


 MARIA PAOLA COSTI^A, REMO GUERRINI^B, GLAUCO PONTERINI^A
^ADIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA, UNIVERSITÀ DI MODENA E REGGIO EMILIA

MARIAPAOLA.COSTI@UNIMORE.IT

GLAUCO.PONTERINI@UNIMORE.IT

^BDIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE E FARMACEUTICHE, UNIVERSITÀ DI FERRARA

REMO.GUERRINI@UNIFE.IT

IL GIOCO MOLECOLARE TRA DRUG DISCOVERY E CHEMICAL BIOLOGY

La chemical biology è una disciplina vicina alla chimica farmaceutica strettamente connessa al processo di drug discovery mediante uno scambio di ruolo di inibitori/ligandi e probe molecolari. In tre esempi di applicazione della chemical biology-drug discovery vengono illustrati i linker per la bioconiugazione, le sonde fluorescenti in studi di interazione farmaco-recettore cellulare (target engagement) e l'indagine proteomica dei meccanismi biologici d'azione di inibitori specifici.

Introduzione

La chemical biology (CB) offre una piattaforma tecnologica multidisciplinare per facilitare la comunicazione tra chimici e biologi, i quali sapranno tradurre i risultati della loro collaborazione in innovazioni e scoperte.

In questo contesto, la possibilità di utilizzare conoscenze chimiche per la comprensione dei meccanismi biologici d'azione dei farmaci pone i chimici farmaceutici in una posizione privilegiata nella fase iniziale del processo di drug discovery, offrendo loro la possibilità di contribuire in modo rilevante alla risoluzione di importanti problemi biologici [1]. Mentre i concetti che stanno alla base di questi approcci sono acquisiti da tempo [2], le tecnologie sono frutto di rapido e recente sviluppo. Da sempre la ricerca scientifica utilizza molecole che provengono dallo spazio chimico-farmaceutico accessibile al fine di studiare le biomolecole e le loro funzioni; la peculiarità della CB sta nelle tecnologie adottate: esse hanno cambiato totalmente il modo di studiare le funzioni biologiche. I campi di applicazione della CB spaziano tra tecniche di target engagement, espan-

sione del codice genetico mediante amminoacidi (AA) non naturali, utilizzo di probe per lo studio e la modulazione di network metabolici cellulari per chiarire i meccanismi (chemical proteomics), studio di pattern di interazione derivati dalle scienze omiche, utilizzo di specifici probe per tecniche ottiche e di imaging (Fig. 1A) e progettazione e uso di bioconiugati. Il contributo del biofisico è importante per integrare in modo competente la CB.

Questa nota è focalizzata su tre temi in parte derivanti dall'esperienza degli Autori: le strategie di progettazione di linker per la bioconiugazione, l'utilizzo di "probe" per studi di target engagement e la activity-based proteomics, una sezione della chemical proteomics.

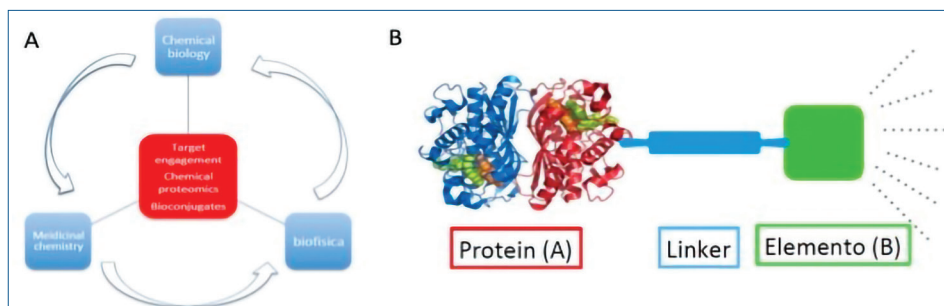
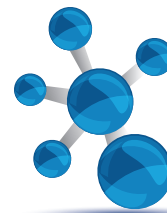


Fig. 1 - A) Integrazione della chemical biology con lo studio di inibitori, ligandi e bioconiugati per la comprensione di meccanismi biologici; B) struttura modulare di un coniugato di due entità chimiche, A e B, che hanno in genere strutture e funzioni diverse



Strategie di bioconiugazione

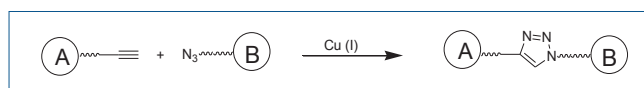
Le strategie di coniugazione spesso prevedono la costruzione di un dispositivo molecolare chimerico (Fig. 1B): il ligando/inibitore (Fig. 1, elemento (B)), con una propria funzione, è in genere legato ad un'altra unità, avente diversa funzione (in figura una proteina, Proteina (A)) tramite un linker che alle due estremità presenta gruppi funzionali specifici di ancoraggio. Sebbene gli ambiti d'utilizzo siano vari e diversi utilizzi facciano ricorso a tecnologie differenti, ligandi, inibitori e coniugati costituiscono un sottoinsieme dello spazio chimico disponibile, da cui attingere per selezionare la specifica tecnologia ed i corrispondenti composti.

Sono disponibili molte strategie per legare covalentemente in modo chemoselettivo, stabile o scindibile, una proteina ad un linker [3]. In generale per questo scopo vengono utilizzati frammenti/linker di diversa lunghezza che presentano alle estremità gruppi funzionali adeguati per l'ancoraggio di proteine. Possono essere utilizzati residui naturali, oppure amminoacidi (AA) non naturali ortogonali, che presentano funzionalità chimiche diverse da quelle degli AA classici, per garantire una reattività specifica. Gli AA più comunemente usati sono cisteina e lisina, caratterizzati da una catena laterale tiolica (-SH) e amminica (-NH₂) il cui carattere nucleofilo è ampiamente sfruttato per la sintesi di bioconiugati. La chimica dei bioconiugati si basa sulla disponibilità commerciale (o sulla facile accessibilità sintetica) di molecole bifunzionalizzate con gruppi chimici dotati di reattività ortogonale ed elevata chemoselettività. In Tab. 1 sono riassunti alcuni reattivi commerciali e i relativi prodotti derivanti dalla reazione con gruppi tiolici (catena laterale della Cys) e amminici (catena laterale della Lys o parte N-terminale di proteine e peptidi). A e B rappresentano le biomolecole (proteine) o piccole molecole da coniugare.

Oltre che all'utilizzo di reagenti di crosslinking bifunzionali, la sintesi di bioconiugati può ricorrere a strategie chimiche che prevedono l'introduzione sui target di interesse di funzioni chimiche che saranno successivamente sfruttate per la bioconiugazione. Nello Schema 1 è illustrato, a titolo di esempio, l'utiliz-

Reagente	Componente A (con funzione SH)	Componente B (con funzione NH ₂)

Tab. 1 - Esempi di reazioni di bioconiugazione che sfruttano le catene laterali di cisteina e lisina



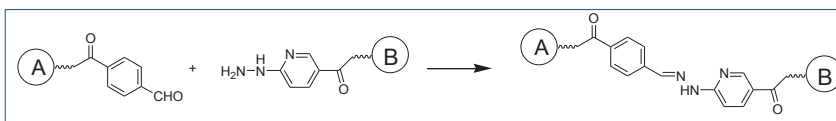
Schema 1 - Reazione di bioconiugazione tramite cicloaddizione azido-alchino Cu(I) catalizzata

zo della reazione di cicloaddizione azide-alchino (CuAAC) [4] che procede in presenza di Cu(I) ma può avvenire anche in sua assenza (il rame è tossico per i sistemi biologici), e che è stata applicata per ottenere bioconiugati *in vivo* [5].

Anche la formazione di idrazoni può essere impiegata per legare tra loro target biologici. Idrazoni sufficientemente stabili si possono ottenere facendo reagire un'aldeide aromatica con una funzione idrazinica aromatica (Hydralink technology, Schema 2). Le reazioni chimiche che portano alla formazione di cicli triazolici o di idrazoni procedono in condizioni di reazione blande e compatibili con molecole biologiche e possono avvenire solamente tra le funzioni chimiche opportunamente inserite sui due target biologici, A e B.

Target engagement

I probe chimici sono strumenti importanti per caratterizzare funzioni biologiche di proteine e per identificare nuovi farmaci per il trattamento di patologie. Nel processo di drug discovery si identifica un target e si ricorre a tecniche computazionali per progettare molecole che sono successivamente valutate sia sul bersaglio iniziale, mediante me-



Schema 2 - Reazione di bioconiugazione tramite formazione di un idrazone aromatico

toxiche chimico-fisiche mirate allo studio dell'interazione farmaco-recettore, sia direttamente sui sistemi cellulari/tessuti, o comunque modelli in cui il recettore si trova in un ambiente più fisiologico della soluzione di un sistema ricombinante. La sequenza di passaggi indicata non garantisce che il target rispetto al quale le molecole sono state selezionate coincida con il target prevalente all'interno della cellula né che sia proprio l'interazione con questo target a mediare/scatenare la risposta biologica osservata. È dunque sempre maggiore la necessità di caratterizzare l'interazione con il target a livello intracellulare [6].

Questo è un tipico ambito di applicazione delle tecniche di chemical biology. Lo studio del target engagement richiede la progettazione del saggio *in vitro*. Questa prevede:

- 1) l'utilizzo di target ricombinanti (proteine solubili o immobilizzate su membrane, oligonucleotidi o altro);
- 2) il design e la progettazione del ligando e l'eventuale scelta delle sonde più appropriate;
- 3) il trasferimento del sistema e la messa a punto del saggio in ambiente cellulare;
- 4) la validazione su un elevato numero di ligandi (inibitori, agonisti, antagonisti).

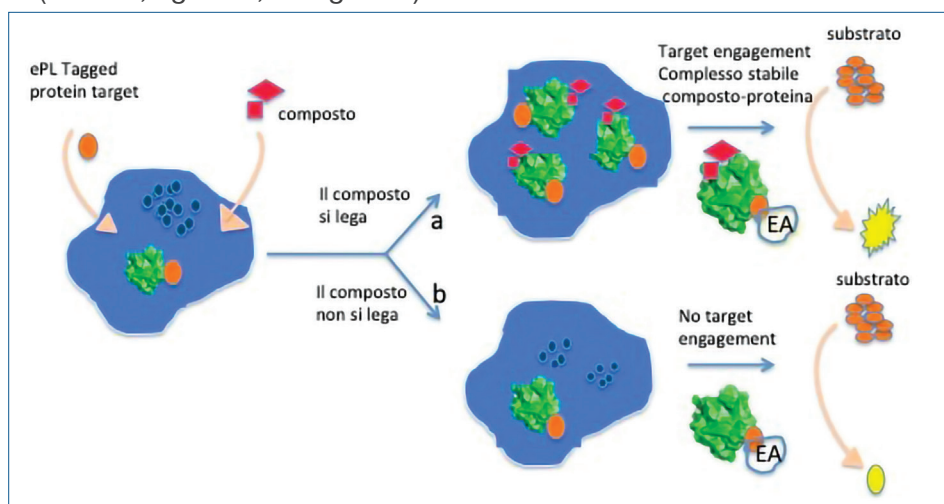


Fig. 2 - Esempio di target engagement: una proteina intracellulare è fusa con un piccolo enzima donatore di un frammento di β -galattosidasi (β -gal) definito 'enhanced ProLabel' (ePL). In seguito all'aggiunta di un composto (inibitore o agonista/attivatore) che lega il target, i livelli di proteina sono stabilizzati o alterati nelle cellule e questo cambiamento può essere monitorato misurando l'abbondanza della proteina mediante una sostanza chemiluminescente. Il reagente di rivelazione include un substrato aggiunto con un frammento di enzima accettore (EA) che si complessa naturalmente con l'ePL-tag sulla proteina target per formare un β -gal attivo. L'enzima accettore si attiva (EA-giallo) solamente quando la proteina target lega il composto (via a). L'enzima attivato idrolizza il substrato per generare una sostanza chemiluminescente il cui segnale riflette la formazione del complesso composto-recettore nella cellula. Se il composto non si lega, il segnale è basso (via b)

La Fig. 2 mostra un esempio di target engagement (InCELL Hunter Stabilized Compound-Protein Complex Assay Format) proposto dall'azienda Dscover X.

Le tecniche di rivelazione più utilizzate sono di tipo spettroscopico, particolarmente la fluorimetria. Infatti la fluorescenza, con le sue numerose proprietà (spettri di emissione e di eccitazione, anisotropia, decadimento temporale), la sensibilità di tali proprietà a variazioni del microambiente molecolare, e quindi dello stato di legame del probe, la possibilità di selezionare intervalli spettrali che minimizzino interferenze ottiche, la possibilità di utilizzare i valori d'intensità o di anisotropia per analisi quantitative di binding, offre uno spettro amplissimo di osservabili per il riconoscimento e la quantificazione del target engagement. Fra quelle basate sulla fluorescenza, grande rilievo hanno tecnologie che coinvolgono due fluorofori ed il trasferimento non radiativo di energia di eccitazione elettronica dall'uno all'altro in condizioni di prossimità spaziale, cioè in complessi ligando/proteina o proteina/proteina. La più nota e diffusa è la FRET (Förster Resonance Energy Transfer), attraverso la quale l'eccitazione ottica del fluoroforo donatore si manifesta nell'emissione di fluorescenza dell'accettore.

Una sua variante basata sulla bioluminescenza (BRET) non richiede eccitazione ottica ed è quindi caratterizzata da trascurabili interferenze e da ottimo rapporto segnale/rumore [7]. L'accoppiamento di varie misure fluorimetriche con la risoluzione spaziale della microscopia ottica (oggi anche in super-risoluzione, con il limite di diffrazione infranto per raggiungere risoluzioni confrontabili con le dimensioni delle biomolecole più grandi) offre la possibilità di produrre immagini sia statiche sia in movimento (real-time) che rivelano direttamente il target engagement a livello cellulare. Un'altra importan-

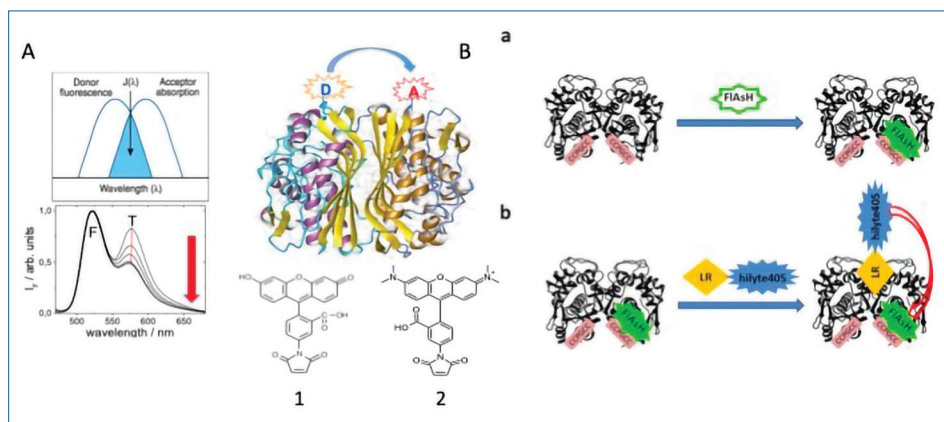


Fig. 3 - A) La proteina omodimerica timidilato sintasi viene derivatizzata alla cys43 con due sonde fluorescenti di cui una donatrice (D (1)=fluoresceina, F) ed una accettrice (A (2)=tetrametilrodammia, T). La condizione per l'osservazione di un segnale di FRET (emissione T a sinistra in basso) è che lo spettro di emissione della sonda donatrice sia parzialmente sovrapposto con lo spettro di assorbimento della sonda accettrice (spettro a sinistra in alto). Quando il dimerio si dissocia a formare i due monomeri, le due sonde si allontanano ed il segnale di FRET scompare. B) a. la proteina TS modificata col motivo tetracisteinico lega la sonda fluorescente FIAsh; b. alla cellula che contiene TS-tetracys marcata con FIAsh viene aggiunto il peptide-hilyte405 che lega TS e trasferisce energia d'eccitazione alla sonda FLAsh dando origine al segnale di FRET

te famiglia di tecnologie per il riconoscimento del target engagement in cellula è basata sull'unfolding termico delle proteine e sulla stabilizzazione rispetto a tale processo derivante dal legame con un ligando. Anche qui, le diverse tecnologie si basano su diversi osservabili. Fra queste, particolare favore sta ricevendo il Cellular Thermal Shift Assay (CETSA) che, al contrario di altre tecnologie di questo tipo, non richiede sonde (è una tecnica label-free) [7].

Il ruolo della chimica in questa fase del drug discovery è nel design di molecole specifiche che possano interagire con il target. Tali molecole possono funzionare da inibitori o ligandi che modulano l'attività recettoriale (agonisti o antagonisti) oppure possono servire per lo studio di funzioni biologiche mediante interazioni specifiche con il recettore.

Nella Fig. 3 vengono riportate alcune strutture utilizzate in studi di target engagement sia su lisati cellulari sia su cellule intere vitali.

Nell'esempio descritto a sinistra (Fig. 3A) il FRET fra due sonde, la fluoresceina come donatore e la tetrametilrodammia come accettore, è utilizzato in un test per la caratterizzazione dell'equilibrio monomero-dimero della timidilato sintasi (TS). Le

maleimmidi delle due sonde sono legate alla cisteina in posizione 43 (cys43) esposta sulla superficie della proteina in condizioni riducenti. La cisteina reagisce con il gruppo maleimmidico per attacco nucleofilo al doppio legame formando un legame -C-S-. Il 50% dei dimeri di TS porta due sonde diverse e, poiché le due cys43 si trovano a distanza molto minore della distanza caratteristica di Förster, è sede di FRET e l'eccitazione selettiva del donatore fluoresceina (350-380 nm) risulta in un rilevante contributo di emissione dell'accettore tetrametilrodammia a 580 nm (Fig. 3A) [8].

Misure di efficienza di FRET in funzione della concentrazione totale di proteina consentono la determinazione della costante dell'equilibrio dimerio/monomero della proteina. L'osservabile consente di riconoscere il legame a TS di composti in grado di favorire la dissociazione del dimerio allontanando così le due sonde e riducendo l'efficienza di FRET.

Lo stesso approccio può essere applicato allo studio dell'interazione farmaco-recettore in cellule (FR) [9]. Nell'esempio proposto in Fig. 3, la proteina TS viene modificata alla coda N-terminale mediante l'inserimento di una sequenza tetracisteinica (CCPGCC, TC) (Fig. 3B) che lega la sonda fluoresceinica arsenicale FIAsh con alta affinità attraverso il legame dell'atomo di As di FIAsh alle quattro cisteine di TC. Un inibitore peptidico di TS (LR), che si lega all'interfaccia monomero/monomero

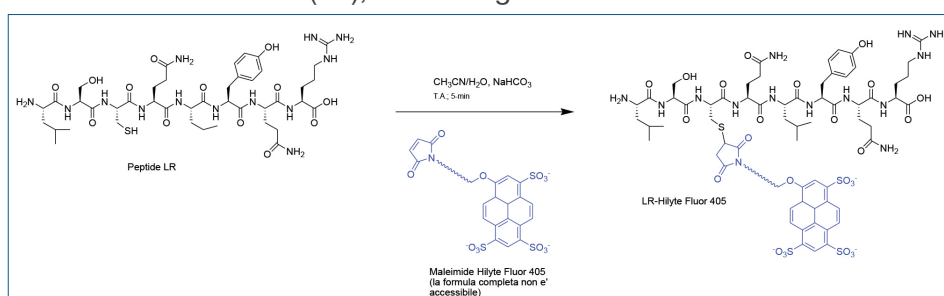


Fig. 4 - Schema della sintesi del coniugato del peptide LR-hilyte405 con la sonda hilyte405

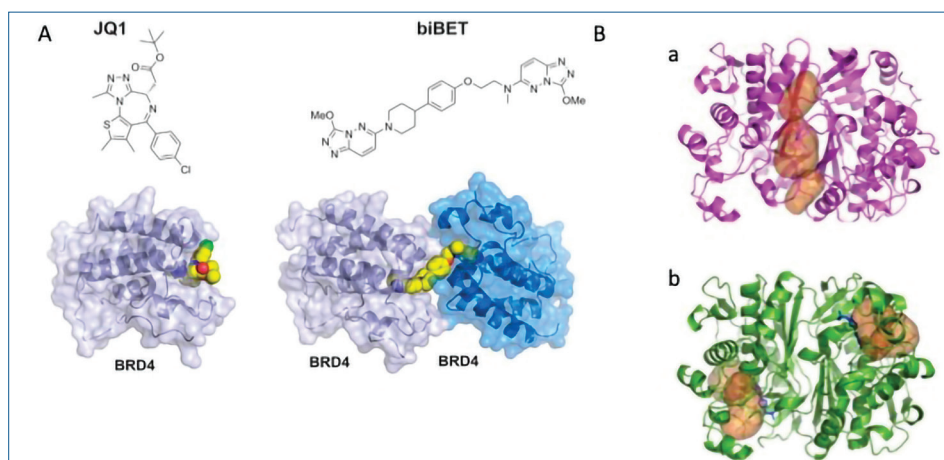


Fig. 5 - Esempio di applicazioni della CB all'indagine funzionale delle proteine: A) alcuni composti (JQ1 e biBET) che legano il dominio extra terminale (BET) della famiglia delle bromodomain proteins sono stati utilizzati sia come probe molecolari per dimostrare l'effetto di inibizione della famiglia di proteine BET che sono considerate target per cancro e infiammazione, sia per individuare inibitori da sviluppare come farmaci in progetti di drug discovery. In particolare biBET è un composto che lega due proteine target BRD4. Il modo di binding bivalente induce una potenza elevata e permette la comprensione della biologia del sistema BET/BRD4; B) strutture cristallografiche di complessi farmaco-recettore della proteina TS: a) l'inibitore si lega all'interfaccia dimerica e blocca la proteina nella forma inattiva; b) l'inibitore tradizionale si lega al sito attivo

mero della proteina con $K_d=2 \mu\text{M}$, viene coniugato con un probe (hilyte405) in grado di donare energia di eccitazione a FIAsh (Fig. 4). L'engagement di LR con TS, sia in lisati sia in cellule, si manifesta in un segnale di FRET consistente nell'emissione di fluoresceina per eccitazione preferenziale di hilyte405. La tecnica serve perciò per il design di saggi biochimici di spiazzamento di LR-hilyte405 da parte di composti che legano la proteina spostando l'inibitore peptidico che genera il segnale. L'emissione dello stesso peptide-hilyte405 è stato utilizzato per studiare il cammino di internalizzazione nella cellula tumorale [10].

Indagine proteomica dei meccanismi biologici mediante probe molecolari

I probe molecolari sono stati usati per molti anni per lo studio di target farmacologici in studi di validazione per completare quanto sviluppato mediante tecniche genetiche, quali quelle di interference RNA (RNAi) oppure, più recentemente, mediante la tecnologia CRISP [11]. Le piccole molecole si legano reversibilmente e rapidamente in modo controllato alle biomolecole target e questo può essere di supporto alle tecniche genetiche. Il loro studio permette di approfondirne il meccanismo biologico e di sviluppare farmaci interessanti. Sono stati costituiti

database importanti con una collezione di probe molecolari per lo studio di diverse funzioni biologiche specifiche non promiscue; tra tali database si segnala quella dello Structural Genomics Consortium (chemicalprobes.org).

In Fig. 5A si osservano probe molecolari come inibitori del dominio extra terminale (BET) della famiglia delle bromodomain proteins [12]. Tali composti si sono rivelati utili per lo studio della funzione delle proteine target. Un ulteriore esempio riguarda lo studio di peptidi inibitori allosterici di TS che hanno dimostrato di essere

specifici per la proteina, come evidenziato in test su lisati cellulari in cui si osserva il sequestro quasi totale del peptide da parte della proteina target [9]. Il meccanismo di inibizione allosterico consiste nella capacità dei peptidi di legarsi alla forma inattiva della proteina (Fig. 5B, in alto) [13, 14]. Inibitori noti di TS legano il suo sito attivo (Fig. 5B in basso). Due di questi peptidi (LR e LR-D-Gln⁴) sono stati valutati in uno studio di proteomica label-free mediante spettrometria di massa [14]. I peptidi sono stati somministrati alle cellule di tumore ovarico e si è studiata la modulazione delle proteine cellulari indotta dai peptidi rispetto ai controlli non trattati con l'inibitore (Fig. 6a). L'analisi dei risultati è stata condotta studiando la differenza tra le proteine dei campioni controllo rispetto a quelle dei campioni trattati, sia riguardo alla presenza/assenza di alcune proteine, che riguardo alla up- o down- regolazione. Le proteine sono state selezionate mediante studi bioinformatici (Fig. 6 b,c) e alla fine il risultato è stato validato mediante analisi di Western Blot (Fig. 6d). Questo ha permesso di confermare un set di proteine che sono associate al meccanismo d'azione dell'inibitore. Mediante questi approcci possono anche essere evidenziate nuove biomolecole mai osservate precedentemente come essere implicate in certi processi biologici e, di conseguenza, viene favorita la caratterizzazione

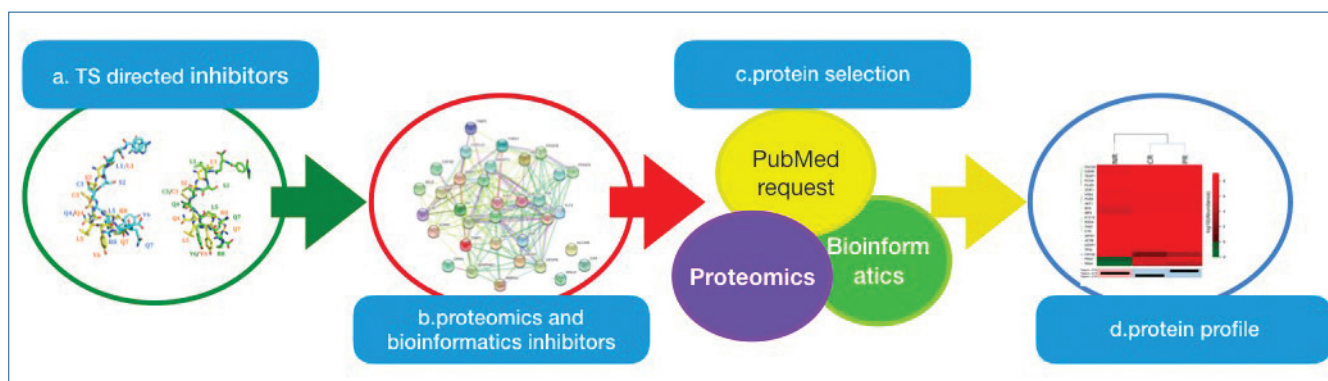


Fig. 6 - Workflow relativo al processo di studio proteomico di peptidi come modulatori allosterici di TS; a) struttura dei peptidi inibitori allosterici di TS; b) network ottenuto mediante studio bioinformatico delle proteine identificate tramite analisi di spettrometria di massa ottenuto mediante studio bioinformatico; c) selezione delle proteine; d) mappa delle proteine validate mediante Western Blot

di nuovi bersagli e ruoli biologici [1]. In Fig. 6 viene riportato il workflow relativo al processo di studio proteomico appena descritto in cui i peptidi funzionano come probe molecolari specifici per lo studio della funzione della proteina TS quando tali probe spostano l'equilibrio activeTS-inactiveTS verso la forma inattiva [14].

Conclusioni

I campi di applicazione della CB sono molteplici e la drug discovery con le sue conoscenze e i suoi strumenti può ampliare lo spazio della comprensione dei meccanismi biologici. Allo stesso tempo la CB permette una maggiore comprensione degli effetti e dei meccanismi indotti da un farmaco e sposta la visione del chimico farmaceutico da un livello essenzialmente molecolare, focalizzato sugli aspetti di interazione farmaco-recettore/recettore-patologia, ad un livello funzionale associato a una migliore comprensione dei meccanismi e stimolando così la progettazione creativa di nuove sperimentazioni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L.S. Schreiber, T. Kapoor, G. Wess (Ed.), *Chemical Biology*, v. 1-3, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- [2] L.H. Jones *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2017, **16**, 285.
- [3] *Bioconjugate Techniques*, 3rd Ed., 2013, ISBN 9780123822390.
- [4] L. Liang *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, 2011, **255**, 2933.
- [5] J.C. Jewett *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1272.
- [6] G.M. Simon *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2014, **9**, 200.
- [7] R.B. Matthew *et al.*, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 10091.
- [8] F. Genovese *et al.*, *Protein Science*, 2010, **19**, 1023.
- [9] G. Ponterini *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 27198.
- [10] G. Cannazza *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 10551.
- [11] B. Maji *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2019, **13**, 9.
- [12] M.J. Waring *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2016, **12**, 1097.
- [13] D. Chen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2017, **292**, 13449.
- [14] D. Cardinale *et al.*, *PNAS*, 2011, **108**(34), E542.
- [15] F. Genovese *et al.*, *J. Proteome Res.*, 2014, **15**, 5250.

The Molecular Game between Drug Discovery and Chemical Biology

Chemical biology is a discipline that lies near medicinal chemistry, deeply involved in the drug discovery process through the interplay between inhibitors/ligands and molecular probes. We here describe three examples of chemical biology-drug discovery, namely, strategies in the design of linkers for making bioconjugates, use of fluorescent probes in drug/target engagement investigations and application of activity-based proteomics, to the investigation of the biological mechanisms of action of specific inhibitors.