



HIGHLIGHTS TECNOLOGIE INNOVATIVE

a cura di Pierfausto Seneci - Dipartimento di Chimica organica - Università di Milano, pierfausto.seneci@unimi.it

Più volte ho sottolineato come in un progetto l'accesso alla diversità chimica - il nostro pane... - sia nulla, se non vi è un saggio affidabile e robusto per misurarne l'attività nel settore di nostro interesse; se parliamo di ricerca farmaceutica, s'intende solitamente uno o più saggi biologici rilevanti *in vitro* - *cell-free*, cioè su un *target* molecolare isolato, oppure cellulari, cioè in cellule mostranti il fenotipo patologico che ci interessa "prevenire o combattere". Più volte ho pure parlato di tecniche chimiche usate per chiarire le connessioni complesse in meccanismi biologici intricati; o per meglio comprendere le differenze fra proteine di struttura e/o funzione simile; o per capire se una proteina sia connessa ad una patologia - identificazione di un *target* - e se sia possibile combatterne l'effetto negativo con piccole molecole organiche - validazione di un *target*. In due parole, vi ho spesso parlato di *chemical biology*, o *chemical genetics*.

Il lavoro oggetto di questa Rubrica ha questa volta a che fare con entrambi gli argomenti. Per identificare nuovi principi attivi in aree parzialmente o totalmente inesplorate, bisogna avere accesso a saggi di efficacia innovativi; per fare in modo che tali principi siano più utili, bisogna che il modello su cui la loro attività è saggiata sia il più possibile affine al mezzo in cui i potenziali farmaci devono essere attivi: il nostro organismo. Se i saggi cellulari sono più "affidabili" di quelli su proteine isolate, poiché danno conto non solo dell'affinità per il bersaglio proteico ma anche della capacità di permeare la membrana cellulare e di restare metabolicamente stabili nella cellula, ancor più utile è poter saggiare l'attività di una collezione di composti - utilizzando quindi un saggio ad alta capacità, o *high throughput* - su un organismo vivente, così da vedere la loro efficacia - ed eventuali effetti collaterali/indesiderati - su un sistema complesso.

Dei ricercatori accademici di Philadelphia (M.A. Wolman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, **108**, 15468) hanno pubblicato un lavoro in cui uno screening di 1.760 composti bioattivi noti su un organismo vivente (larve del pesciolino *zebrafish*: pesce zebra?) molto usato in

genetica ha permesso di identificare composti in grado di influire sui processi di apprendimento del pesciolino. Vi consiglio, innanzitutto, di "apprendere" come tali processi nella larva siano determinati attraverso saggi di reazione visiva - stimoli luminosi alternati ad altri di luce ad intervalli di durata diversa, e con tempi di ripetizione diversi - ed uditiva - esposizione a rumori pure d'intensità e durata diversa. Nell'uno e nell'altro caso si acquisiscono i parametri per larve non trattate, e si misurano la *short-term* e *long term habituation* (rispettivamente, reazioni immediate e non soggette ad apprendimento a lungo termine, e veri e propri comportamenti acquisiti per il resto della vita del pesciolino in presenza degli stessi stimoli). Delle campagne HTS, sottoponendo le larve allo stimolo uditivo e misurando frequenze, intensità e durata dell'apprendimento in presenza dei composti noti per avere un'attività su un *target* molecolare, sono state completate in 25 giorni, effettuando sui composti attivi (che aumentano o diminuiscono il tempo necessario a provocare assuefazione allo/apprendimento dello stimolo uditivo) saggi ulteriori per determinarne il meccanismo di azione.

Fra gli 11 composti che provocano minor assuefazione/maggior reazione allo stimolo, e i 19 con effetto opposto, vi sono composti noti per avere effetti sul CNS/sistema nervoso centrale - canali ionici, recettori NMDA, GABA, 5-HT ecc. Composti attivi sugli stessi recettori mostrano la stessa risposta indotta nel pesciolino, a riprova dell'affidabilità del saggio biologico *in vivo*.

Più sorprendente l'identificazione di due classi di composti apparentemente non legati a meccanismi cognitivi. Gli inibitori di chinasi SU-9516, kenpaulone e indirubina-3-ossima (rispettivamente **1-3**, Fig. 1) riducono la capacità di apprendimento delle larve: confrontando la specificità di **1-3**, è ragionevole ipotizzare che la loro comune capacità di inibire le chinasi Cdk e GSK-3 sia collegata *in vivo* allo sviluppo di funzioni neuronali, poi coinvolte nell'apprendimento - alcune evidenze di un loro coinvolgimento in malattie umane dell'apprendimento-memoria, come l'Alzheimer, sono riportate nel lavoro. Una simile focalizzazione su 4-5 potenziali *target* essenziali per l'apprendimento in un essere vivente, fra le decine-centinaia genericamente connesse a processi neurodegenerativi multi-fattoriali, è un eccezionale punto di partenza per progetti di ricerca farmaceutica, anche perché da subito associato a strutture chimicamente semplici e modificabili.

Un'altra molecola attiva, l'acido 12-metossidodecanoico **4**, pure provoca riduzione dell'apprendimento. Suoi analoghi (acidi **5** e **6**, Fig. 1), invece, sono assolutamente inattivi, mostrando una "primitiva" relazione struttura-attività in dipendenza della posizione dell'atomo di ossigeno. Consiglio, per finire, che i Lettori interessati leggano dei rigorosi studi portati a termine usando la molecola **4**, che evidenziano connessioni con la traslocazione della famiglia di chinasi SLK, e con un effetto sul meccanismo recettoriale legato al neuromodulatore NMDA, N-metil-D-aspartato: nuove strategie attraenti per modulare terapeutamente fenomeni cognitivi in malattie del CNS dai pesciolini...

