esempio, nei pazienti trattati con imatinib mesilato, un farmaco inibitore della proteina chinasi Bcr-Abl, si osserva regressione del tumore. Sfortunatamente, però, dopo alcuni anni il tumore ricompare in molti dei pazienti trattati. Nella maggior parte dei casi si osserva che alcune mutazioni hanno condotto alla sintesi di una proteina Bcr-Abl alterata, non

più suscettibile all'inibizione da parte delle concentrazioni di imatinib mesilato usate in terapia.

Nel corso del trattamento chemioterapico i pazienti affetti da tumore assumono spesso più farmaci contemporaneamente, e in molti casi le cellule cancerose diventano resistenti a molti di essi o a tutti. La resistenza multipla ai farmaci può essere dovuta alla proliferazione di cellule che sovraesprimono un certo numero di proteine ABC, che pompano i farmaci fuori della cellula (cap. 13, p. 320). Quindi le cellule cancerose possono diventare resistenti ai farmaci, o perché sovraesprimono proteine umane normali, o perché modificano proteine proprie di uno specifico fenotipo tumorale.

RIEPILOGO

B1 Lo sviluppo di nuovi farmaci comporta la risoluzione di problemi assai complessi

La maggior parte dei farmaci agisce legandosi a enzimi o a recettori, modulandone l'attività. Per esercitare la loro azione, essi devono legarsi ai loro bersagli molecolari con elevata affinità e specificità. Tuttavia molti composti, pur possedendo queste caratteristiche, non possono essere utilizzati come farmaci, perché vengono male assorbiti, o rapidamente escreti, o modificati attraverso vie metaboliche deputate alla modifica delle sostanze estranee. In conseguenza, se vengono assunti oralmente, questi composti non si legano ai loro bersagli molecolari nelle concentrazioni desiderate per un periodo di tempo sufficiente. Le proprietà di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione di un farmaco vengono collettivamente indicate con l'acronimo ADME. La biodisponibilità orale è una misura della capacità di un farmaco di essere assorbito; più precisamente è il rapporto tra la concentrazione massima raggiunta da una determinata dose di composto somministrato oralmente e la concentrazione massima raggiunta dalla stessa dose del composto somministrato parenteralmente. La struttura di un composto può influenzare la sua biodisponibilità in vari e complessi modi, tuttavia le regole di Lipinski forniscono alcuni criteri di generale utilità. Il metabolismo dei farmaci include la loro ossidazione, catalizzata dal complesso del citocromo P450 (fase I) e la loro coniugazione col glutatione, l'acido glucuronico, e il solfato (fase II). Un composto può non risultare utile terapeuticamente perché risulta tossico. La sua tossicità può dipendere da una eccessiva modulazione del bersaglio o dal fatto che si lega anche a proteine diverse da quelle bersaglio. Il fegato e i reni giocano un ruolo centrale nel metabolismo e nell'escrezione dei farmaci.

B2 Si possono scoprire potenziali farmaci per serendipità (osservazione fortuita), screening o progettazione

Molti farmaci sono stati scoperti per serendipità. La scoperta della penicillina risultò da una osservazione fortuita. Una muffa in grado di sintetizzare l'antibiotico, che per accidente aveva contaminato una coltura batterica, provocò la lisi dei batteri con cui era ve-

nuta a contatto. Farmaci come la clorpromazina e il sildenafil furono scoperti perché mostrarono effetti sull'uomo completamente diversi da quelli attesi. La capacità delle statine di diminuire il tasso di colesterolo è stata riconosciuta a seguito dello screening di un gran numero di composti che si pensava avessero effetti diversi. Le tecniche della chimica combinatoria sono state messe a punto per realizzare ampie collezioni di composti chimicamente correlati, ma pur sempre diversi, da essere sottoposti a screening. In alcuni casi, quando è disponibile la struttura tridimensionale del bersaglio del farmaco, si possono progettare inibitori potenti e specifici. Per esempio, l'indinavir, un inibitore della proteasi dell'HIV, e il celecoxib, un inibitore della cicloossigenasi 2, sono stati progettati secondo quest'ultimo criterio.

B3 L'analisi del genoma promette importanti sviluppi verso la scoperta di nuovi farmaci

Il genoma umano codifica approssimativamente 23000 proteine; in realtà sono molte di più, se si tiene conto anche di quelle sintetizzate a seguito dello splicing alternativo dell'mRNA e delle modifiche post-traduzionali. Le sequenze geniche possono essere considerate esse stesse potenziali bersagli dei farmaci. Numerose famiglie di proteine, come le proteina chinasi e i recettori 7TM, che prendono parte in processi fisiologici importanti, costituiscono il bersaglio molecolare per altrettanti farmaci di ampio uso. Ma anche i genomi di organismi modello sono utili per lo sviluppo di nuovi farmaci. Ceppi murini portatori di geni soppressi sono risultati utili per individuare i bersagli dei farmaci. I genomi dei batteri, dei virus e dei parassiti codificano molte proteine che costituiscono potenziali bersagli molecolari, e che possono essere utilizzate sia perché svolgono importanti funzioni, sia perché differiscono dalle proteine umane. I possibili effetti collaterali sono così minimizzati. Si possono esaminare le differenze genetiche tra individuo e individuo, per metterle in relazione con le differenti risposte ai farmaci. Il che può essere di aiuto sia alla pratica clinica, sia allo sviluppo dei farmaci.

B4 Lo sviluppo di nuovi farmaci procede attraverso diversi stadi

Prima che un composto possa essere somministrato all'uomo sotto forma di farmaco, deve essere sottoposto a numerosi test clinici, che ne stabiliscano la sicurezza e l'efficacia. La sperimentazione clinica viene effettuata in diversi stadi, prima per accertare soltanto la sicurezza del farmaco, poi la sicurezza e l'efficacia su un piccolo gruppo di soggetti, e infine la sicurezza e l'efficacia su un vasto gruppo di soggetti, al fine di evidenziare eventuali rari effetti collaterali in-

desiderati. A causa dell'elevato costo dei test clinici, la spesa globale per la messa in commercio di un nuovo farmaco si aggira intorno a 800 milioni di euro. Ma possono sopravvenire complicazioni, anche dopo che un farmaco è stato approvato per essere commercializzato. I pazienti affetti da malattie infettive e i pazienti portatori di tumori, dopo un certo periodo di trattamento sviluppano spesso il fenomeno della resistenza, perché anche in presenza dei farmaci compaiono e si moltiplicano varianti dell'agente patogeno che risultano meno suscettibili ai farmaci stessi.

PAROLE CHIAVE

ADME (p. 23)	costante di dissociazione apparente, K_d^{app} (p. 23)	progettazione dei farmaci basata su dati strutturali (p. 35)
ateroma (p. 32)	costante di inibizione, K_i (p. 23)	regole di Lipinski (p. 24)
barriera emato-encefalica (p. 25)	effetti collaterali (p. 23)	screening ad altissimo rendimento (p. 34)
biodisponibilità orale (p. 24)	glomerulo (p. 27)	sintesi per «separazione e rimescolamento» (p. 34)
chimica combinatoria (p. 34)	indice terapeutico (p. 28)	trasformazioni di fase I (p. 27)
circolo entero-epatico (p. 27)	ligando (p. 22)	trasformazioni di fase II (p. 27)
compartimenti (p. 24)	metabolismo dei farmaci (p. 25)	trasformazione metabolica primaria (p. 27)
composti xenobiotici (p. 25)	miopatia (p. 32)	
coniugazione (p. 25)	ossidazione (p. 25)	
costante di dissociazione, K_d (p. 22)		

LETTURE CONSIGLIATE

Libri

- Hardman, J. G., Limbird, L. E., Gilman, A. G., 2001. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (X ed.). McGraw-Hill Professional.
- Levine, R. R., Walsh, C. T., 2004. *Levine's Pharmacology: Drug Actions and Reactions* (VII ed.). Taylor and Francis Group.
- Silverman, R. B., 2004. *Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Academic Press.

ADME e tossicità

- Caldwell, J., Gardner, I., Swales, N., 1995. An introduction to drug disposition: The basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion. *Toxicol. Pathol.* 23:102-114.
- Lee, W., Kim, R. B., 2004. Transporters and renal drug elimination. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:137-166.
- Lin, J., Sahakian, D. C., de Moraes, S. M., Xu, J. J., Polzer, R. J., Winter, S. M., 2003. The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 3:1125-1154.
- Poggesi, I., 2004. Predicting human pharmacokinetics from preclinical data. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 7:100-111.

Esempi specifici

- Flower, R. J., 2003. The development of COX2 inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:179-191.
- Tobert, J. A., 2003. Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:517-526.
- Vacca, J. P., Dorsey, B. D., Schleif, W. A., Levin, R. B., McDaniel, S. L., Darke, P. L., Zugay, J., Quintero, J. C., Blahy, O. M., Roth, E., et al., 1994. L-735,524: An orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4096-4100.
- Wong, S., Witte, O. N., 2004. The BCR-ABL story: Bench to bedside and back. *Annu. Rev. Immunol.* 22:247-306.

Progettazione dei farmaci basata sulla struttura

- Kuntz, I. D., 1992. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science* 257:1078-1082.
- Dorsey, B. D., Levin, R. B., McDaniel, S. L., Vacca, J. P., Guare, J. P., Darke, P. L., Zugay, J. A., Emimi, E. A., Schleif, W. A., Quintero, J. C., et al., 1994. L-735,524: The design of a potent and orally bioavailable HIV protease inhibitor. *J. Med. Chem.* 37:3443-3451.
- Chen, Z., Li, Y., Chen, E., Hall, D. L., Darke, P. L., Culberson, C., Shafer, J. A., Kuo, L. C., 1994. Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases. *J. Biol. Chem.* 269:26344-26348.

Chimica combinatoria

- Baldwin, J. J., 1996. Design, synthesis and use of binary encoded synthetic chemical libraries. *Mol. Divers.* 2:81-88.
- Burke, M. D., Berger, E. M., Schreiber, S. L., 2003. Generating diverse skeletons of small molecules combinatorially. *Science* 302:613-618.
- Edwards, P. J., Morrell, A. I., 2002. Solid-phase compound library synthesis in drug design and development. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 5:594-605.

Genomica

- Zambrowicz, B. P., Sands, A. T., 2003. Knockouts model the 100 best-selling drugs: Will they model the next 100? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:38-51.
- Salemme, F. R., 2003. Chemical genomics as an emerging paradigm for postgenomic drug discovery. *Pharmacogenomics* 4:257-267.
- Michelson, S., Joho, K., 2000. Drug discovery, drug development and the emerging world of pharmacogenomics: Prospecting for information in a data-rich landscape. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2:651-654.
- Weinshilboum, R., Wang, L., 2004. Pharmacogenomics: Bench to bedside. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3:739-748.

PROBLEMI

1. *Vie che conducono alla scoperta di nuovi farmaci.* Per ciascuno dei farmaci elencati, dite se gli effetti fisiologici di ciascuno di essi sono stati riconosciuti prima o dopo l'identificazione del bersaglio molecolare. (a) Penicillina; (b) sildenafil (Viagra®); (c) rofecoxib (Vioxx®); (d) atorvastatina (Lipitor®); (e) acido acetilsalicilico (aspirina); (f) indinavir (Crixivan®).

2. *Regole di Lipinski.* Quale dei seguenti composti soddisfa le regole di Lipinski? [In parentesi i valori di $\log(P)$.] (a) Atenololo (0,23); (b) sildenafil (3,18); (c) indinavir (2,78).

3. *Calcolo dei $\log(P)$.* Sono stati effettuati molti tentativi per realizzare programmi computerizzati, in grado di predire i valori di $\log(P)$ interamente sulla base dell'esame delle strutture chimiche. Quale potrebbe essere l'utilità di tali programmi?

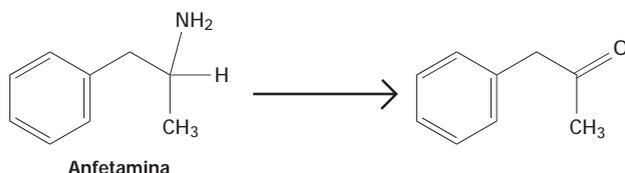
4. *Un'uncia di prevenzione.* Una proposta di legge prevede l'inclusione della *N*-acetilcisteina nelle compresse di acetaminofene. Discutete il possibile ruolo funzionale dell'additivo.

5. *Interazione tra farmaci.* Come discusso nel capitolo specifico, il coumadin può risultare dannoso, perché spesso provoca emorragie incontrollate. I soggetti che lo assumono devono quindi prestare particolare attenzione quando assumono anche altri farmaci, in particolare quelli che si legano all'albumina. Proponete un meccanismo per tale tipo di interazione tra farmaci.

6. *Come individuare il bersaglio.* I tripanosomi sono parassiti unicellulari, che causano la malattia del sonno. Durante uno degli stadi del loro ciclo cellulare, essi dimorano nel torrente circolatorio dell'uomo, e soddisfano tutto il loro fabbisogno energetico tramite la glicolisi, che avviene all'interno di organelli specializzati endocellulari, denominati glicosomi. Proponete un possibile bersaglio per il trattamento della malattia del sonno. Quali sono le potenziali difficoltà da superare?

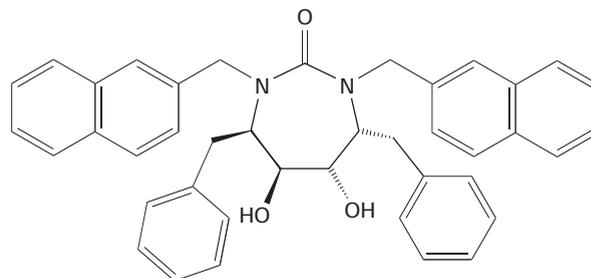
Problema sui meccanismi

7. *Variazioni sul tema.* Il metabolismo dell'anfetamina, di cui sono responsabili gli enzimi del sistema del citocromo P450, risulta nella trasformazione indicata qui sotto. Proponete un meccanismo e indicate altri eventuali prodotti.



Problema sull'interpretazione dei dati

8. *Progettazione di inibitori della proteasi dell'HIV.* Il composto A appartiene a un gruppo di composti progettati per agire da potenti inibitori della proteasi dell'HIV.



Composto A

Il composto A è stato sperimentato utilizzando due diversi saggi: (1) determinazione in vitro del grado di inibizione della proteasi dell'HIV e (2) inibizione della sintesi dell'RNA virale in cellule infettate dall'HIV, una misura della replicazione virale. I risultati vengono mostrati nelle due tabelle. L'attività della proteasi dell'HIV è stata misurata a una concentrazione del peptide substrato pari alla K_M dell'enzima.

Composto A (nM)	Attività della proteasi dell'HIV (unità arbitrarie)
0	11,2
0,2	9,9
0,4	7,4
0,6	5,6
0,8	4,8
1	4,0
2	2,2
10	0,9
100	0,2

Composto A (μ M)	Sintesi dell'RNA virale (unità arbitrarie)
0	760
1,0	740
2,0	380
3,0	280
4,0	180
5,0	100
10	30
50	20

Calcolate i valori delle K_I per il composto A nel saggio di attività proteasica e il valore del suo IC_{50} nel saggio di inibizione della sintesi dell'RNA virale.

Trattando i ratti con una dose relativamente alta del composto A (20 mg kg^{-1}), si raggiunge una concentrazione massima pari a $0,4 \mu\text{M}$. Sulla base di questo dato, vi aspettate che il composto A sia in grado di prevenire la replicazione dell'HIV, se assunto oralmente?