

SINTESI ED ANALISI STRUTTURALE DI BIOMOLECOLE

Le **biomolecole** sono molecole organiche di interesse biologico. Le biomolecole possono essere prodotte dalle **cellule**, ossia dal metabolismo degli organismi viventi (**metaboliti**) oppure possono essere prodotte da **metodi sintetici** (farmaci o molecole che interagiscono con pathways metabolici). Le molecole possono essere di piccole dimensioni (PM 1000-2000 uma) o di grandi dimensioni (chiamate **MACROMOLECOLE**). Le macromolecole presenti nel nostro organismo sono le proteine e gli acidi nucleici.

I metaboliti sono intermedi e prodotti del metabolismo. Essi sono di solito classificati **come piccole molecole**.

- **Metaboliti primari:** deriva dal metabolismo primario, presente in tutti gli organismi viventi
- **Metaboliti secondari:** deriva dal metabolismo secondario, caratteristico di una nicchia biologica di una determinata specie (scopo = sopravvivenza).

I metaboliti sono quindi molecole prodotte dal metabolismo. Il metabolismo, composto da anabolismo e catabolismo, non è altro che l'intreccio di reazioni che avvengono all'interno delle cellule (le cellule non sono altro che un "recipiente" di reazioni chimiche).

Metaboliti primari: molecole del metabolismo primario (per esempio le molecole della glicolisi).

Il **metabolismo primario** è necessario per:

- Sopravvivenza
- Crescita
- Replicazione

È formato da reazioni molto simili (le vie metaboliche) nella maggior parte degli organismi della terra. Esso include reazioni o cicli metabolici come la glicolisi, il ciclo di Krebs e la fosforilazione ossidativa che derivano dal progenitore comune a tutte le specie viventi.

Sostanze naturali: metaboliti primari

Tutte queste molecole sono **comuni a tutti gli organismi viventi** (animali e piante):

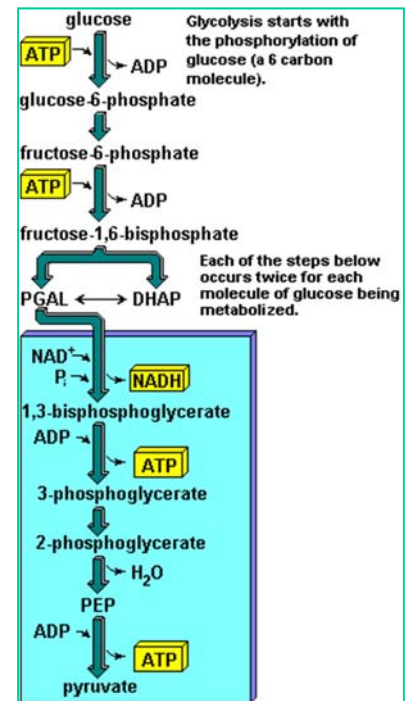
- Amminoacidi
- Carboidrati
- Trigliceridi
- Steroidi (alcuni di essi comuni a tutti, altri no)
- Nucleotidi
- Ed altri: vitamine, acidi tricarbossilici ed altri intermedi di importanti cicli metabolici ecc.

Il **signalling** cellulare (o "regolazione") è una reazione di fosforilazione che permette l'attivazione di una proteina, oppure un legame o **binding**, ossia un evento di legame in cui una proteina lega un fattore di trascrizione, oppure forma un complesso multienzimatico attraverso legami deboli (interazioni di van der Waals, legami a idrogeno).

Metaboliti secondari

I metaboliti secondari sono strutture organiche che non sono direttamente coinvolte nella normale crescita, sviluppo o riproduzione di un organismo. Essi sono spesso **ristretti a particolari gruppi di una specie**. La loro funzione è deputata alla:

- **Difesa** (difesa chimica di una pianta con produzione di sostanze velenose o tossiche)



- **Miglior adattamento durante lo sviluppo.**

Per esempio: acido acetilsalicilico, atropina (un alcaloide), artemisinina (un terpene).

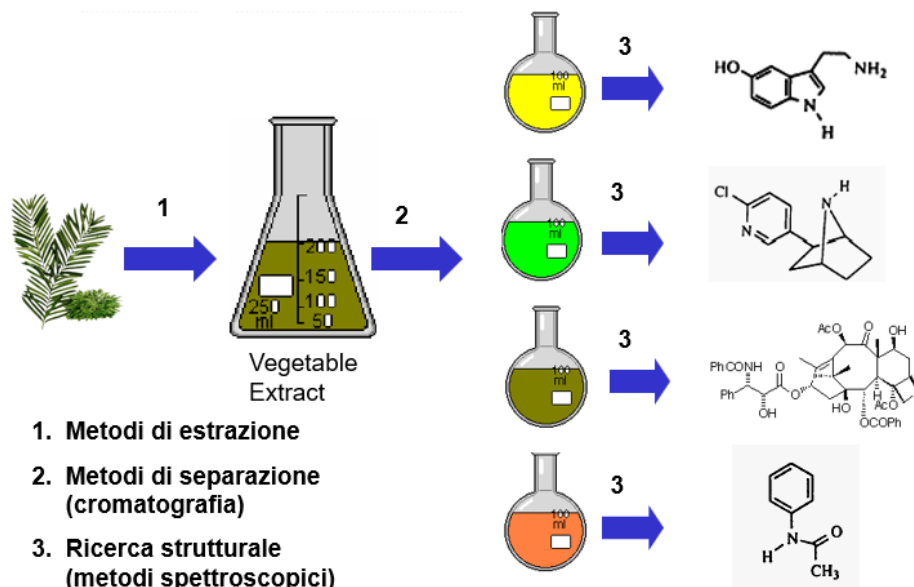
Alcuni di essi sono stati la fonte primaria di ispirazione per la scoperta di nuove molecole. **Il grande serbatoio di metaboliti secondari sono le piante**, in quanto esse devono adattarsi all'ambiente in cui si trovano non avendo la capacità di muoversi, essi sono anche un importante meccanismo di difesa chimica dagli insulti esterni. Quindi il ruolo del metabolismo secondario nel concetto di evolucionismo è **l'adattamento** all'ambiente (temperatura, ambiente umido, arido) e per un concetto di **difesa**.

Prodotti naturali scoperti fino ad oggi: più di 200.000. collettivamente, queste molecole rappresentano il **genoma chimico del nostro pianeta** e rappresentano un universo da esplorare.

- **Tecniche per l'isolamento** da risorse naturali
- **Metodi analitici** per l'assegnamento di strutture (richiede una grande riduzione in quantità pure).

La maggior parte degli agenti terapeutici più importanti introdotti negli ultimi 50 anni sono prodotti naturali o sono stati ispirati ad essi.

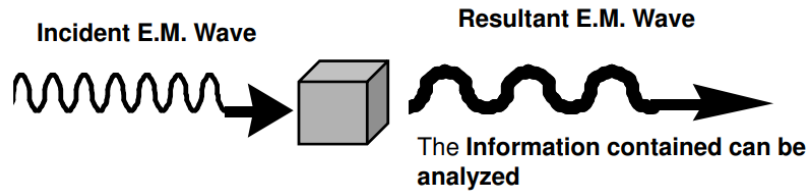
Isolamento e caratterizzazione dei metaboliti secondari: la chimica delle sostanze naturali



I **metodi di estrazione**, o principi estrattivi, a partire da una pianta vegetale essa viene tritata e messa a macerare in vari solventi di estrazione (metanolo, etanolo, solvente idroalcolico). Il solvente rompe le pareti cellulari ed il contenuto della cellula vegetale passa all'interno del solvente. L'estratto vegetale viene filtrato e si ottiene la soluzione che contiene migliaia di molecole.

I **metodi di separazione** consistono nelle **tecniche cromatografiche**. I metodi cromatografici permettono di frazionare e separare le molecole contenute in questo estratto vegetale. La cromatografia indica una serie di tecniche che hanno lo scopo di separare una miscela nei suoi singoli componenti, per permettere l'analisi qualitativa e quantitativa. Queste tecniche si basano sulla ripartizione differenziale di vari componenti tra due fasi: una chiamata fase fissa (o fase stazionaria) ed un'altra chiamata fase mobile (o eluente), che fluisce continuamente attraverso la fase fissa.

I metodi che permettono di investigare la struttura della molecola ottenuta mediante separazione cromatografica prendono il nome di **metodi spettroscopici** e consistono in interazioni tra la radiazione elettromagnetica e la sostanza in esame. Le tecniche spettroscopiche più utilizzate sono: NMR (Nuclear Magnetic Resonance), spettrometria di massa (MS), diffrazione a raggi X, dicroismo circolare / spettroscopia UV. Una radiazione elettromagnetica attraversa una struttura molecolare e ne esce subendo una modifica nelle sue caratteristiche. Questa modifica della radiazione elettromagnetica darà informazioni sulla sua struttura, le modifiche possono interessare l'intensità della radiazione, l'assorbimento, la lunghezza d'onda oppure la polarizzazione.



Si ottiene uno spettro elettromagnetico, ossia la classificazione delle radiazioni elettromagnetiche per la lunghezza d'onda in nanometri.

Si ricercano sempre nuove biomolecole essenzialmente per 3 scopi:

1. **Farmacologico-terapeutico** (per scoprire di un nuovo farmaco attivo)
2. **Analitico-diagnostico** (per individuare e diagnosticare una malattia)
3. **Composti modello** (per la comprensione dei meccanismi dei processi biologici o delle strutture di altre biomolecole)

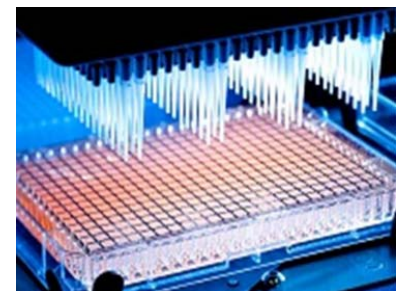
I composti modello nascono dalla problematica che le macromolecole sono di dimensioni troppo grandi e difficilmente indagabili in tutta la loro struttura, per questo si decide di costruire piccoli frammenti di una macromolecola e di studiarne la struttura pezzo per pezzo, per poi traslare i risultati ottenuti sulla macromolecola. Ad esempio il codice genetico ed il DNA non è mai stato studiato interamente dal punto di vista strutturale, piuttosto vengono costruiti dei piccoli frammenti di DNA di poche decine di nucleotidi e si studia la sua interazione con un fattore di trascrizione.

L'individuazione di biomolecole "utili" può avvenire per:

1. **"Random Screen"** di prodotti naturali, che consiste nello screening di tutte le molecole e non è basato su un processo di selezione razionale.
2. **"Screen" di miscele sintetiche di molecole (derivanti dalla sintesi combinatoriale)**
3. **Progettazione razionale (*rational Drug design*)** ad es. sintetizzare un inibitore enzimatico che funga da substrato di un enzima (con un buon legame, elevata selettività e reazione rapida, quindi deve essere specifico e selettivo con ottima Kd), adattandosi strutturalmente ad esso, per bloccare un malfunzionamento di questo enzima che causa una determinata patologia;
4. **Caso fortuito**

High-Throughput Screening (HTS) di librerie di molecole: la ricerca biologica

- High-Throughput Screening (HTS) è un approccio di drug-discovery che permette di analizzare **centinaia di molecole automaticamente**
- È comunemente utilizzato dall'industria farmaceutica.
- Le ricerche sono basate su **eventi biologici o chimici detectabili** che misurano l'interazione tra una molecola ed uno specifico target.
- È utilizzato per analizzare **librerie di molecole biologiche e chimiche** e per DNA/RNA arrays.



Random Screening di prodotti naturali

Questa tecnica consiste semplicemente nel controllare con test opportuni l'attività biologica di tutti i prodotti che capitano tra le mani, indipendentemente da ogni considerazione razionale. I **prodotti naturali**, ad esempio, si sono sempre rivelati una fonte importantissima di molecole dotate di attività biologica.

Dall'analisi dei risultati ottenuti dallo screening di circa **10.000 prodotti chimici** si può ricavare la probabilità di trovare un composto dotato di interessanti proprietà farmacologiche (*leads*). Solo 1 *lead* su 4 porta alla produzione di un prodotto commercializzabile. La probabilità che un lead compound possa diventare un farmaco è di 1/250.

Lead compound: una molecola, o un altro agente con proprietà farmacologiche o biochimiche che potrebbe avere un potenziale terapeutico. Rappresenta il primo step nel lungo processo che consente di ottenere un farmaco approvato.

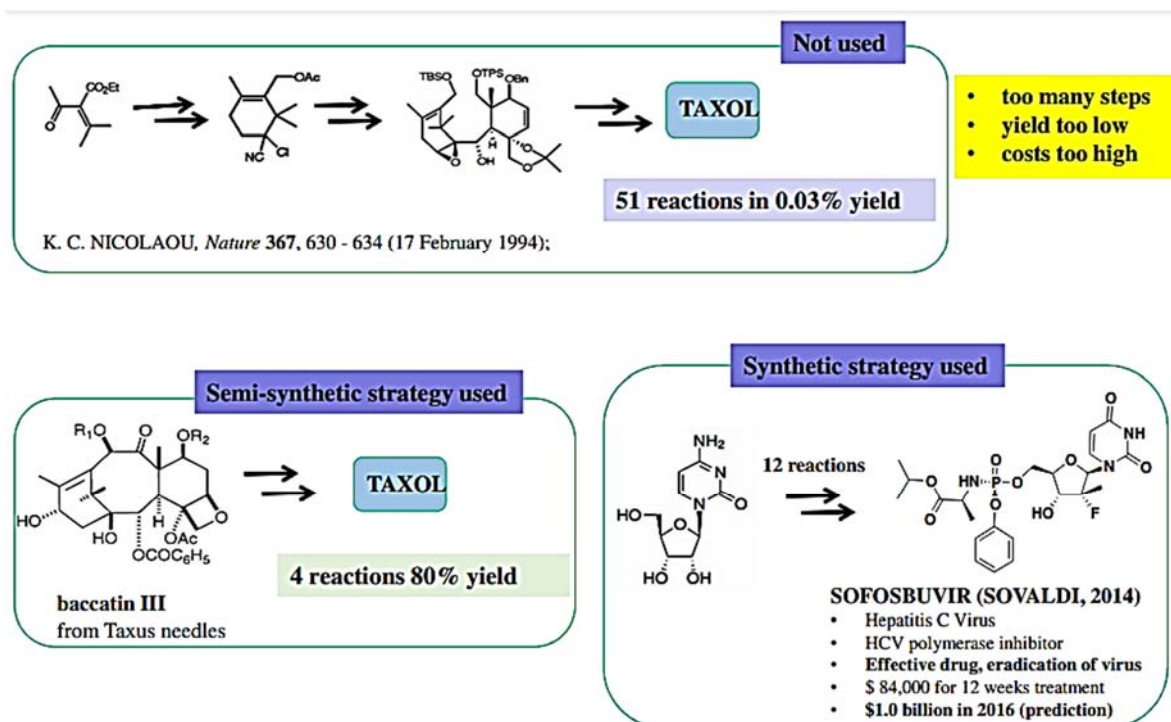
TASSOLO (Lead compound): un ottimo risultato di uno screening



Il tasso è una pianta molto diffusa anche nei nostri giardini: non perde le foglie e produce delle belle bacche rosse. L'arco di Robin Hood era fatto di legno di tasso, come tutti gli archi di qualità nell'Inghilterra medioevale.

Nel 1962 l'estratto da un campione di corteccia di *Taxus brevifolia* rivelò proprietà citotossiche. Fu identificato il principio attivo chiamato **tassolo**. Nei primi anni del 1990 il tassolo fu immesso sul mercato come **potentissimo farmaco antitumorale** (nome commerciale: paclitaxel).

Sintesi totale: in principio *la maggior parte delle molecole possono essere sintetizzate*



Il tassolo ottenuto per sintesi totale non viene utilizzato dall'industria farmaceutica perché per la sua sintesi c'è bisogno di 51 reazioni, quindi ci sono troppi steps, la resa è troppo bassa ed i costi sono troppo elevati. Il tassolo in commercio oggi si ottiene mediante un processo di semisintesi a partire da una molecola estratta naturalmente dal tasso, baccatina III, e con solo 4 reazioni.

Il **SOFOBUVIR (2014)** è l'attuale farmaco di scelta nel trattamento e nell'eradicazione dell'Epatite C. La molecola è un nucleoside antivirale che agisce da inibitore della DNA polimerasi virale in quanto si comporta da falso substrato per questo enzima che lo incorpora nel DNA e blocca la replicazione virale. Il costo di questo farmaco è elevatissimo.

Rational Drug Design: metodi razionali per nuovi farmaci

Oggi non siamo costretti a sperare solo nella fortuna: conosciamo metodi che permettono il disegno razionale di molecole ad attività biologica.

Prendono origine da conoscenze fisiologiche, biochimiche, farmacologiche e chimiche, e quindi hanno un ben preciso punto di partenza dal quale muoversi per progettare molecole che si ritengono in grado di risolvere il problema terapeutico o di dare ulteriori informazioni sul funzionamento di un sistema biologico, nel nostro caso un recettore.

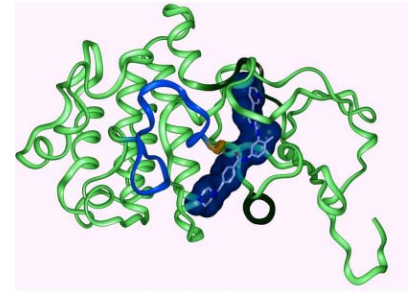
Nella **pianificazione razionale** tutte le tecniche di ricerca strutturale sono sempre più rivolte a:

1. Scoprire la **conformazione** del sito enzimatico proteico responsabile dell'interazione con il substrato
2. Pianificare, sulla base delle informazioni ottenute, l'**adeguata conformazione** della molecola di farmaco.

Quest'attività di ricerca è definita **“DRUG DESIGN”**.

Rational Drug Design

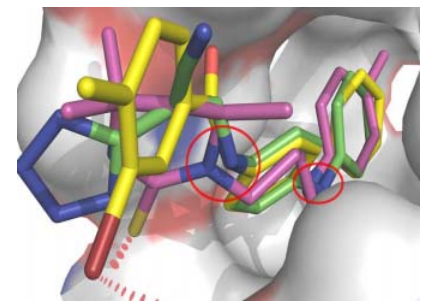
- È necessario conoscere la **struttura del target** da colpire (enzima o recettore).
- È possibile costruire, grazie ad un computer, un **ligando perfettamente corrispondente**
- **Cambi conformazionali** dovuti all'evento di binding devono essere presi in considerazione
- È possibile valutare l'energia di interazione.



In figura è rappresentata una struttura “a nastro” che mette in evidenza le strutture secondarie della proteina. La maggior parte delle strutture proteiche oggi conosciute sono depositate in enormi banche dati.

In silico screening (docking): *la forza dei computers*

- È necessario conoscere la struttura del target da colpire
- Il computer simula il legame di una libreria virtuale di molecole con il target
- Il grado di legame (energia di interazione) permette di selezionare il miglior candidato
- Due approcci di modellistica: *meccanica molecolare* e *dinamica molecolare*



Enzimi ed inibitori

I processi biologici possono quindi essere controllati sia dalla modulazione dell'attività di un **enzima** o dall'interazione tra una molecola appropriata e il suo **recettore**.

Un **inibitore enzimatico** impedisce all'enzima bersaglio di catalizzare la sua reazione specifica. Un tipico esempio: la penicillina ed i suoi derivati agiscono in questo modo. I batteri sono dotati di una parete cellulare rigida formata di catene di un polimero lineare (composto da unità alternate di N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico unite da legami glicosidici) tenuti insieme da brevi catene peptidiche. La penicillina inibisce in modo irreversibile l'enzima che catalizza questa reazione di cross-linking; le pareti cellulari rigide non possono essere formate e la pressione interna fa sì che i batteri letteralmente "scoppiano" andando in lisi.

Le cellule umane non sono dotate di pareti cellulari: la transpeptidasi non è presente nel nostro organismo e la penicillina non può interferire con altri processi metabolici.

Farmaci come agonisti ed antagonisti

Un processo biologico coordinato da un recettore chimico messaggero può invece essere modulato con l'utilizzo di **agonisti** o **antagonisti**.

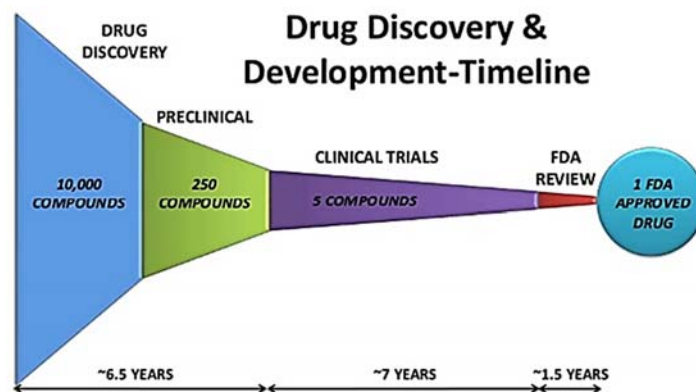
- un **agonista** possiede una struttura adatta per interagire con un recettore, spesso imitando con grande efficacia l'azione del composto che è in natura coinvolto in quel processo biologico;
- gli **antagonisti** si legano al recettore provocando una catena di eventi che non danno luogo all'azione biologica normalmente innescata da quello stesso recettore dopo l'accoppiamento con la molecola segnale.

Ad esempio, il **progesterone** è uno steroide che esplica la sua azione biologica legando uno specifico recettore. Il complesso ormone-recettore che si forma migra dal citoplasma al nucleo ed interagisce con il DNA modulando l'espressione genica. Il recettore può anche legarsi ad altre molecole: ad esempio, **medrossiprogesterone acetato e noretindrone**. Il complesso è in questi casi ancora più stabile di quello che

forma con l'ormone naturale e svolge qualitativamente la stessa azione biologica. Il medrossiprogesterone acetato e il noretindrone sono **agonisti del progesterone**.

L'**antagonista ormonale RU-86** si lega al recettore per il progesterone. La sua struttura spaziale non è del tutto corretta: il complesso non riesce ad attivare il processo che promuove l'impianto dell'uovo fecondato a livello uterino, infatti questa molecola causa l'interruzione della gravidanza.

Drug Discovery: un processo molto lungo



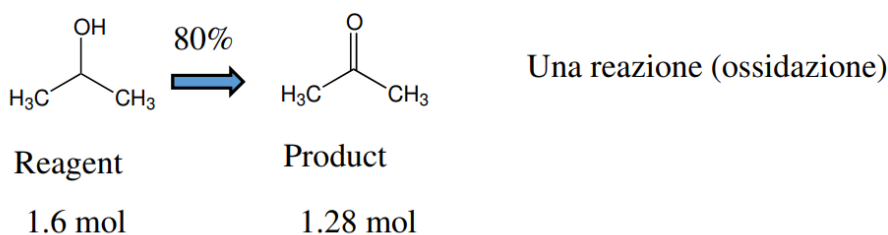
Partendo da una selezione di 10.000 composti, arrivano in fase di sperimentazione pre-clinica solo 250 molecole di cui solo 5 riescono a raggiungere gli studi clinici. Fra di essi, 1 molecola sarà il candidato approvato dall'FDA ad essere commercializzato ed impiegato come farmaco. Tutto questo percorso che va dalla selezione dei compounds fino al farmaco approvato ha una durata di circa 10 anni. Il costo di produzione di questo farmaco è crescente all'aumentare del tempo trascorso. Gli antitumorali possono impiegare minor tempo per l'approvazione.

Le **Biomolecole "utili" (ad. Esempio Farmaci)** possono essere prodotte per:

1. **Sintesi Chimica**
2. **Biosintesi (processi biotecnologici e reazioni enzimatiche)**
3. **Sintesi mista (enzimatico-chimica)**
4. **Isolate da fonti naturali**

Le molecole piccole non hanno spesso la capacità di discriminare tra i vari target. Le molecole più grandi assicurano una specificità di riconoscimento maggiore, pertanto si sintetizzano ad es. gli anticorpi monoclonali con procedimenti biotecnologici.

Reazione chimica



La resa di una reazione (80%) indica la frazione (in %) delle moli del reagente che si trasformano in prodotto

$$\text{Resa di reazione} = \frac{\text{n. mol prodotto}}{\text{n. mol reagente}} \times 100$$

In questa reazione chimica il reagente (**2-propanolo** o isopropanolo) è un alcol secondario che viene ossidato a chetone (**acetone**), questa reazione di ossidazione avviene normalmente nelle nostre cellule.