

● In questo appuntamento vorrei presentarvi un lavoro molto recente (C.-A. Chen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 3840) che riporta il successo di un progetto fondamentalmente chimico, mirato però all'identificazione di molecole utili per la messa a punto di saggi biologici di grande rilevanza.

La chimica impiegata, sia di tipo "classico" sia combinatoriale, sia in soluzione sia su fase solida, è di sicuro interesse; il disegno logico del progetto, visibile attraverso il suo svolgimento come riportato nella pubblicazione, è ammirevole per la sua chiarezza ed essenzialità; l'impatto che esso può avere nel campo dello screening, e della ricerca farmaceutica più in generale, è notevole.

Le chinasi, cioè gli enzimi deputati a fosforilare residui idrossilici (serina, treonina) o fenolici (tirosina) di ogni tipo di proteine, stanno attraversando una fase di grande popolarità come target biologici per la cura di malattie complesse come, per esempio, il cancro. La loro enorme rilevanza nel processo di regolazione del genoma, cioè nell'attivazione o nello spegnimento di determinati prodotti genici, è da tempo nota; faceva paura, però, il fatto che ogni chinasi agisce su molti substrati e che, quindi, interagendo con una di esse si dovrebbero influenzare molti processi biologici. L'introduzione sul mercato del primo inibitore di chinasi (Gleevec, STI-571, usato per la cura della leucemia mieloide cronica) e lo status di sviluppo avanzato di molti altri inibitori ha rinsaldato la fiducia in questi target ed ha moltiplicato i progetti di chimica medicinale e di screening biologico su chinasi.

Sfortunatamente, la visualizzazione *in vivo* (cellule ecc.) dell'attivazione di una chinasi è difficile: le proprietà spettroscopiche del substrato proteico fosforilato e non fosforilato sono infatti molto simili, mentre una sua caratterizzazione biochimica richiede tempo e non è adatta per analisi high throughput.

Sforzi precedenti mirati a generare veri e propri sensori molecolari chimici capaci di venire fosforilati e, a causa della fosforilazione, di cambiare radicalmente le loro proprietà spettroscopiche hanno prodotto solo successi limitati.

Gli autori hanno deciso di creare un reporter di attività specifico per chinasi la cui attivazione è dipendente dalla presenza di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sensori molecolari per  $\text{Ca}^{2+}$  sono noti, e fra essi spicca il composto fluorescente **1** (Figura 1): esso subisce un forte shift di fluorescenza quando i quattro residui carbossilici vengono complessati da uno ione  $\text{Ca}^{2+}$ , la cui presenza viene perciò determinata in maniera precisa ed accurata. L'analogo disegnato dagli autori (**2**, Figura 1) non ha in sé caratteristiche strutturali che permettano una forte complessazione del calcio, ma venendo fosforilato da una qualsiasi chinasi si trasformerebbe in **3**, che invece possiede la struttura tetraanionica richiesta; nel caso di chinasi  $\text{Ca}^{2+}$  dipendenti la formazione di **3**, indicante la presenza di una chinasi attivata, verrebbe automaticamente determinata attraverso lo shift di fluorescenza provocato dalla complessazione di **3** con lo ione calcio (Figura 1).

La sintesi della parte xantenica di **2** avviene a partire dai derivati commerciali **4** e **5** (Figura 2), elaborati a dare i sintoni **6** e **7**. L'unione di questi ultimi avviene attraverso reazione di Friedel-Crafts a dare il derivato **8**, poi ciclizzato e protetto a dare l'intermedio chiave **9** (Figura 2). Il derivato aromatico decorato e protetto **11** è ottenuto dall'amminofenolo **10**, e i due sintoni chiave sono poi accoppiati tramite scambio Li-Br

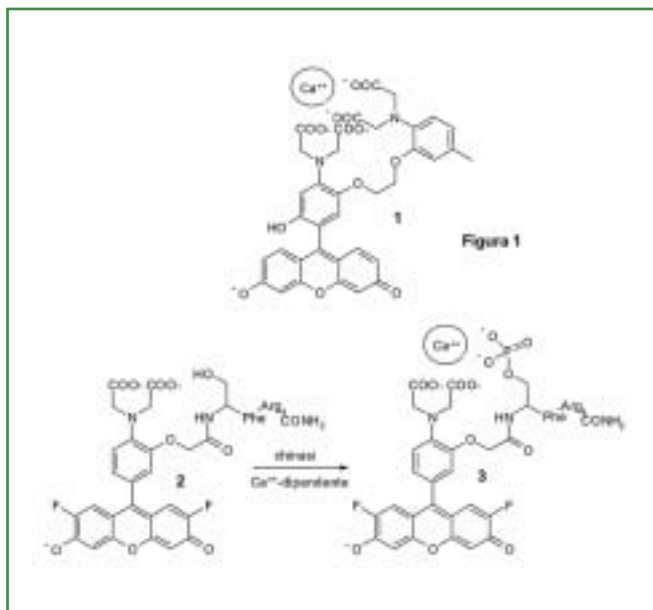


Figura 1

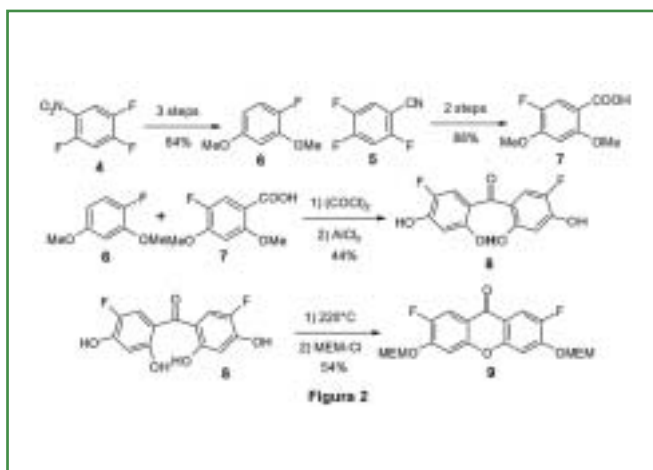


Figura 2

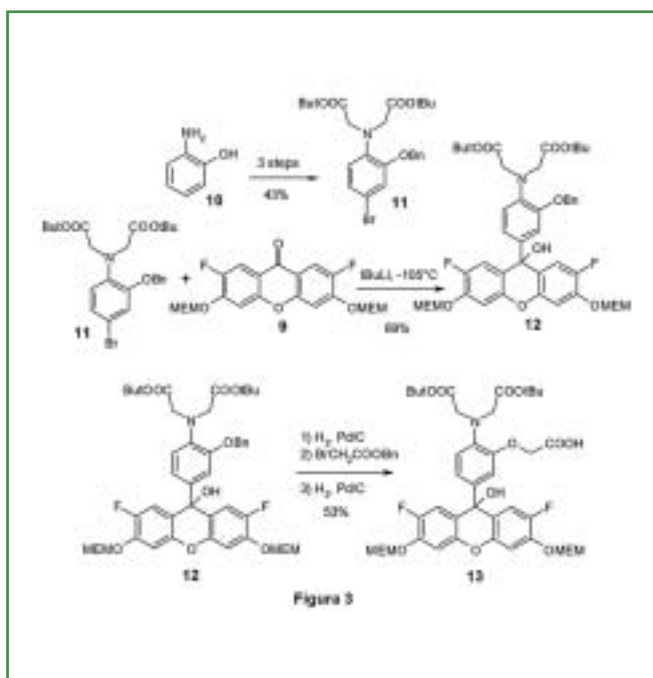
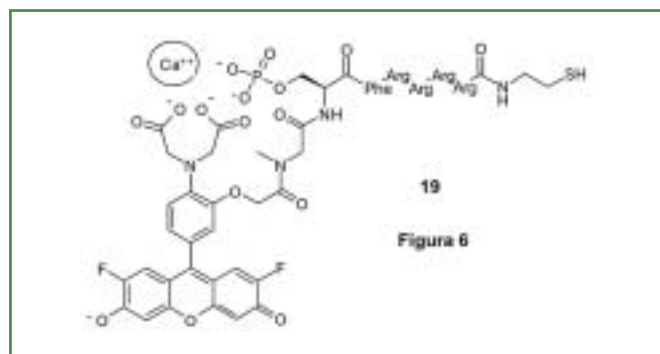
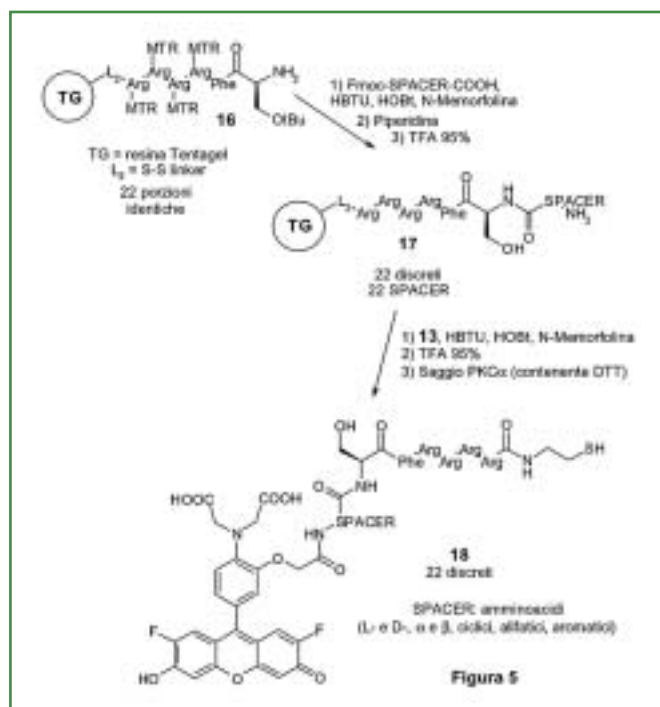
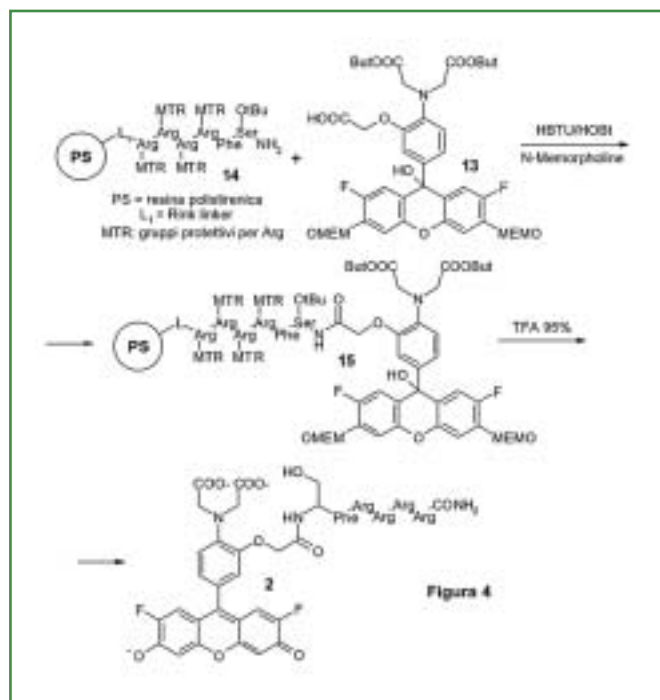


Figura 3



su **11** ed attacco sul carbonile di **9** a dare **12**, poi parzialmente deprotetto e decorato a dare l'intermedio **13** (Figura 3). Quest'ultimo è poi supportato su una resina funzionalizzata con l'esapeptide protetto Arg<sub>4</sub>-Phe-Ser-NH<sub>2</sub> (**14**), preparata usando protocolli standard di sintesi peptidica su fase solida, a dare **15** che è poi contemporaneamente deprotetto e rilasciato dal supporto solido in condizioni acide a dare **2** (Figura 4). Allo scopo di validare l'ipotesi del progetto il composto **2** è stato utilizzato come substrato artificiale in presenza di PKC $\alpha$  (isoforma  $\alpha$  della proteina chinasi C), una chinasi ione calcio-dipendente.

Osservando la miscela di reazione con uno spettrofluorimetro gli autori hanno evidenziato un aumento di intensità di fluorescenza del 140% in rapporto a quella del composto **2**, ed hanno quindi validato il composto stesso (già di suo estremamente fluorescente) come sensore biologico.

Un'approfondita analisi dell'interazione **2**-PKC $\alpha$  ha determinato una buona affinità del substrato artificiale ( $K_m=26,5 \mu\text{M}$ ) ma una ridotta velocità di fosforilazione ( $V_{max}=0,32 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ ): ciò richiederebbe un tempo troppo lungo per lo sviluppo di saggi high-throughput basati su questo reagente. Ritenendo che ciò potesse dipendere dall'adiacenza fra il sito di fosforilazione e l'ingombrante gruppo fluorescente, gli autori hanno deciso di preparare una piccola libreria combinatoriale di molecole simili a **2**, ma recanti uno spaziatore fra il residuo serinico e quello arilxantenico. Lo spaziatore è scelto fra 22 amminoacidi di varia natura, ed è piuttosto piccolo per non allontanare troppo i due siti recanti la struttura tetraanionica e quindi per non inibire la coordinazione con lo ione calcio. La struttura e la sintesi della libreria **18** sono riportate in Figura 5.

L'esapeptide Arg<sub>4</sub>-Phe-Ser **16** viene stavolta supportato tramite un legante disolfuro, importante nel prosieguo della sintesi, su resina idrofilica Tentagel. La resina viene divisa in 22 porzioni ed ognuna è condensata con un amminoacido N-protetto (Fmoc-SPACER-COOH, Figura 5).

Dopo deprotezione basica ed acida ognuno dei 22 derivati **17** è legato all'intermedio **13**; i risultanti costrutti sono deprotetti in ambiente acido e, per finire, sono depositati in 22 pozzi contenenti una miscela biologica per la misurazione dell'attività fosforilante di PKC $\alpha$ .

Questa miscela contiene anche DTT (ditiotreitolo), un agente riducente che provoca l'immediata rottura del legante disolfuro ed il rilascio di ogni componente della libreria **18** in soluzione, dove può avvenire la fosforilazione e quindi dove si può misurare ogni variazione nella fluorescenza del componente della libreria.

La caratterizzazione dei 22 costrutti ha portato alla selezione del composto **19** (SPACER = N-metilglicina, Figura 6, raffigurato dopo fosforilazione e coordinazione) come miglior probe biologico. Rispetto al composto **3** l'incremento di fluorescenza Ca<sup>2+</sup>-dipendente è elevato (264%), l'affinità per PKC $\alpha$  è lievemente migliorata ( $K_m=20,5 \mu\text{M}$ ), e soprattutto la fosforilazione avviene in maniera molto rapida ( $V_{max}=8,5 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{g}$ ).

Gli autori terminano la loro comunicazione dicendo che esperimenti per determinare la capacità di **19** a funzionare come sensore di fosforilazione da parte di PKC $\alpha$  in sistemi cellulari sono in corso; i risultati ottenuti fino ad ora fanno ben sperare, a mio avviso, e mi auguro che questo esempio possa servire come fonte di ispirazione anche per qualcuno fra i nostri Lettori.