



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# Piccole molecole che risolvono grandi problemi: presente e futuro della ricerca sul farmaco

**PROLUSIONE DEL 775° ANNO ACCADEMICO DELL' UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI DI SIENA**

► **DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE, CHIMICA E FARMACIA**

Maurizio Botta, PhD

*Professore Ordinario di Chimica Farmaceutica*

SIENA 28/10/2015



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# RICERCA SUL FARMACO

*“La ricerca sul farmaco è il processo con cui vengono scoperti **nuovi medicinali**”*

**Sostanze** usate per:

- *la diagnosi*
- *la cura*
- *il trattamento*
- *la prevenzione*

*...di **una malattia***





UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# GLI INIZI DELLA MEDICINA

- **2735 AC:** uso di *Dichroa febrifuga* riportato in Cina
- **1500 AC:** uso di *Drimia maritima* riportato nei papiri di Ebers (Egitto)
- **Antica Grecia:** trascritti di Ippocrate e Galeno
- **Medio Evo:** molte piante officinali coltivate nei monasteri
- **1500:** Paracelso ha l'intuizione di cercare rimedi nella chimica inorganica
- **1800:** i principi attivi iniziano ad essere isolati dalle piante officinali



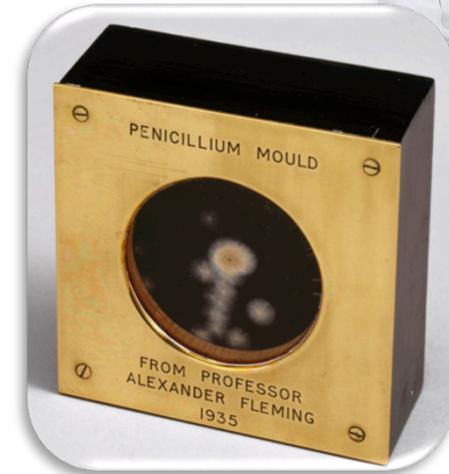
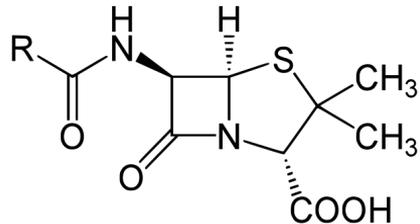


UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# SCOPERTA CASUALE: PENICILLINA

1928

- **Alexander Fleming** sta lavorando con dei batteri (*Staphylococcus aureus*)
- Va in vacanza per tre giorni, dimenticandosi le piastre sul bancone
- Le piastre si contaminano con la muffa (*Penicillium notatum*)



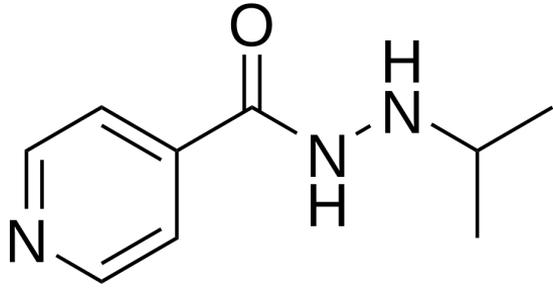
**Osservazione:** nessuna colonia batterica in prossimità della muffa

**Scoperta:** PENICILLINA



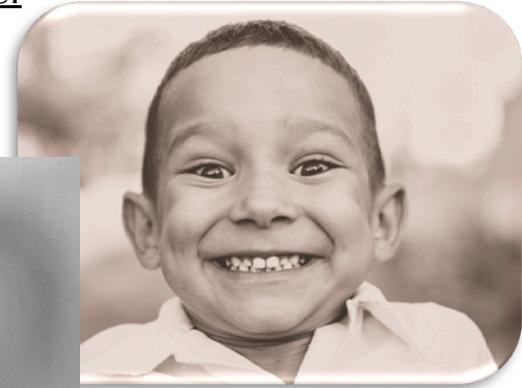
UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# OSSERVAZIONI CLINICHE: IPRONIAZIDE



- **1958:** iproniazide fu approvata come uno dei primi **antidepressivi**
- **1961:** ritirata a causa di elevata incidenza di epatotossicità

- Iproniazide fu sviluppata come agente **anti-tubercolare**
- **1952 - Osservazione:** pazienti trattati con iproniazide erano inspiegabilmente felici

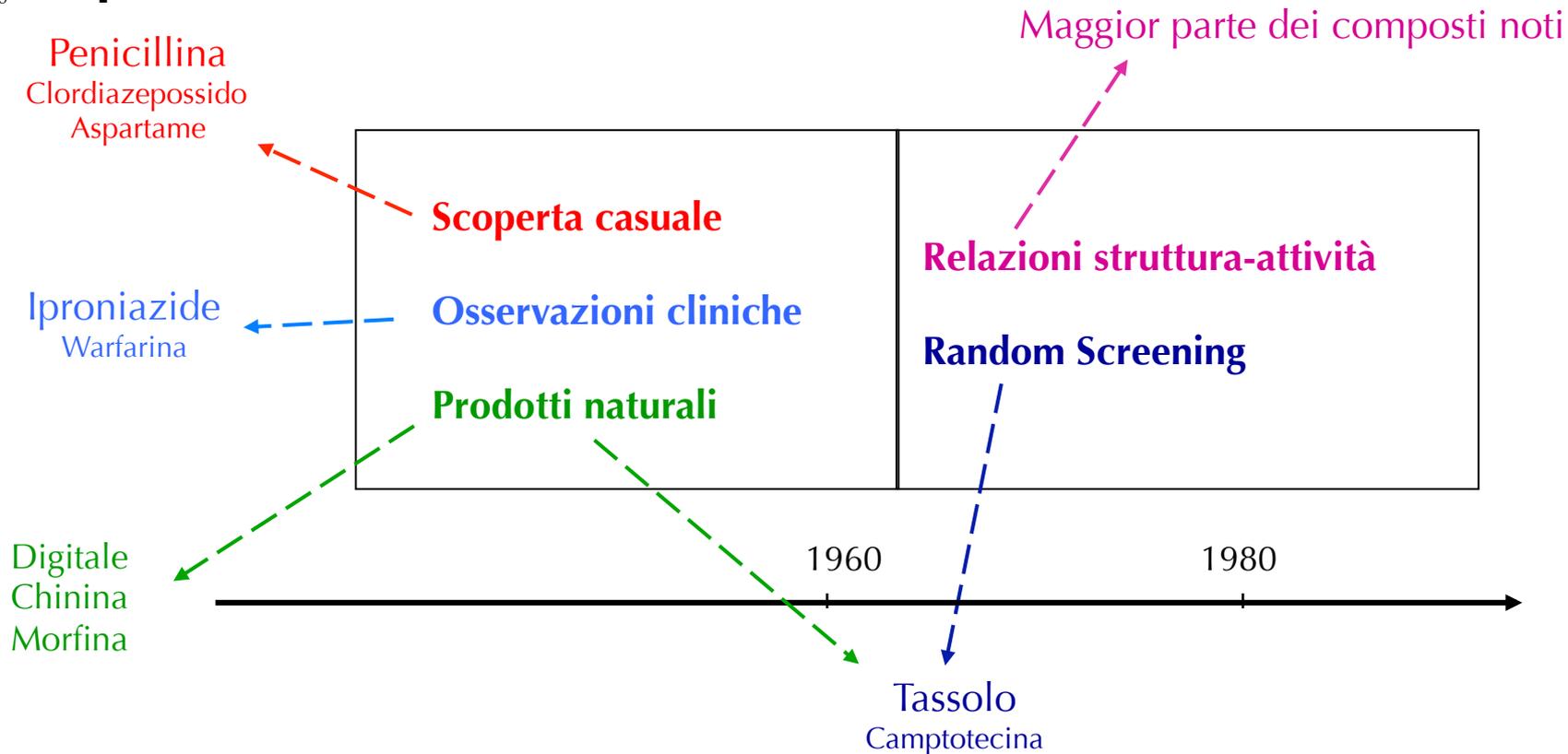






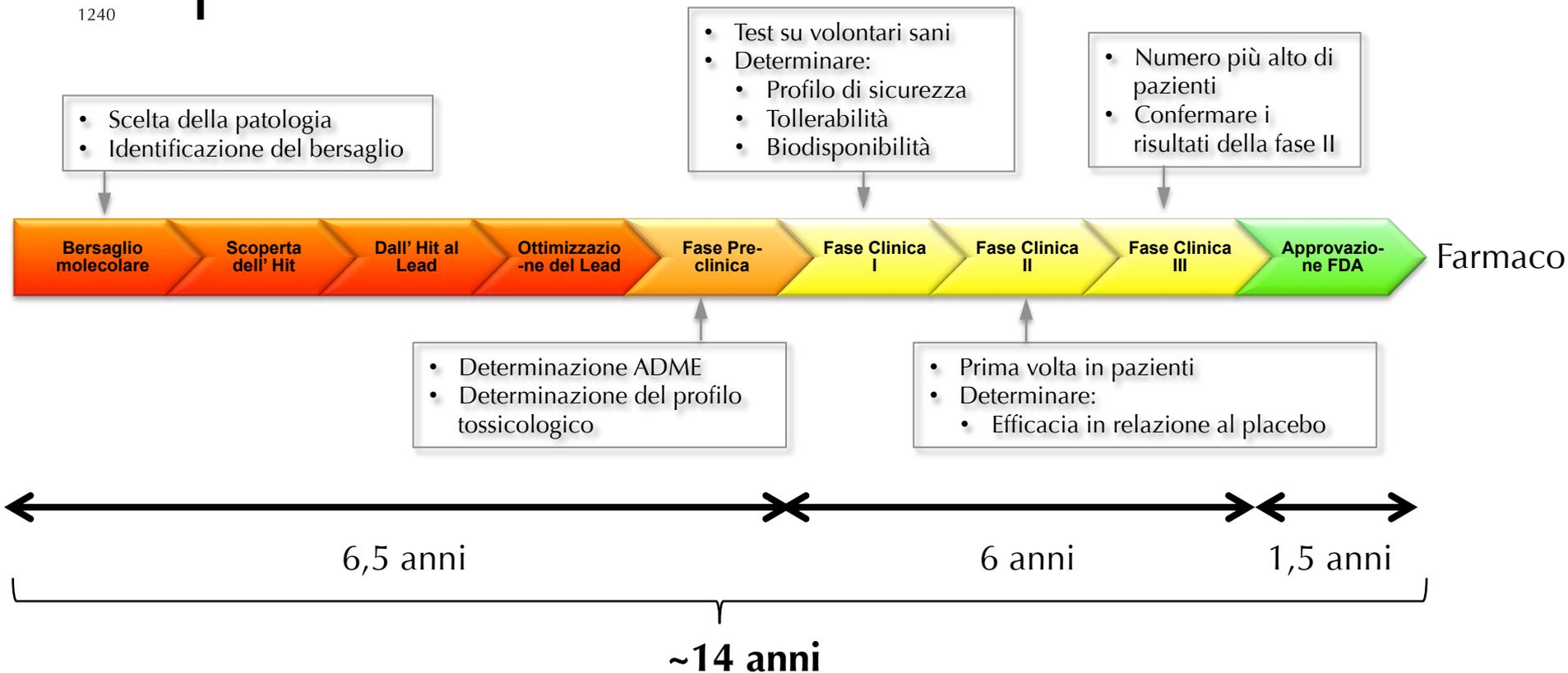
UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# L'INIZIO DELLA RICERCA SUL FARMACO





# LA LUNGA E TORTUOSA STRADA





# IL PROCESSO DI SCOPERTA DEL FARMACO OGGI

La scoperta del  
farmaco è un processo  
sempre più costoso



0.8  
Mld \$

2003

2.6  
Mld \$



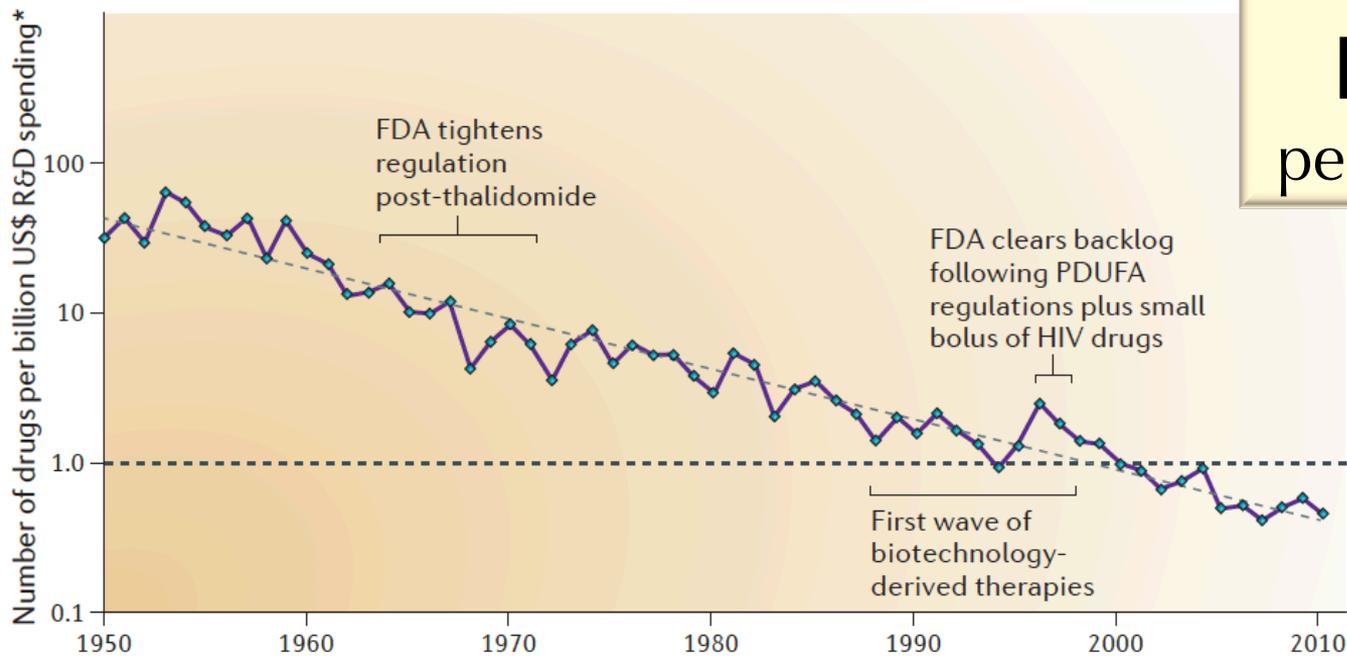
2014



# IL PROCESSO DI SCOPERTA DEL FARMACO OGGI

**2.6**  
**Mld \$**  
per farmaco

**a Overall trend in R&D efficiency (inflation-adjusted)**





UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# LA CRISI DEL SETTORE FARMACEUTICO



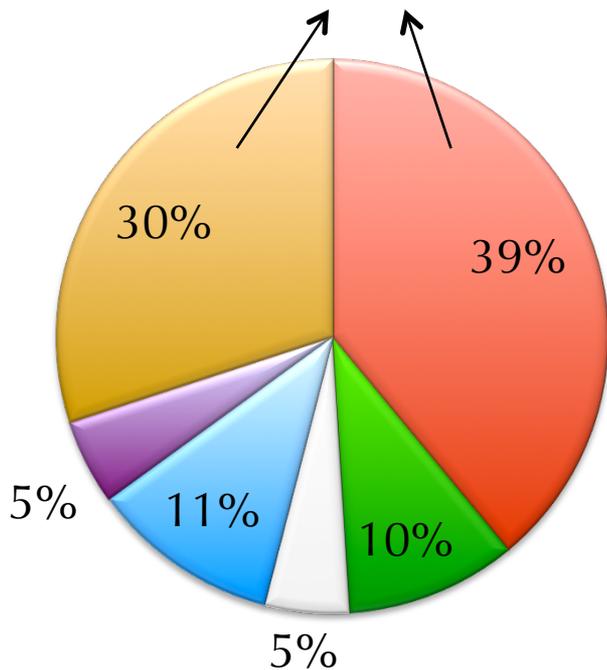


# LE CAUSE DI ABBANDONO DI CANDIDATI

Scoperti **tardi** nel processo di sviluppo di un farmaco



Grande **perdita** di investimenti

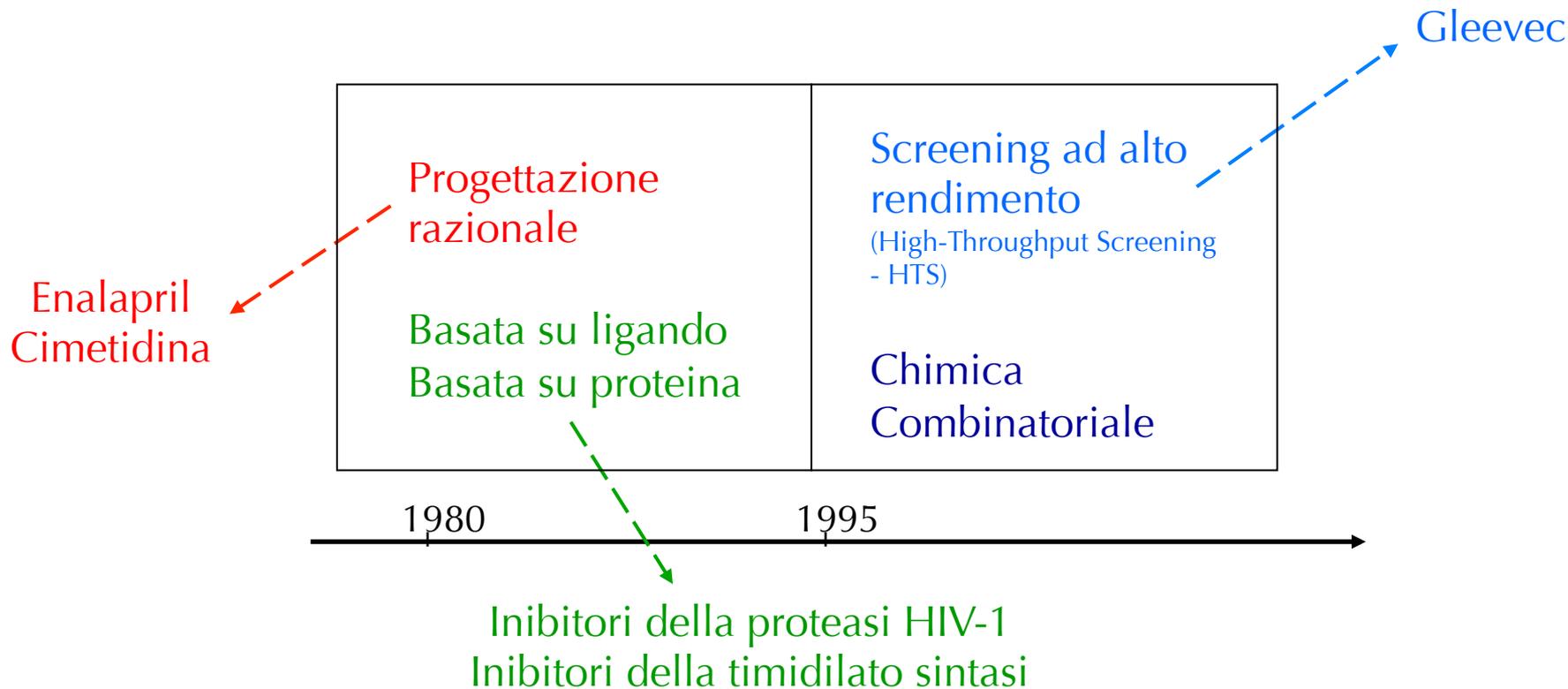


- ADMET
- Effetti indesiderati
- Ragioni commerciali
- Tossicità pre-clinica
- Altro
- Efficacia limitata



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# IL PRESENTE DELLA RICERCA SUL FARMACO





UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# CHIMICA COMBINATORIALE

Metodo di sintesi chimica che permette la **preparazione** di un **elevato numero** di piccole molecole o di peptidi in un unico processo.

Fino a **milioni** di **composti!**

Scoperta del Lead	Ottimizzazione del Lead
<ul style="list-style-type: none"><li>• &gt; 10,000 composti</li><li>• &lt; 1mg/composto</li><li>• Sintesi in fase solida</li><li>• Metodo "Split and mix"</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• &lt; 1,000 composti</li><li>• &gt; 1mg/composto</li><li>• Sintesi in fase solida o in soluzione</li><li>• Sintesi in parallelo</li></ul>



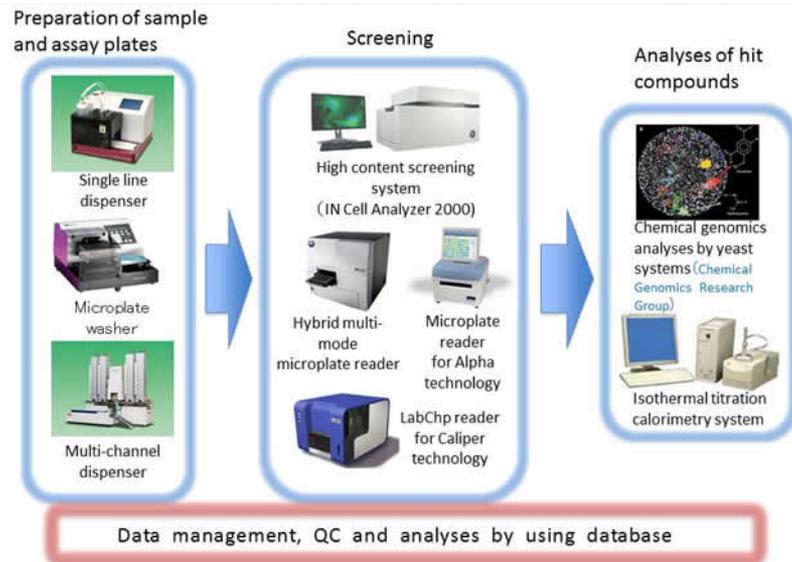
UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# SCREENING AD ALTO RENDIMENTO (HTS)

Metodo scientifico per lo **svolgimento rapido** di **milioni di saggi** per l'identificazione di composti attivi che modulano un meccanismo molecolare specifico

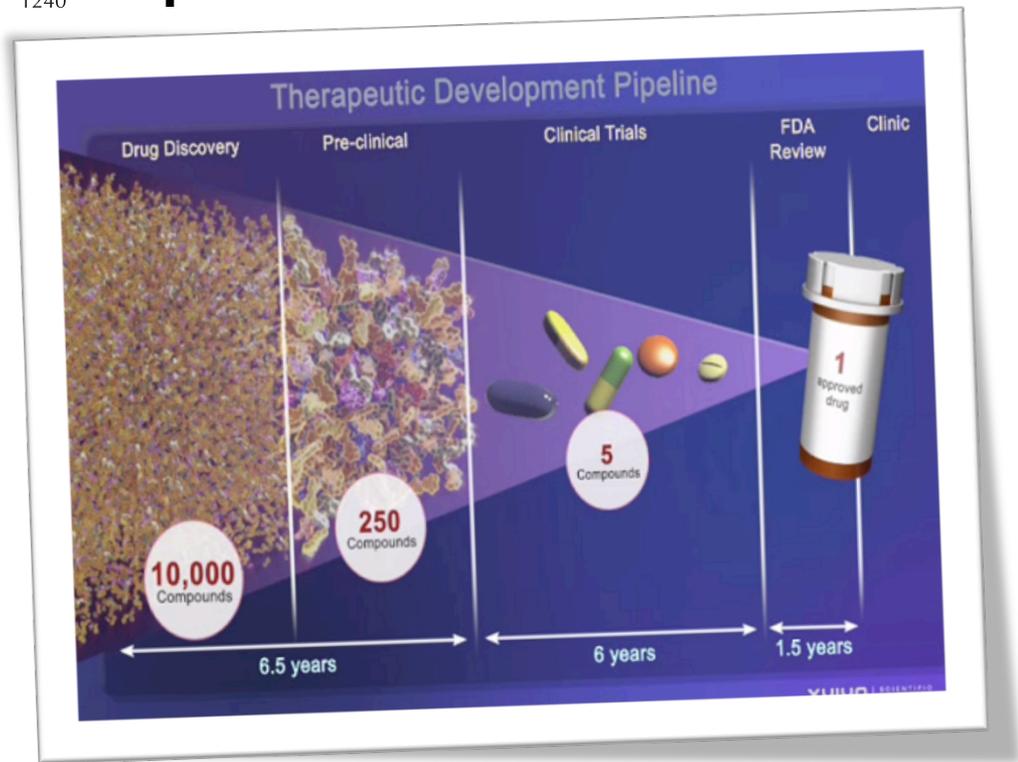
Risorse necessarie:

- Robotica
- Rilevatori sensibili
- Programmi di controllo di processo
- Programmi per l'interpretazione dei dati





# PIÙ MOLECOLE PIÙ SPESE



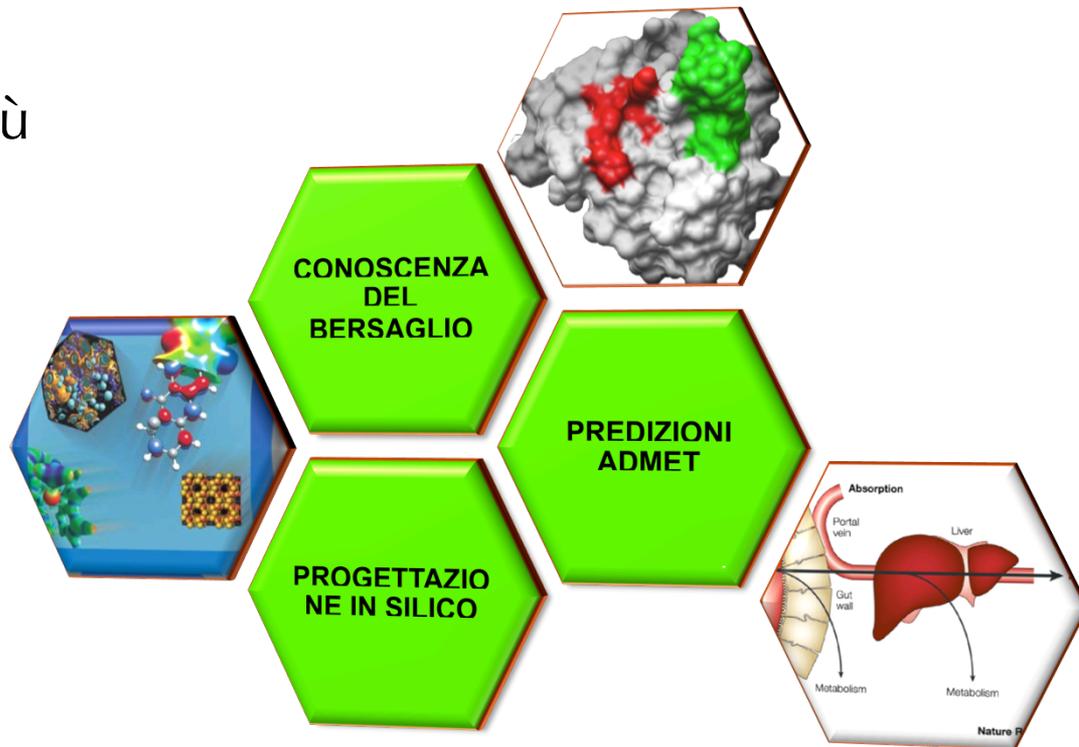
- Statistiche: 10 mila composti testati per ogni farmaco sviluppato
- HTS e chimica combinatoriale aumentano il numero di composti sintetizzati e testati
- **Il costo della ricerca sul farmaco aumenta**



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# IL FUTURO DELLA RICERCA SUL FARMACO

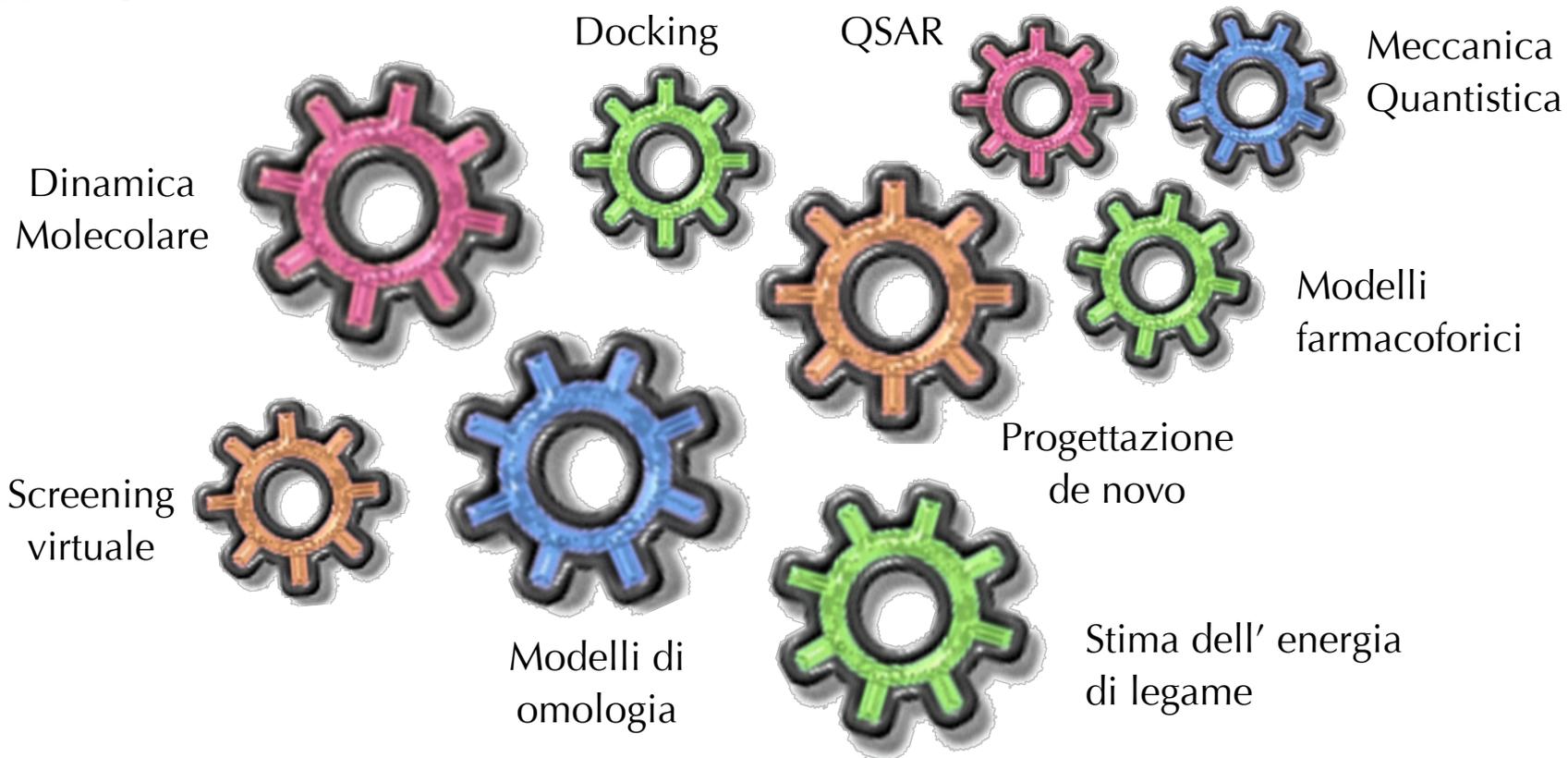
- ✓ Progettazione più intelligente
- ✓ Riduzione del numero di composti





UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# PROGETTAZIONE IN SILICO





# STRUTTURE DISPONIBILI DI BERSAGLI



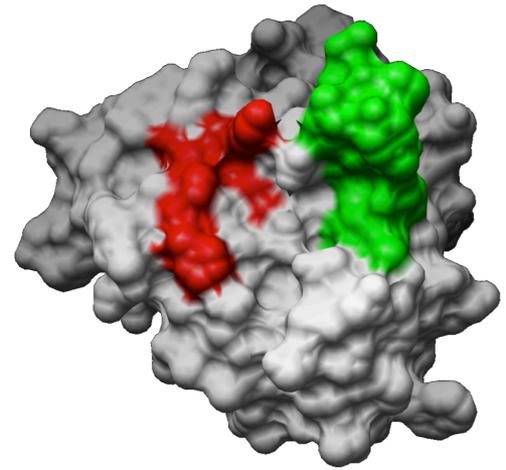
21 Ottobre 2015:  
**113,130**  
strutture depositate





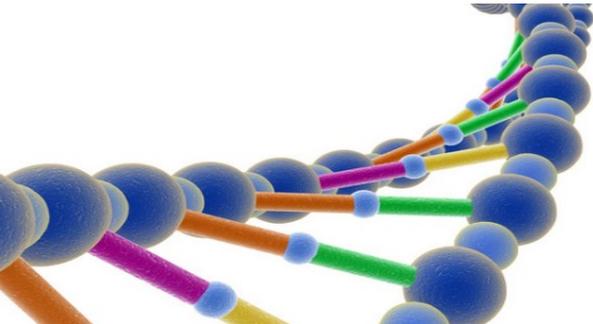
UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# CONOSCENZA DEL BERSAGLIO MOLECOLARE



**Bersagli molecolari possono essere:**

- Proteine
  - Enzimi
  - Trasportatori
  - Recettori
  - ecc...
- Acidi nucleici

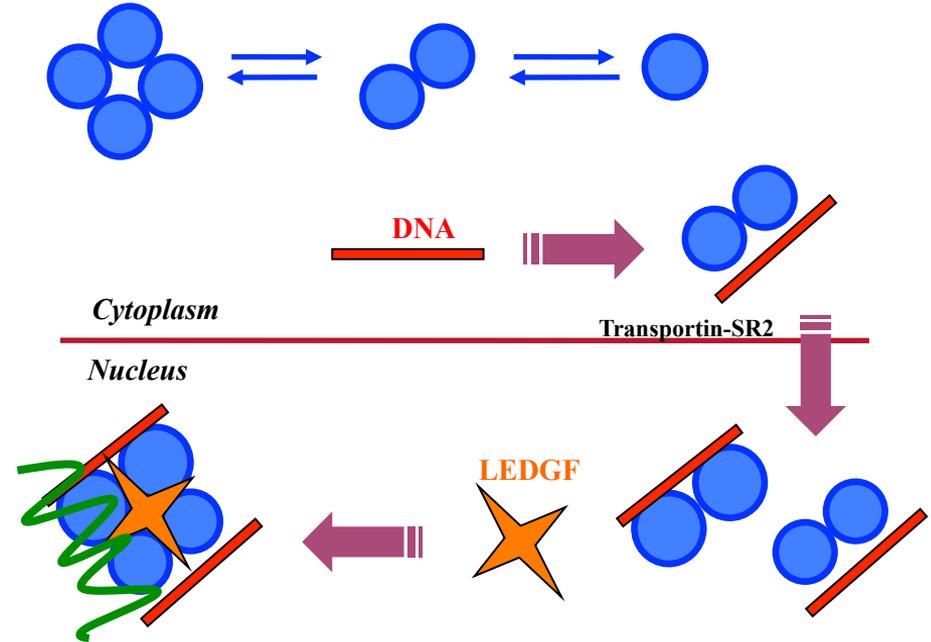


**Conoscerle la struttura del bersaglio molecolare è  
importante:**

- Capire in meccanismo che regola l'attività del bersaglio a livello molecolare
- Usare questa conoscenza per progettare composti che:
  - Inibiscano un effetto non desiderato
  - Aumentino un effetto desiderato
- Superare problemi di resistenza ai farmaci

# INIBIZIONE DELL'INTEGRASI DI HIV

- L'integrasi (IN) è responsabile dell'**integrazione** del **DNA virale** in quello cellulare
- Stati monomerico, dimerico e tetramerico in equilibrio
- IN dimerica si lega al DNA virale nel citoplasma durante la modifica dell'estremità 3' dell'acido nucleico



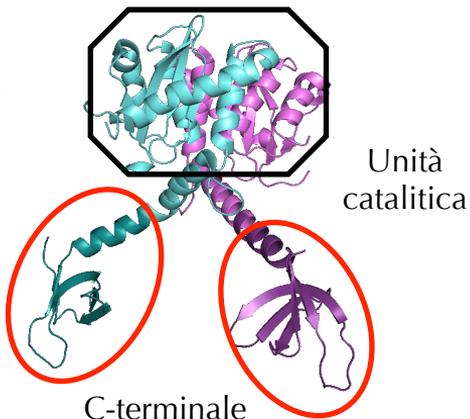
In seguito al loro trasporto all'interno del nucleo ed in presenza del fattore di crescita LEDGF, due dimeri complessati al DNA si legano tra loro formando un tetramero e l'integrazione procede al trasferimento del filamento.



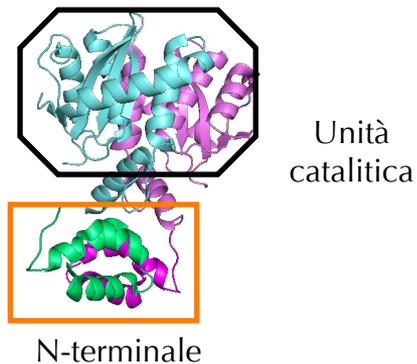
UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# INIBIZIONE DELL'INTEGRASI DI HIV

1EX4



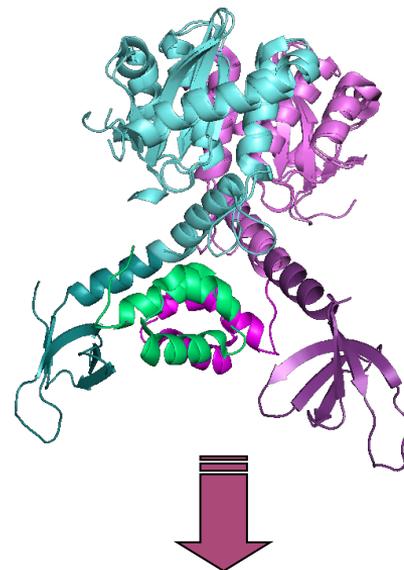
1K6Y



Assemblaggio  
strutturale



Dimero completo di IN

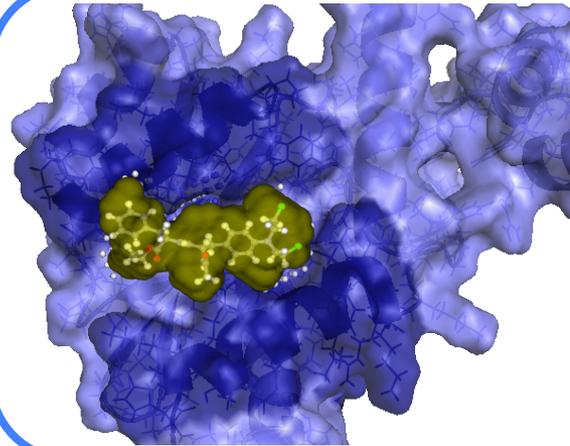
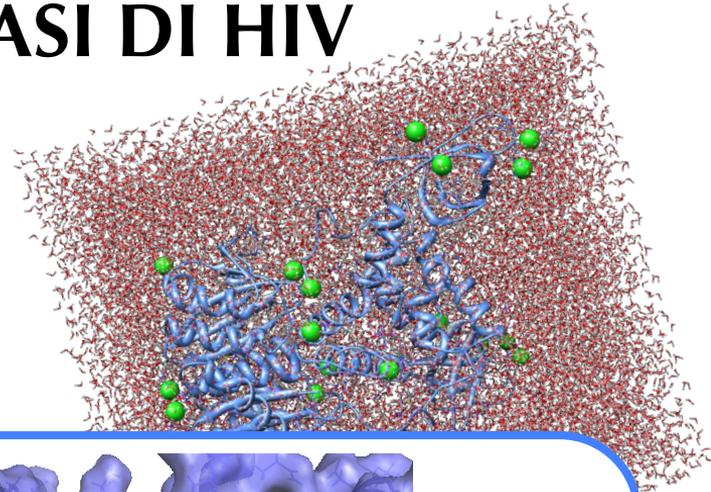


Ulteriore affinamento:  
residui mancanti 47-55 da 1WJD,  
residui mancanti 140-149 da 1BL3



# INIBIZIONE DELL'INTEGRASI DI HIV

- Il modello del dimero di IN fu ottimizzato con una simulazione di dinamica molecolare (**MD**) usando **AMBER10**
- La traiettoria MD ha permesso la determinazione dei residui più importanti (**hot spots**) per la formazione del dimero, attraverso la stima dell'energia di legame con il metodo **MM-GBSA** (Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Accessible).

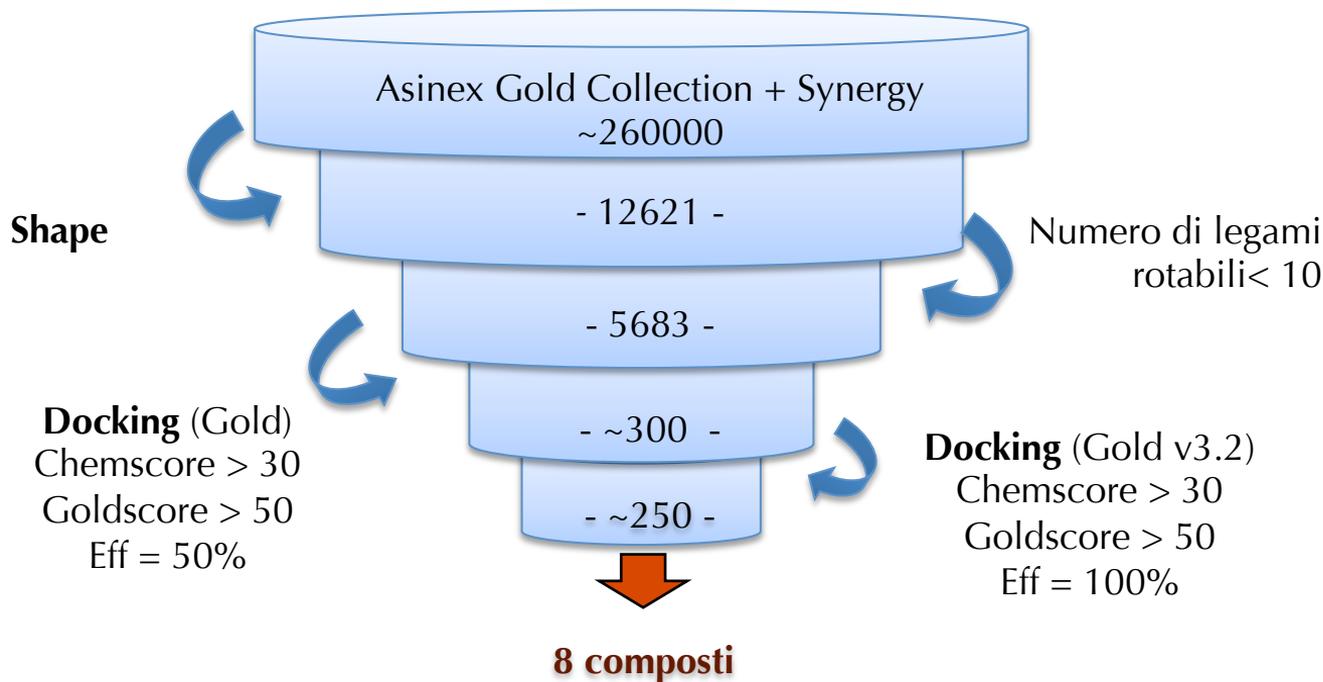


**Determi-  
nazione  
del sito  
di legame**



# INIBIZIONE DELL'INTEGRASI DI HIV

## SCREENING VIRTUALE BASATO SULLA STRUTTURA DEL BERSAGLIO



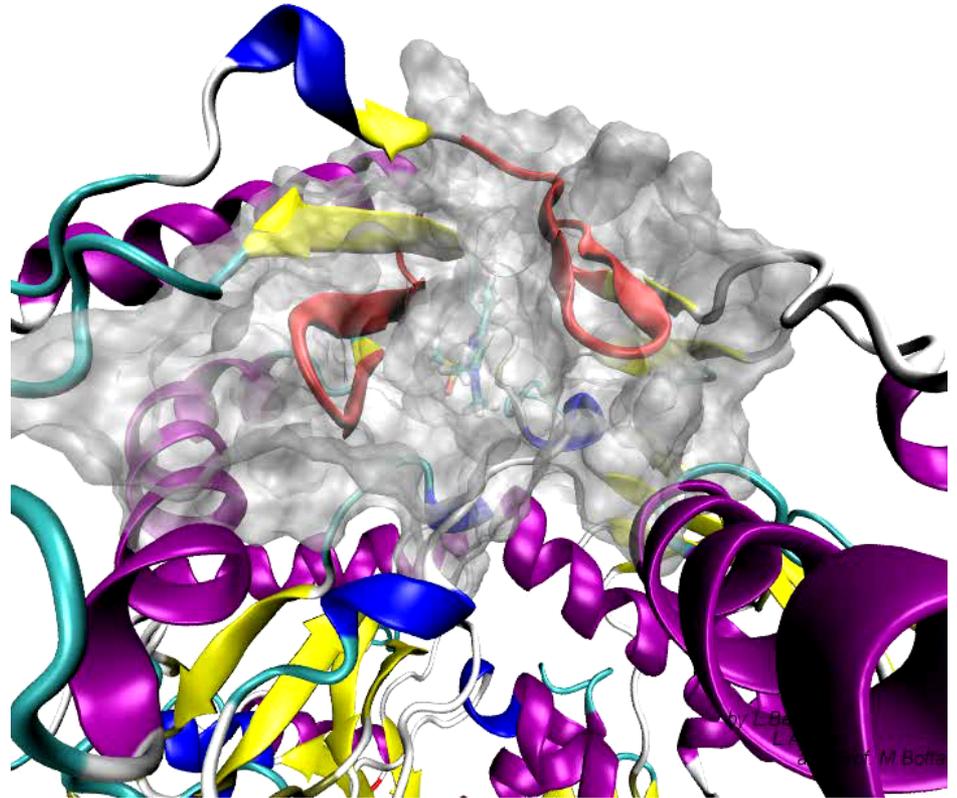


UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# DINAMICA MOLECOLARE GUIDATA (TARGETED MD - TMD)

Nella TMD, un insieme di atomi è guidato durante la simulazione verso la conformazione finale per effetto di forze esterne.

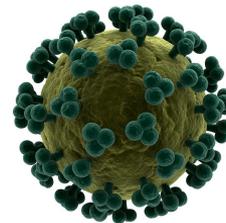
TMD è stata usata per accelerare lo spostamento di DAVP dal sito NNBP a quello della struttura di cristallografia a raggi X.





UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# RICERCA CONTRO HIV



## LA LOTTA CONTRO HIV

- Più di 25 milioni di morti
- Più di 40 milioni di infetti

I bersagli farmacologici della terapia attuale sono proteine virali, prone a mutazioni. Ciò può causare il **fallimento terapeutico.**

Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)	
<b>Combivir</b> (zidovudine + lamivudine)	
<b>Emtriva</b> (emtricitabine)	
<b>Epivir</b> (lamivudine)	
<b>Epzicom*</b> (abacavir + lamivudine) *Sold as Kivexa in some countries	
<b>Retrovir</b> (zidovudine)	
<b>Trizivir</b> (abacavir + zidovudine + lamivudine)	
<b>Truvada</b> (tenofovir + emtricitabine)	
<b>Videx EC*</b> (didanosine) *Also available generically in the U.S.	
<b>Viread</b> (tenofovir)	
<b>Zerit</b> (stavudine)	
<b>Zigen</b> (abacavir)	

Protease Inhibitors (PIs)	
<b>Aptivus</b> (tipranavir)	
<b>Crixivan</b> (indinavir)	
<b>Invirase</b> (saquinavir)	
<b>Kaletra*</b> (lopinavir + ritonavir) *Sold as Aluvia in some countries	
<b>Lexiva*</b> (fosamprenavir) *Sold as Telzir in some countries	
<b>Norvir</b> (ritonavir)	
<b>Prezista</b> (darunavir)	
<b>Reyataz</b> (atazanavir)	
<b>Viracept</b> (nelfinavir)	

Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)	
<b>Edurant</b> (rilpivirine)	
<b>Intelence</b> (etravirine)	
<b>Rescriptor</b> (delavirdine)	
<b>Sustiva*</b> (efavirenz) *Sold as Stocrin in some countries	
<b>Viramune XR</b> (nevirapine)	
Integrase Inhibitors	
<b>Isentress</b> (raltegravir)	
Fusion and Entry Inhibitors	
<b>Fuzeon</b> (enfuvirtide)	
<b>Selzentry*</b> (maraviroc) *Sold as Celsentri in some countries	
Single Tablet Regimens	
<b>Atripla</b> (efavirenz + tenofovir + emtricitabine)	
<b>Complera</b> (rilpivirine + tenofovir + emtricitabine)	
<b>Stribild</b> (elvitegravir + cobicistat + tenofovir + emtricitabine)	

[http://www.aidsmeds.com/articles/DrugChart\\_10632.shtml](http://www.aidsmeds.com/articles/DrugChart_10632.shtml)

<http://questiongene.com/researching-hiv/>



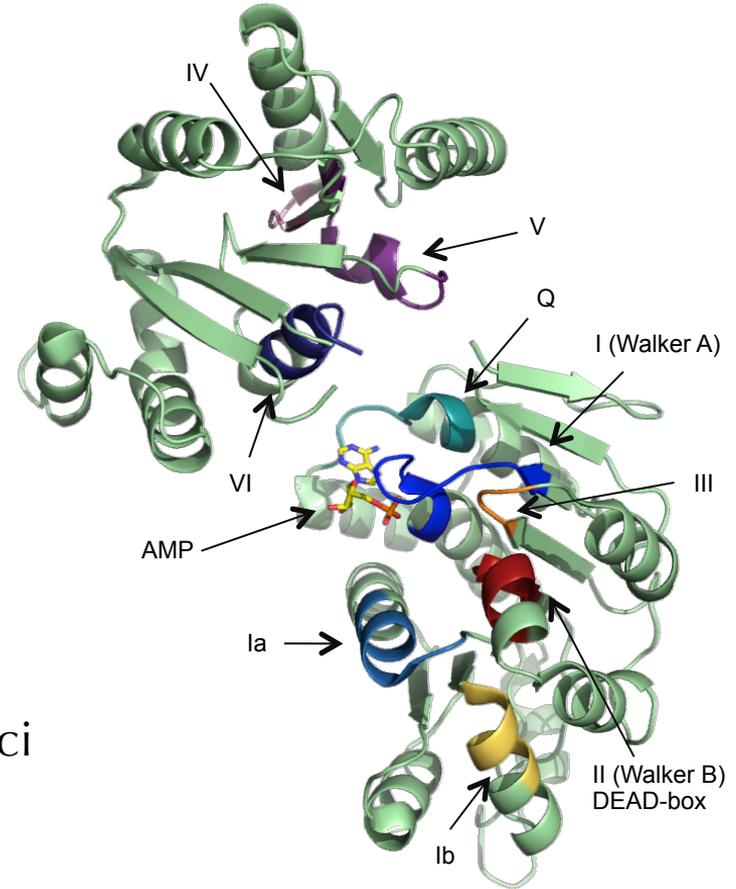
UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# INIBIZIONE DI DDX3

## USARE BERSAGLI MOLECOLARI CELLULARI

Usando bersagli cellulari  
**essenziali** per la **replicazione di  
HIV** si riduce la probabilità che  
si sviluppi resistenza  
farmacologica.

DDX3 è **essenziale** per il  
trasporto degli acidi nucleici  
virali (DNA e RNA) tra il  
citoplasma ed il nucleo.



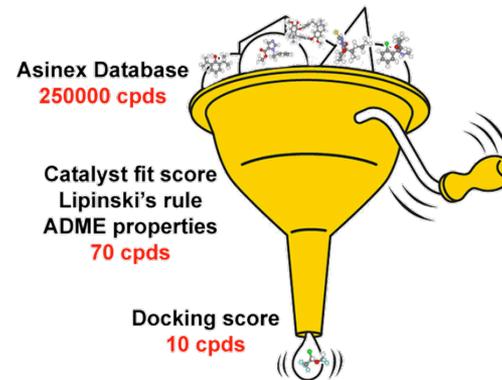


UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# INIBIZIONE DI DDX3

## IL SITO DI LEGAME DELL' ATP COME BERSAGLIO

(Screening virtuale)



## LA NAZIONE

italianews

SIENA

Quotidiano.net | il Resto del Carlino | LA NAZIONE | IL GIORNO | QS SPORT | TV | FOTO E VIDEO | BLOG | SERVIZI | LAVORO | ANNUNCI | CASA

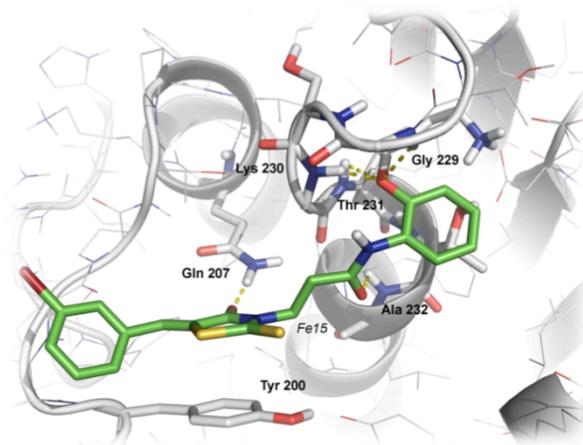
Firenze Arezzo Empoli Grosseto La Spezia Livorno Lucca Massa Carrara Montecatini Perugia Pisa Pistoia Prato Siena Viareggio

SCIENZA

### Aids, scoperta molecola killer Nuova arma contro l'infezione



L'Università di Siena ha già depositato due brevetti anti Aids basati su molecole nuove: il professor Maurizio Botta conta di poterle far diventare farmaco completando gli accertamenti preclinici: "Se riusciamo a farle diventare farmaco saranno destinate all'Africa"



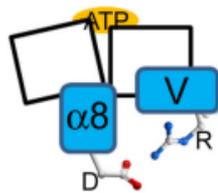


UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

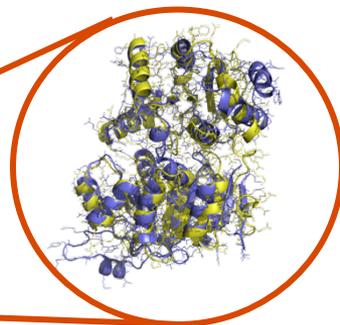
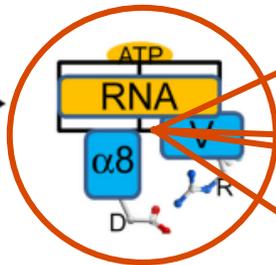
# INIBIZIONE DI DDX3: CERCANDO LA SELETTIVITÀ

## IL SITO DI LEGAME DELL' RNA COME BERSAGLIO

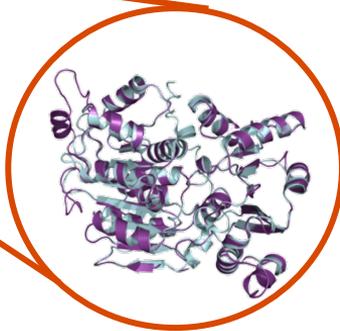
(Docking ad elevato rendimento)



RNA



Allineamento  
di domini  
singoli



Modello di  
omologia

**Nessuna** struttura cristallografica  
per **DDX3** umana nella  
**conformazione di legame all' RNA**



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# INIBIZIONE DI DDX3

## I SITI ENZIMATICI COME BERSAGLI

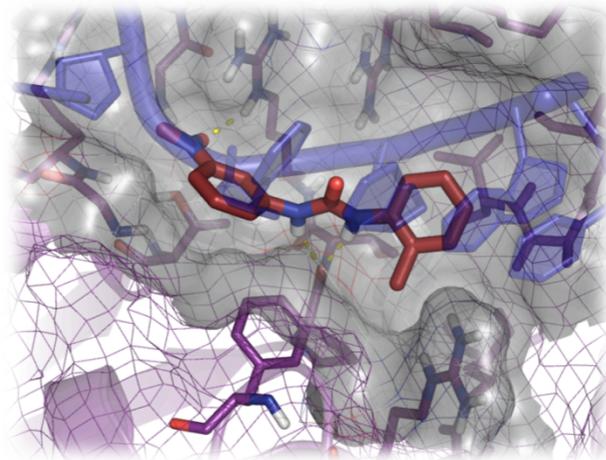
Identificazione di  
composti Hit con  
attività enzimatica

Tre famiglie di  
composti

Screening di librerie  
virtuali

Ottimizzazione  
degli Hit

Una famiglia di  
composti ibridi



Ancora  
**non abbastanza!**



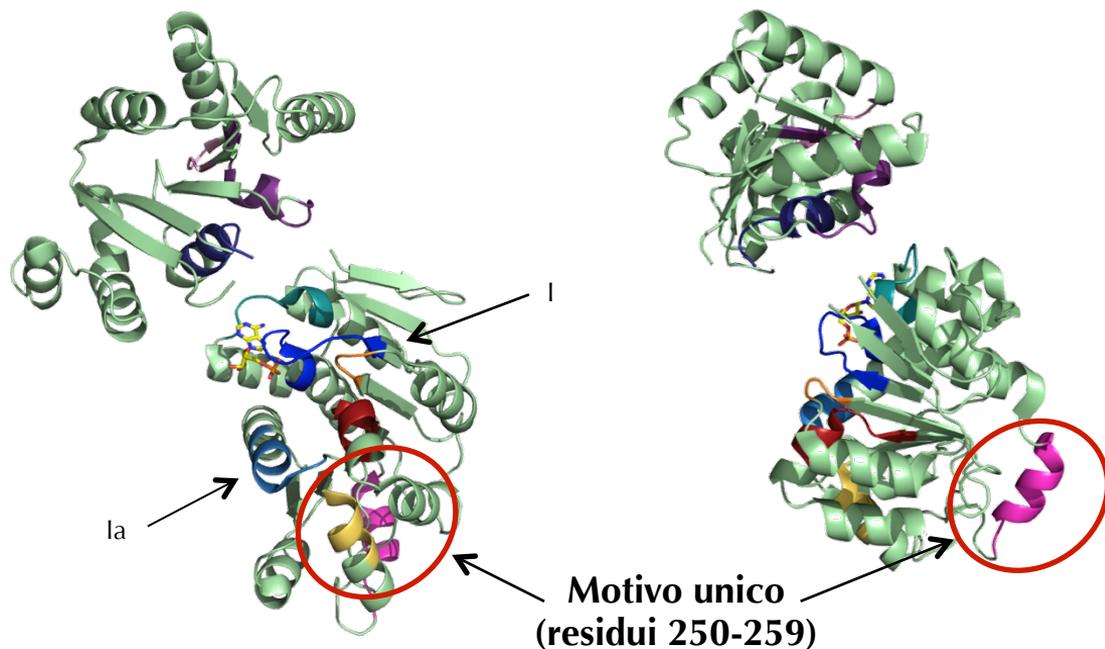
UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# INIBIZIONE DI DDX3: CERCARE DI ESSERE ESTREMAMENTE SELETTIVI

## IL MOTIVO UNICO COME BERSAGLIO

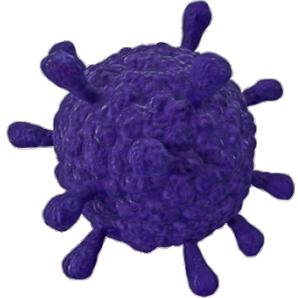
(Docking ad elevato rendimento)

DDX3 ha un' **inserzione specifica** tra i motivi I e Ia (residui 250 – 259), solitamente non riscontrata in altre elicasi di tipo DExD-box.



# LO STESSO INIBITORE PER MOLTI VIRUS... E TUMORI!!!

Con questo studio è stato dimostrato che **DDX3** è **implicata** anche in **molte altre patologie**. I composti erano non-citotossici, ma attivi contro:



**HCV:** interagisce con la proteina C usata dal virus per costruire il nucleocapside.



**Japanese Encephalitis V:** si lega all' RNA virale durante la replicazione.



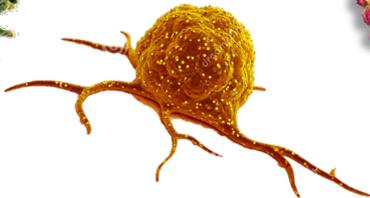
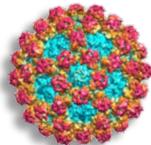
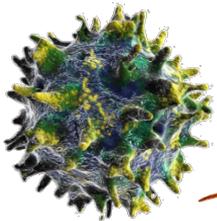
**Poxvirus:** si lega alla proteina K7, essenziale per superare la risposta cellulare mediata da IFN.



**West Nile V, Dengue V:** meccanismo sconosciuto



**Aggressive cancers** (*lung cancer, prostate cancer, breast cancer*): meccanismo sconosciuto





UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# ADMET – ARRIVARE AL BERSAGLIO



## Solubilità

(es.  
concentrazione  
plasmatica, ecc...)

## Lipofilia

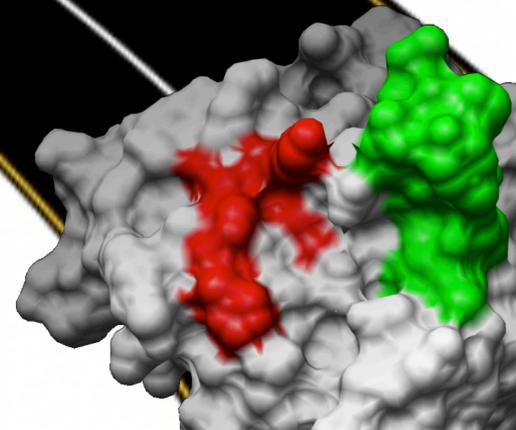
(es. interazione con  
proteine plasmatiche,  
distribuzione negli  
organi, ecc...)

## Acidità/basicità

(e.g. stato di  
ionizzazione in  
soluzione, ecc...)

## Permeabilità

(es. passaggio  
attraverso le  
membrane cellulari o  
attraverso la barriera  
emato-encefalica  
(BBB), ecc..)

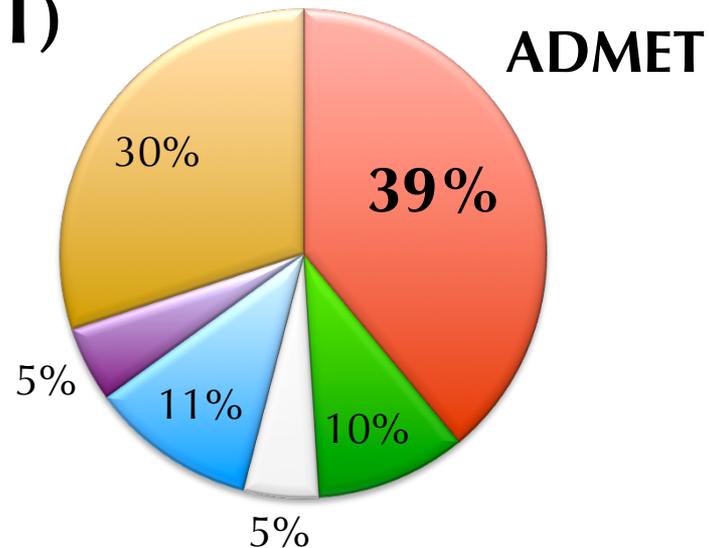




UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# DETERMINAZIONE DELL' ESSERE FARMACO-SIMILE (ADMET)

- Il **39%** dei candidati farmaci vengono abbandonati a causa di problemi **ADMET**
- Tali problemi vengono scoperti **tardi** nel processo di sviluppo farmaceutico
- Grande **perdita di investimenti**



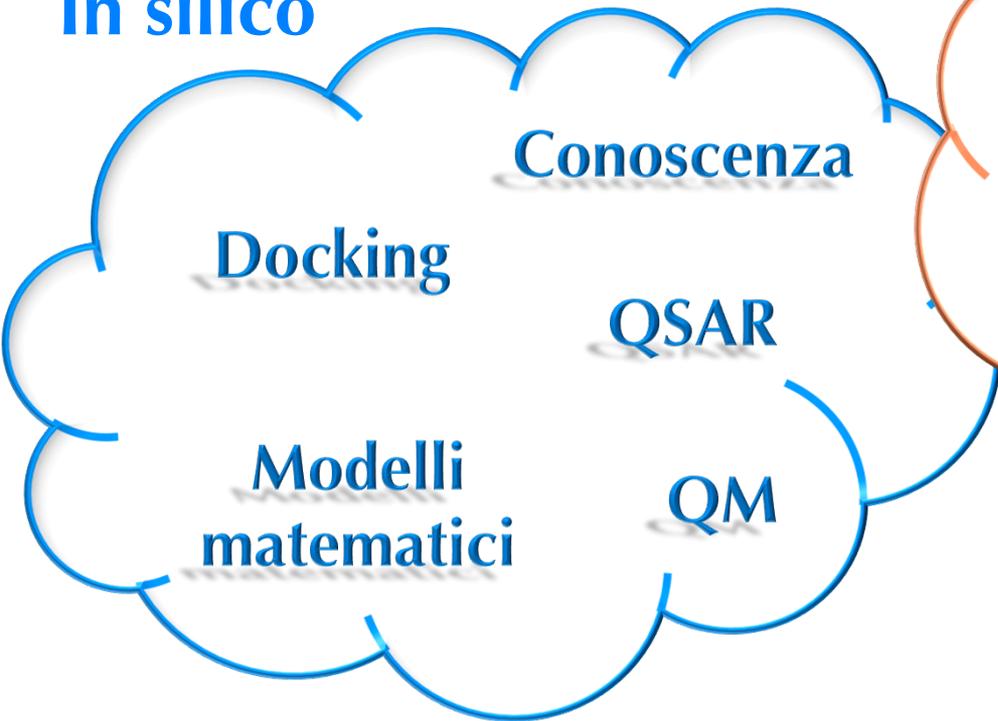
- **Determinazione ADME**
- Determinazione del profilo tossicologico



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# PREDIZIONI ADMET

**In silico**



Solubilità

Lipofilia

Metaboliti

Permeabilità  
*ad hoc*

**In vitro**



# PREDIZIONI ADMET

## È importante **PREDIRE**:

- La capacità dei composti progettati di raggiungere il tessuto o organo bersaglio
- I prodotti metabolici dei composti
- La tossicità dei composti e dei loro metaboliti

**PRIMA di raggiungere la fase pre-clinica**

Progettare e sintetizzare composti con il **profilo farmacocinetico (Pk) desiderato**

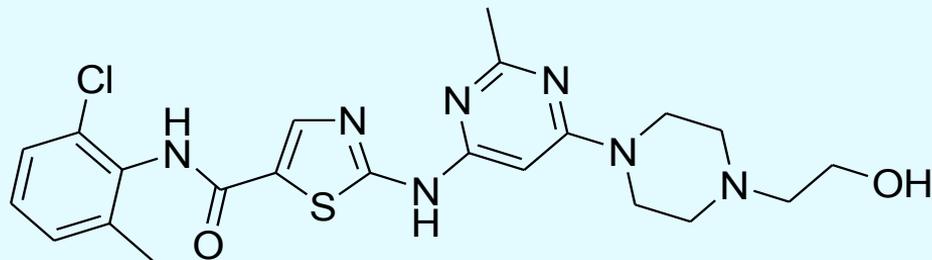
Progettare delle formulazioni (**drug delivery**)

# INIBITORI DUALI DI C-SRC/ABL

Src e Abl condividono una significativa omologia di sequenza ed una notevole somiglianza strutturale. Per questo, composti che competono con l' ATP sviluppati inizialmente contro Src hanno dimostrato di essere anche potenti inibitori di Abl.

## Dasatinib:

- Primo inibitore duale di Src/Abl
- Approvato nel 2006 dall' FDA statunitense per il trattamento della leucemia mieloide cronica (CML) resistente ad imatinib
- Attualmente in molti studi clinici per la terapia di diversi tumori solidi



Dasatinib  
(Bristol-Meyer-Squibb)

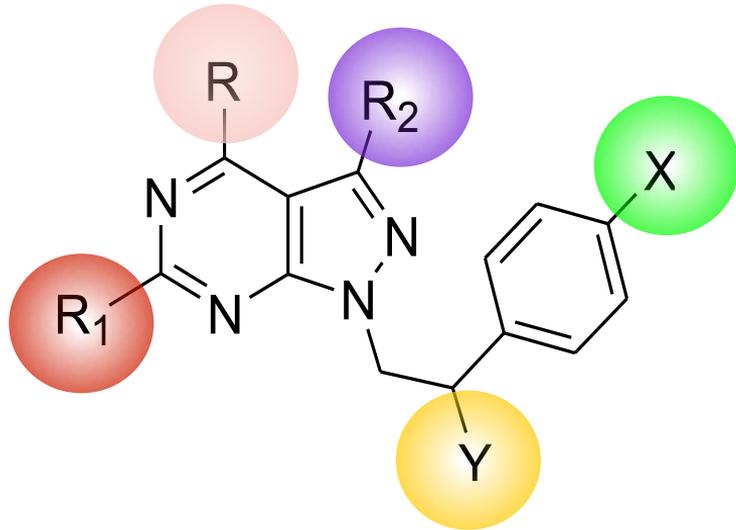


# INIBITORI DUALI DI C-SRC/ABL

**Permeabilità attraverso la BBB (saggio BBB PAMPA)**

**Attività molto buona:**

(es. SI306)



- $K_i = 0,04 \mu\text{M}$
- $IC_{50} = 0,7 \mu\text{M}$
- In vivo (50 mg/Kg per 60 giorni) = 50% di riduzione della crescita tumorale
- Stabilità Metabolica = 95%
- $P_{app} = 5,27 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$
- **BBB  $P_{app}$  =  $7,10 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$**



# INIBITORI DUALI C-SRC/ABL

*Sfortunatamente gli inibitori tirosin-chinasici (TK) hanno delle **proprietà farmacocinetiche mediocri**, in particolare una bassa solubilità in acqua.*

## Proprietà Biochimiche

1. Metabolismo  
(fase I e II)

## Proprietà Fisico- Chimiche

2. Permeabilità

3. Solubilità in acqua

- Cyclodestrine
- Liposomi
- Profarmaci

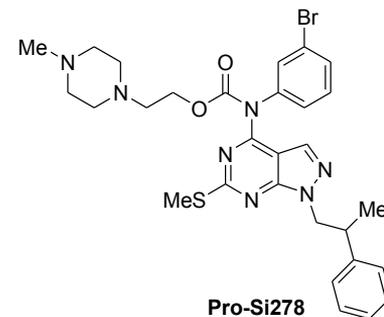
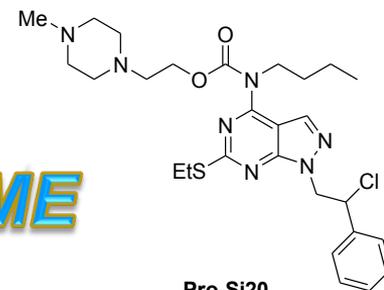


# INIBITORI DUALI DI C-SRC/ABL

**Solubilità in acqua (Profarmaci)**

Cpd	H <sub>2</sub> O solubility ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Stability				Metabolic stability (%)
		H <sub>2</sub> O T <sub>1/2</sub>	PBS pH 7.4 T <sub>1/2</sub>	MeOH T <sub>1/2</sub>	Human Plasma T <sub>1/2</sub>	
SI20	0.05	ND	ND	ND	ND	91.5
SI278	0.01	ND	ND	ND	ND	95.1
Pro-SI20	1.91 <sup>b</sup>	30 mins	63mins	125 mins	28 mins	ND
Pro-SI278	6.47	>48 hrs	>48 hrs	>48 hrs	193 mins	99.9

**ADME**



**Saggi  
Biologici**

Cpd	K <sub>i</sub> $\mu\text{M}$		IC <sub>50</sub> (SD) $\mu\text{M}$	
	c-Src	c-Abl wt	32D-p210	32D-T315I
SI20	0.60	0.32	3.5 (0.8)	6.7 (1.2)
SI278	0.018	1.07	6.2 (0.8)	5.8 (0.9)
Pro-SI20	NA	NA	1.2 (0.1)	2.4 (0.1)
Pro-SI278	NA	NA	2.8 (1.6)	2.6 (0.2)

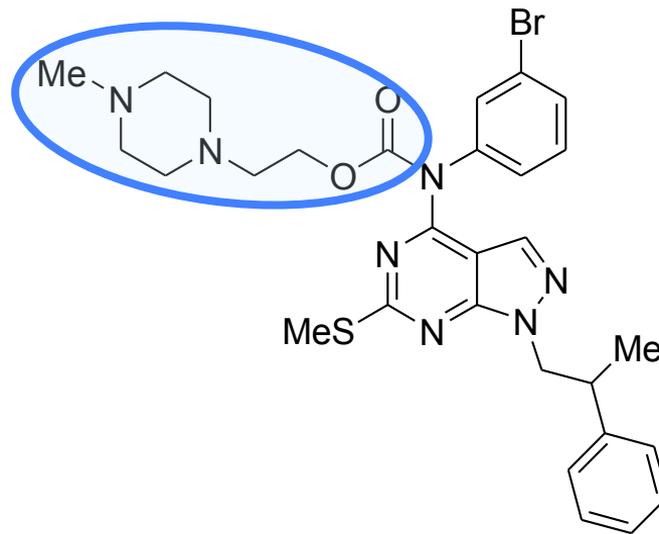


UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# VERSO LA TERAPIA PERSONALIZZATA

**Direzionare il composto verso il bersaglio (Profarmaci)**

- ✓ L'approccio del profarmaco ha avuto **successo** nel migliorare la solubilità dei composti

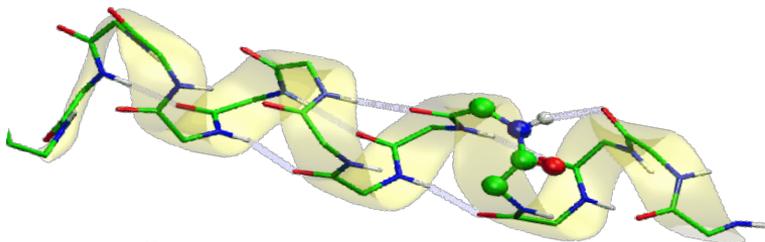




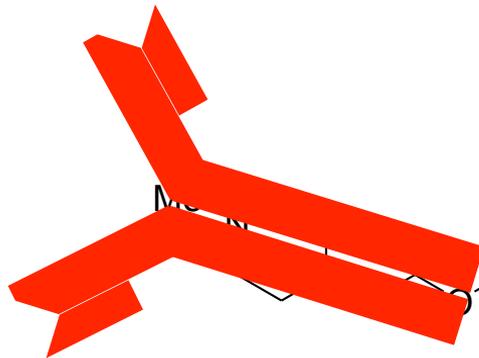
UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# VERSO LA TERAPIA PERSONALIZZATA

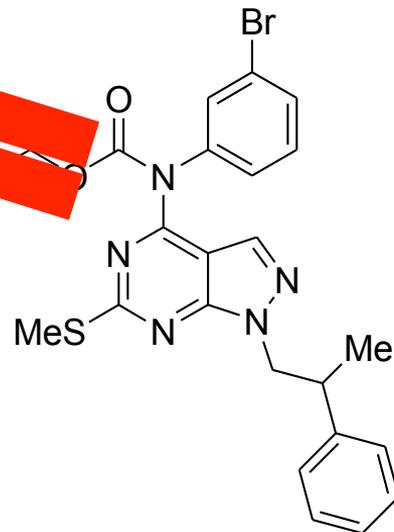
Direzionare il composto verso il bersaglio (Profarmaci)



Peptide



Anticorpo



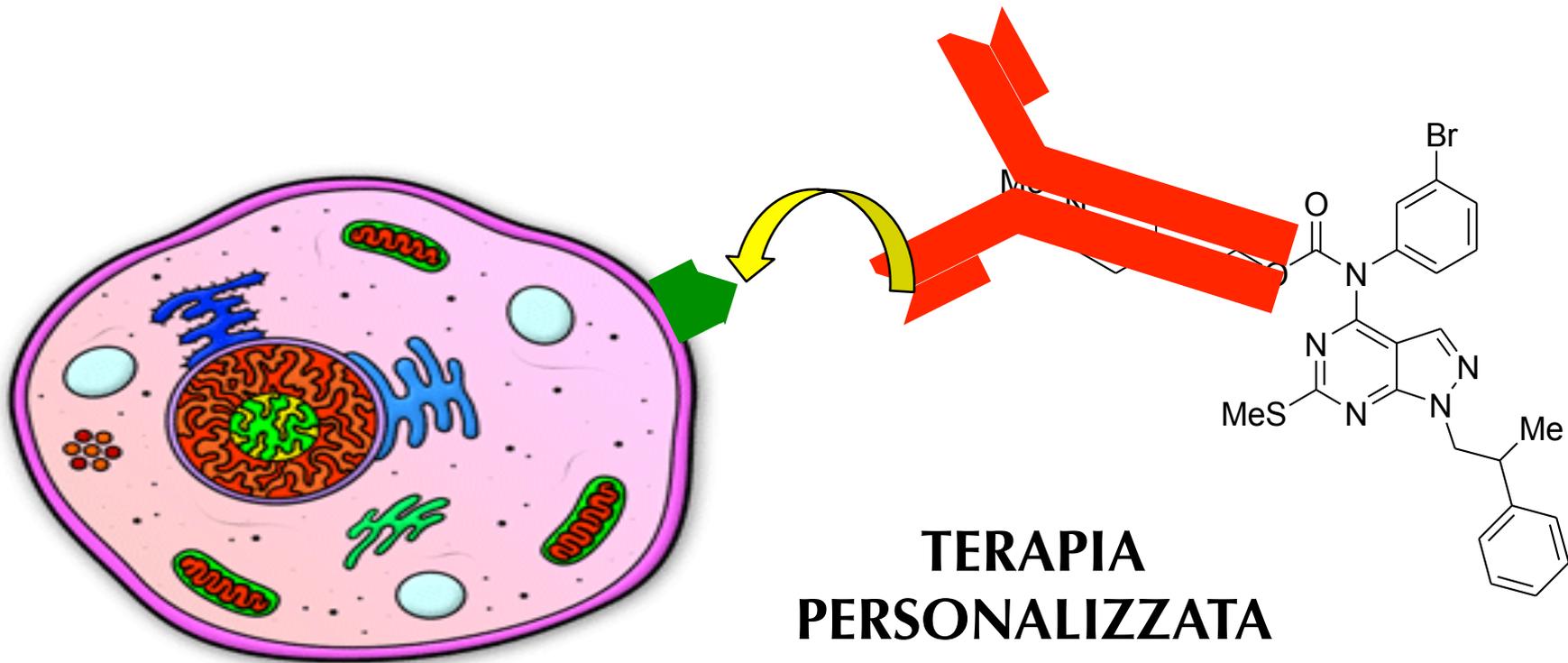
**IDEA:** legare qualcosa che venga **riconosciuto** in **maniera specifica** dalle cellule che si vogliono colpire.



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# VERSO LA TERAPIA PERSONALIZZATA

**Direzionare il composto verso il bersaglio (Profarmaci)**





# CONCLUSIONI

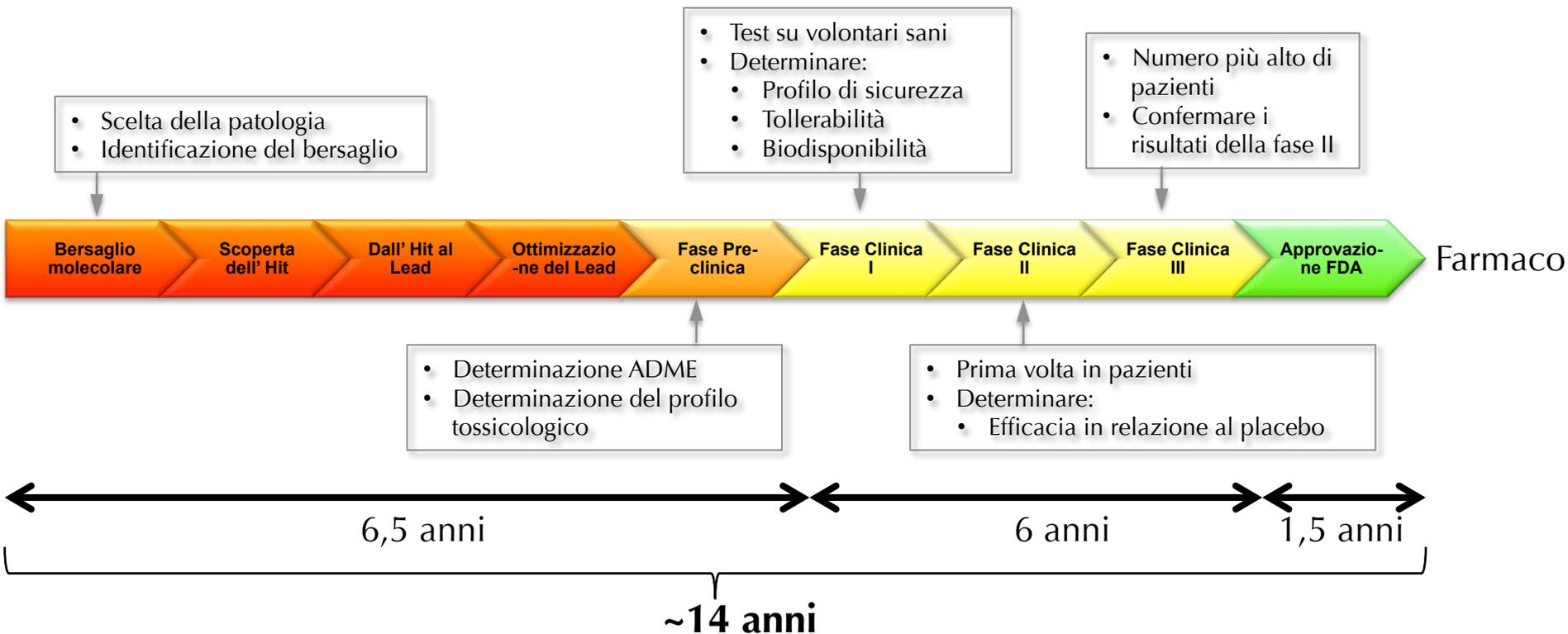
## L'innovazione può migliorare il futuro della ricerca sul farmaco:

- Migliore conoscenza del bersaglio farmacologico:
  - ✓ Progettazione più razionale
  - ✓ Terapia personalizzata
- Progettazione di farmaci in silico:
  - ✓ Minor numero di molecole sintetizzate e testate
  - ✓ Arrivare al candidato farmaco più velocemente e ad un costo minore
- Predizione/determinazione precoce del profilo ADMET:
  - ✓ Aiuto nella scelta sul destino di un farmaco
    - Abbandonare candidati prima nel processo di sviluppo del farmaco
    - Progettazione della soluzione formulativa più appropriata



UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

# .....MA IL PERCORSO PER ARRIVARE AL FARMACO È ANCORA MOLTO LUNGO E TORTUOSO....





UNIVERSITÀ  
DI SIENA  
1240

*“Il cammino che porta alla scoperta di un farmaco è un percorso complesso, combinazione di molte discipline: biologia strutturale, biologia molecolare, chimica sintetica, chimica computazionale, farmacologia e medicina.*

*Solo un buon lavoro di squadra può portare al raggiungimento dell’obiettivo.”*

*Maurizio Botta*



Luni Trist