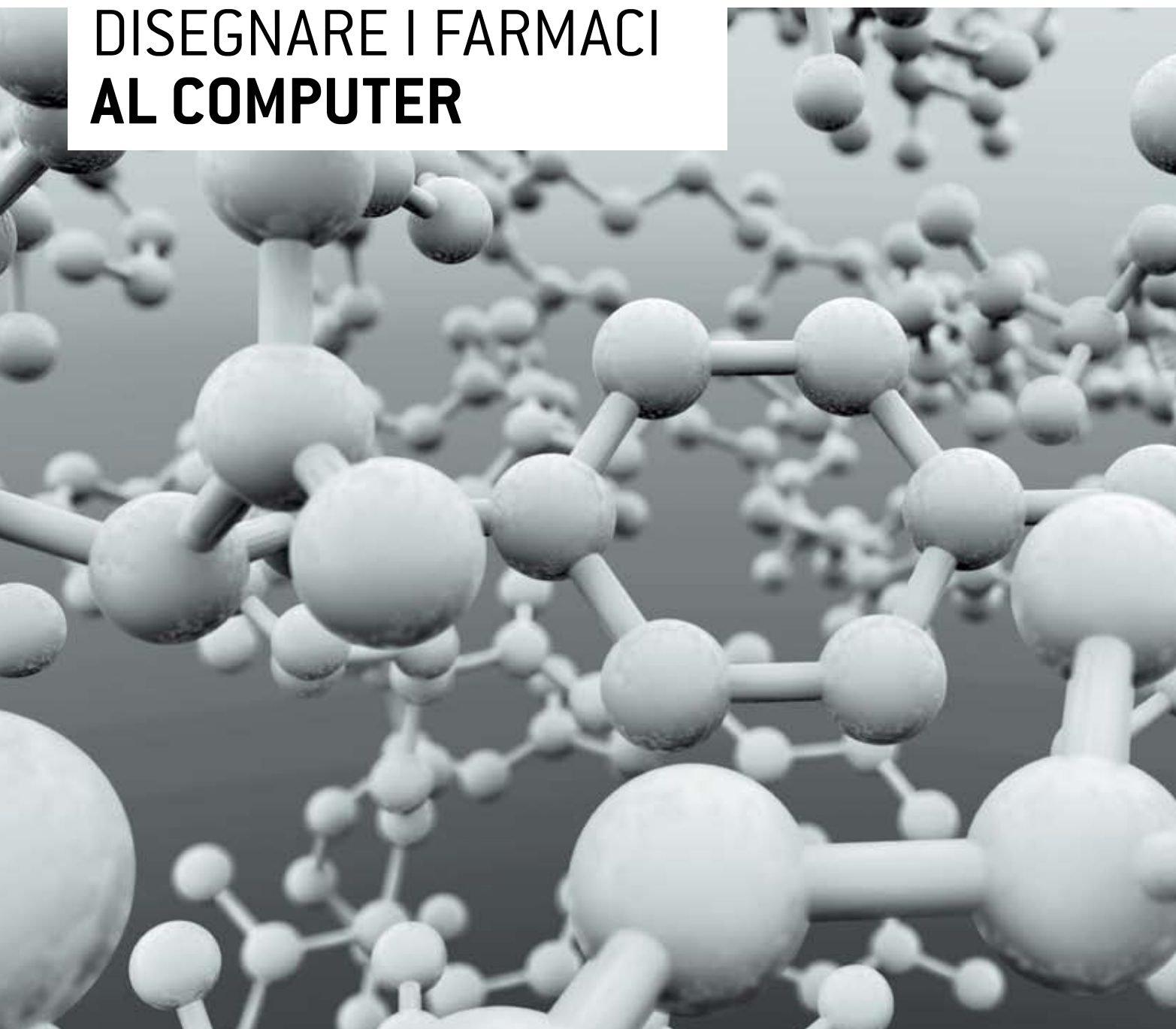


DISEGNARE I FARMACI AL COMPUTER



Non solo chimica e biologia: anche l'informatica è diventata fondamentale per progettare e sviluppare nuovi farmaci. Un *progettista molecolare* ci spiega come, partendo da informazioni genetiche e strutturali, il computer semplifichi e velocizzi la ricerca di sostanze terapeutiche.

 GIULIO RASTELLI



ISTOCKPHOTO

Discipline come la genomica e la biologia molecolare giocano un ruolo fondamentale nell'identificazione di bersagli biologici

I farmaci hanno modificato sostanzialmente il nostro modo di vivere. Grazie ai farmaci oggi è possibile curare malattie un tempo inguaribili, e la ricerca farmaceutica è costantemente impegnata in nuove sfide, come la lotta contro i tumori. Ma come avviene oggi la scoperta di un nuovo farmaco?

Per capire la differenza rispetto al passato, occorre ricordare che fino a non molto tempo fa è stato spesso il caso ad aver giocato un ruolo fondamentale nelle grandi scoperte farmaceutiche. Molti farmaci che tutti conosciamo, come alcune classi di antibiotici o di sulfamidici (altre sostanze antibatteriche), sono derivati da ipotesi di ricerca errate o a seguito di osservazioni impreviste nel corso di esperimenti in cui in realtà si stava cercando altro (ciò che va sotto il termine di *serendipità*). Oggi, senza un'ipotesi razionale basata sulla conoscenza delle basi molecolari delle malattie e senza una precisa pianificazione degli esperimenti in laboratorio non è possibile pensare di svolgere alcuna ricerca farmaceutica.

Alla ricerca del proiettile giusto

La scoperta di un nuovo farmaco, infatti, è il risultato di una complessa attività di ricerca e sviluppo che sempre più appare di carattere multidisciplinare. Immaginiamo di aver identificato nell'organismo umano un bersaglio biologico responsabile di una determinata patologia. Solitamente, questo è una proteina, un enzima, un recettore di membrana oppure un acido nucleico. Ebbene, dovremo ricercare un farmaco che funzioni come un "proiettile" in grado di "centrare" il bersaglio biologico e produrre così un effetto terapeutico. Il successo della ricerca dipenderà da un

complesso percorso composto di varie fasi sequenziali, tutte strettamente connesse tra loro. Si parte dall'identificazione di nuove molecole dotate di attività biologica nei confronti di un particolare bersaglio, per poi proseguire mediante livelli successivi di ottimizzazione di tutte quelle proprietà che concorrono nel trasformare una molecola biologicamente attiva in un farmaco.

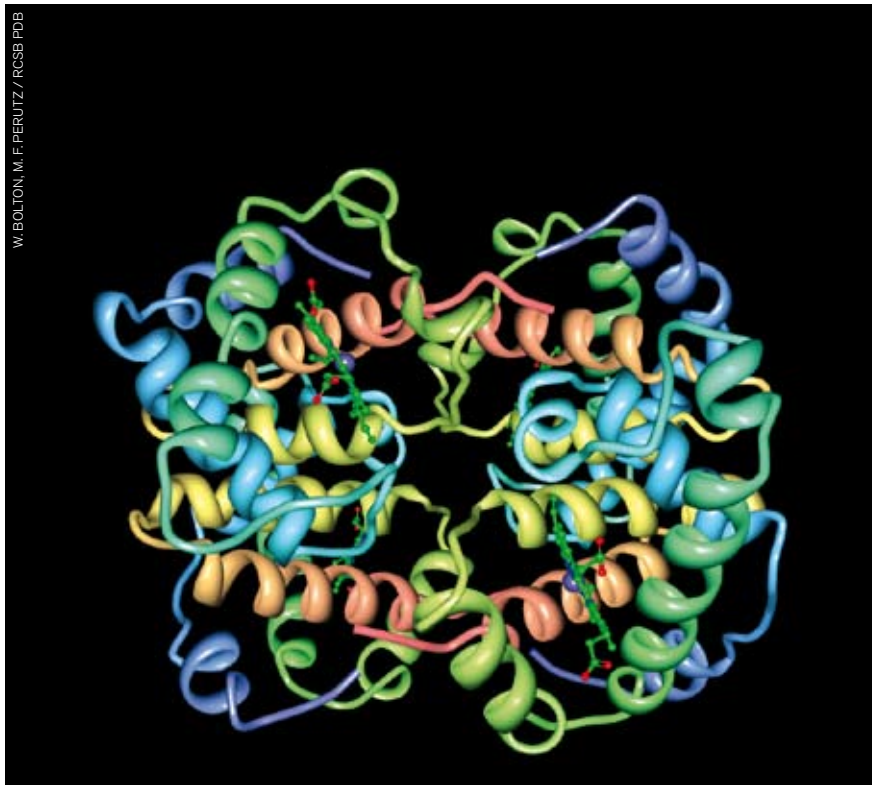
Geni come punto di partenza

Discipline come la genomica e la biologia molecolare giocano un ruolo fondamentale nell'identificazione di bersagli biologici. Basti pensare alla quantità di potenziali bersagli che potranno emergere dal Progetto genoma umano, il cui scopo è stato quello di mappare il genoma della nostra specie, definendo la sequenza, la struttura e la posizione dei circa 25 000 geni presenti. Un esempio: anche grazie ai risultati del Progetto genoma, sono state identificate nell'essere umano oltre 500 differenti chinasi (una famiglia di enzimi capace di trasferire gruppi fosfato da molecole donatrici come l'ATP a substrati specifici), molte delle quali fungono da regolatori chiave in varie tappe di sviluppo e progressione dei tumori. Per questo, oggi le chinasi sono studiate come potenziali bersagli biologici, al fine di sviluppare nuovi farmaci antitumorali.

Un processo in più fasi

Una volta individuati i bersagli biologici, bisogna definirne la struttura tridimensionale a un livello di precisione il più elevato possibile (caratterizzazione strutturale). Il risultato, ottenuto grazie a studi di biologia strutturale e di biologia computazionale, costituisce un punto di riferimento per costruire proiettili adatti a

Ricostruzione grafica di un modello di struttura tridimensionale di una proteina.



➤ **Struttura 3D di una molecola di emoglobina di cavallo. Sono evidenti i quattro gruppi eme posti al centro di ciascuna catena polipeptidica che compone la molecola.**

colpire solo quei bersagli e non altri. A questo punto, infatti, si procede con l'identificazione di molecole capaci di legarsi in modo efficace e selettivo al bersaglio selezionato. Come vedremo meglio in seguito, in questa operazione gioca un ruolo chiave la progettazione al computer. Una volta individuate le molecole proiettili che sembrano avere la migliore interazione possibile con il bersaglio biologico, queste vengono sintetizzate nel laboratorio chimico e poi valutate sperimentalmente attraverso saggi biologici e farmacologici *in vitro* e sulle cellule.

Se in questo modo si riesce a ottenere una molecola interessante, questa costituisce il punto di partenza per effettuare successive fasi di ottimizzazione delle sue proprietà, in un processo che è spesso iterativo. In pratica, le fasi di progettazione, sintesi e valutazione biologica vengono estese a un numero generalmente elevato di molecole, simili a quella di partenza ma più potenti o più selettive, oppure meno tossiche o maggiormente assorbibili.

Dal laboratorio al paziente

Il percorso, a questo punto, non è certo terminato. Dopo aver determinato una o più molecole che rispondano ai requisiti chimici e biologici richiesti, le indagini

TANTE BIOLOGIE PER UN FARMACO

Sono diverse le discipline biologiche coinvolte nella progettazione di nuovi farmaci. Ecco le principali.

Bioinformatica Con l'immensa quantità di dati messi a disposizione dall'avvento dell'era genomica (in particolare sequenze di acidi nucleici e di proteine) si è reso necessario disporre di strumenti informatici adatti a immagazzinarli ed elaborarli. La bioinformatica si occupa proprio dello sviluppo e dell'integrazione di applicazioni informatiche al servizio della ricerca biologica e biotecnologica.

Biologia computazionale Rappresenta un'estensione della bioinformatica (tradizionalmente legata soprattutto all'analisi del DNA) e si pone l'obiettivo di analizzare e risolvere i problemi biologici (come la determinazione della struttura di una molecola) attraverso sofisticate tecnologie informatiche.

Biologia molecolare Branca della biologia che si occupa dei meccanismi molecolari alla base della fisiologia degli esseri viventi, concentrandosi in particolare sulle macromolecole (DNA, RNA e proteine) e sulle loro interazioni.

Biologia strutturale Branca della biologia molecolare relativa allo studio dell'architettura e della morfologia di DNA, RNA e proteine. Si avvale del contributo di tecniche quali cristallografia ai raggi X, NMR, microscopia elettronica avanzata.

Genomica Studio della struttura, della composizione (sequenza), della funzione e dell'evoluzione del genoma degli organismi.

In laboratorio ci si va soltanto con le idee chiare su quali molecole vale veramente la pena di sintetizzare, risparmiando così tempo e risorse

procedono negli ospedali per la cosiddetta *sperimentazione clinica*, in cui le molecole vengono testate prima su pazienti sani e poi su quelli malati. Generalmente l'intero processo di messa a punto di un nuovo farmaco dura dai sette ai dieci anni prima che la molecola possa essere messa in commercio. Richiede perciò lunghe ricerche ed è molto dispendioso. Inoltre, il successo non è affatto garantito, poiché i candidati farmaci possono mostrare proprietà avverse durante ogni fase di sperimentazione, costringendo i ricercatori a tornare sui propri passi per migliorare la qualità delle molecole ed effettuare nuove verifiche.

Prima al computer, poi in laboratorio

Dopo aver descritto le tappe fondamentali della realizzazione di nuovi farmaci, torniamo al cuore del processo. Esistono milioni e milioni di combinazioni possibili tra gli elementi chimici, che danno luogo a numeri elevatissimi di molecole chimicamente diverse. Di queste soltanto pochissime, però, potranno funzionare come farmaci. Come riconoscerle? Chiaramente è necessaria una fortissima opera di selezione che restringa il campo alle molecole più promettenti. Oggi gran parte del lavoro di progettazione viene svolto al computer, grazie al quale si può

disegnare la struttura ottimale di un farmaco e simulare virtualmente la sua interazione con il bersaglio biologico, prima di effettuare esperimenti in laboratorio. In pratica, in laboratorio ci si va soltanto con le idee chiare su quali molecole vale veramente la pena di sintetizzare, risparmiando così tempo e risorse. Un elemento fortemente innovativo rispetto al passato è quindi costituito dalla possibilità di progettare razionalmente molecole *ad hoc*, cioè pensate e sviluppate per interagire selettivamente con un preciso bersaglio biologico da colpire.

Partire dalla struttura

La prima cosa da fare quando si cerca un nuovo farmaco è ottenere ed esaminare approfonditamente la struttura tridimensionale del bersaglio biologico che si intende colpire, per esempio una proteina.

Poiché solo la corretta conformazione di una proteina ne garantisce un corretto funzionamento, individuarne la struttura è spesso la chiave per comprendere come la proteina funziona e, di conseguenza, come può essere bloccata. Le tecniche utilizzate per determinare la struttura 3D di un bersaglio biologico sono la cristallografia ai raggi X oppure la risonanza magnetica nucleare (NMR).

Una volta nota la struttura, è necessario identificare al suo interno un *sito d'azione*, o cavità, che costituisce il fulcro da cui scaturisce l'attività biologica. Nel caso di un enzima, per esempio, sarà fondamentale valutare in che modo tale cavità possa accogliere al proprio interno, legandole a sé, molecole a basso peso molecolare quali substrati o inibitori. Se la struttura tridimensionale del bersaglio, per contro, non dovesse essere nota sperimentalmente, è allora possibile costruire modelli strutturali proprio grazie al computer, mediante approcci bioinformatici: allineando la sequenza amminoacidica del bersaglio incognito con quella di altri bersagli simili di cui sia nota la struttura sperimentale, si possono creare modelli tridimensionali del bersaglio desiderato, che potranno essere utilizzati per progettare le molecole. Tali metodi di ricostruzione si basano sull'evidenza che, in natura, le sequenze amminoacidiche simili tra loro adottano anche strutture tridimensionali simili.

L'importanza della complementarità

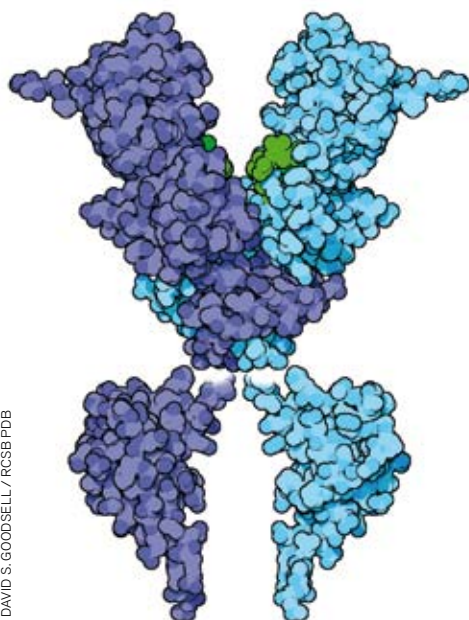
Nella figura di p. 19 di questo articolo vediamo come esempio il sito d'azione della proteina chinasi *Ab1*, bersaglio biologico del *Gleevec*®, un importante farmaco utilizzato nella terapia antitumorale. Legandosi al sito d'azione della

RAGGI X E RISONANZA MAGNETICA PER SCOPRIRE COME SONO FATTE LE MOLECOLE

Le tecniche utilizzate per determinare la struttura 3D di un bersaglio biologico sono due: la cristallografia ai raggi X e la risonanza magnetica nucleare (NMR). Nel primo caso, di gran lunga il più utilizzato, occorre prima di tutto ottenere la proteina allo stato cristallino. Per fare questo, la proteina viene lasciata cristallizzare in soluzione acquosa fino alla formazione di un cristallo ordinato, che viene poi montato su uno strumento chiamato *diffrattometro*, mediante il quale è bombardato con raggi X. Gli elettroni degli atomi che compongono la proteina diffrangono i raggi X incidenti, creando una mappa di segnali di diffrazione che sono catturati da un rivelatore. L'intensità e la posizione dei segnali di diffrazione dipendono da come gli atomi della proteina sono disposti spazialmente gli uni rispetto agli altri, e cioè dalla struttura della proteina. È proprio l'analisi di questi segnali a rendere possibile la ricostruzione di uno schema tridimensionale della proteina stessa. La tecnica NMR si basa, invece, sulla misurazione delle proprietà di *spin* degli atomi di idrogeno della proteina (o, in alternativa, di alcuni isotopi radioattivi con cui la proteina è stata precedentemente marcata) quando questa viene sottoposta a un campo magnetico. In queste condizioni, gli atomi "rispondono" emettendo diversi tipi di onde, dipendenti sia dalla natura chimica degli atomi stessi sia dalla loro disposizione spaziale rispetto ad altri atomi.

Ricostruzione grafica di una molecola di caspasi, una classe di enzimi coinvolta nel processo di morte cellulare programmata (apoptosi).

Così, l'analisi delle caratteristiche di queste onde permette di risalire alla struttura tridimensionale della proteina in esame. Le strutture tridimensionali di proteine e altre macromolecole biologiche vengono depositate nella banca dati ad accesso pubblico Protein Data Bank (PDB).





IL PROCESSO DI SVILUPPO DI UN NUOVO FARMACO:

dall'individuazione del bersaglio biologico all'identificazione di un candidato valido.



Validazione Definizione fine delle caratteristiche chimiche e biologiche (solubilità, selettività, facilità di sintesi ecc.) delle prime molecole biologicamente attive ottenute nel corso della progettazione, per stabilire se è opportuno procedere con il lavoro.

Lead Termine inglese con il quale si indica il capostipite di una nuova

famiglia di molecole biologicamente attive che hanno superato la fase di validazione.

Farmacologia Studio degli effetti fisiologici delle molecole ottenute.

Tossicologia Valutazione degli eventuali meccanismi di tossicità delle molecole ottenute.

Farmacocinetica e metabolismo Valutazione quantitativa della velocità

di assorbimento, distribuzione ed eliminazione delle molecole ottenute e del loro metabolismo.

Formulazione e veicolazione Definizione della forma e, di conseguenza, della modalità di somministrazione più adatta per il candidato farmaco (compressa, capsula, polvere, soluzione, cerotto ecc.).



chinasi, il Gleevec® ne inibisce l'attività, inibendo di conseguenza anche la crescita delle cellule tumorali. Come abbiamo visto, nell'uomo esiste un gran numero di chinasi e di molte sono note le strutture tridimensionali. Conoscendo le dimensioni, la forma e le proprietà chimiche del loro sito d'azione, è possibile progettare al computer potenziali farmaci le cui strutture molecolari vengono modellate e adattate direttamente a questo sito, valutando quindi la complementarità delle molecole progettate (i proiettili) con gli amminoacidi che compongono il sito stesso (il bersaglio). Tanto maggiore è la complementarità, tanto più è probabile che la molecola disegnata risulti biologicamente attiva. Queste operazioni sono svolte attraverso l'utilizzo di software dedicati per la progettazione molecolare, sviluppati e migliorati costantemente proprio dai ricercatori che li utilizzano. In moltissimi casi, tali approcci hanno potuto suggerire nuove molecole che sono state poi sviluppate come potenziali farmaci attraverso fasi successive di ottimizzazione.

Farmaci come navi

Un ruolo importante a questo proposito è costituito dallo *screening virtuale*, che consente di valutare al computer

l'efficacia di milioni di molecole, evitando quindi una lunga e costosa fase sperimentale. In pratica, si tratta di un metodo automatizzato che fa uso di librerie di milioni di composti chimici già esistenti, da cui "pescare" quelli che danno le interazioni più forti con il bersaglio biologico da colpire. Tali metodologie vanno sotto il nome di *docking*, termine inglese che significa "approdare", "attraccare", e che dà l'idea di come un farmaco, paragonato a una nave, attracchi presso la cavità di un bersaglio biologico, visto come un porto d'approdo. Mediamente, dopo l'analisi di librerie contenenti vari milioni di molecole si arriva in laboratorio con le migliori 30-50 molecole, avendo già superato molte delle fasi del processo di creazione di un potenziale farmaco.

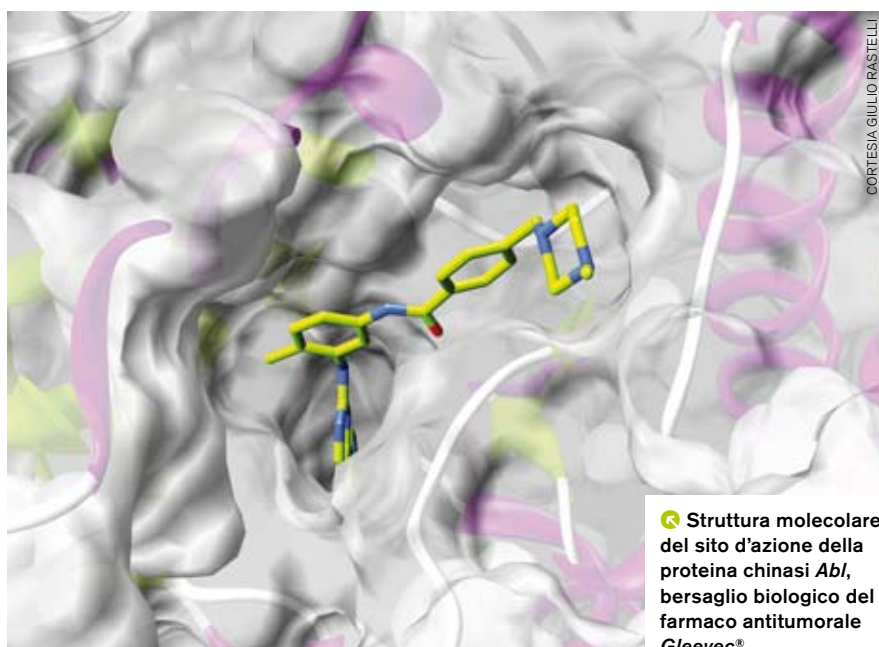
GRID per la farmacologia

Un aspetto rilevante della progettazione del farmaco al computer è dato anche dalla velocità con cui possiamo ottenere i risultati. Da alcuni anni a questa parte la comunità scientifica internazionale dispone di vaste reti di supercomputer per il calcolo scientifico, condivise e distribuite fra Europa, Asia e America, note come reti di calcolo GRID. La caratteristica di queste infrastrutture risiede nell'ampia

disponibilità di unità di calcolo (circa 80 000 processori nel caso del network EGEE, Enabling Grids for E-science), che permettono di effettuare un elevato numero di operazioni contemporaneamente. Attraverso il GRID computing si possono analizzare in simultanea milioni e milioni di molecole, con un grandissimo risparmio di tempo (e denaro).

Professioni del futuro

La progettazione del farmaco assistita dal computer è ormai diventata una disciplina scientifica vera e propria, nel cui ambito il progettista molecolare, la cui formazione spazia dalla chimica alla biologia, all'informatica, concepisce e mette a punto architetture molecolari fortemente specializzate, ad elevato potenziale terapeutico. È evidente che la componente creativa gioca un ruolo fondamentale nella progettazione molecolare, insieme all'istinto e all'esperienza. Il computer e gli algoritmi di progettazione costituiscono strumenti di lavoro quotidiani, indispensabili per verificare le ipotesi, vagliare nuove idee e costruire molecole spesso *ab initio* ma, come tutti gli strumenti di lavoro, devono essere guidati dal ricercatore nella maniera più opportuna. ➔



GIULIO RASTELLI

è professore associato di chimica farmaceutica e docente dei corsi di progettazione del farmaco e di struttura delle biomolecole all'Università di Modena e Reggio Emilia, dove dirige il Laboratorio di *molecular modelling* e progettazione del farmaco.