



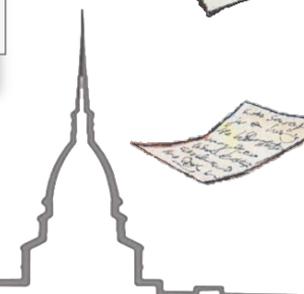
Metodologie di Sintesi e Sviluppo Farmaceutico

Synthesis and Development Pharmaceutical Methodologies

Laurea Magistrale in Chimica a.a. 2018/2019



How to measure *in vitro* the drug activity

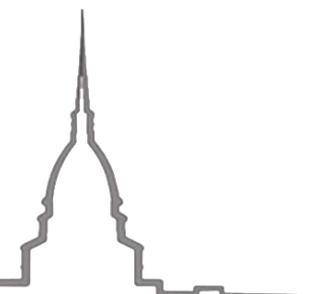


The *language of screening*

The identification of new and useful drugs depends on the **ability of scientists to discriminate between compounds that have the desired physiological effect and those that do not.**

the multidisciplinary nature of drug discovery **requires the successful interaction of individuals with diverse background and skills set.** In order for this to occur, it is necessary for all of the players in the process to have a basic understanding of the technology required for in vitro screening.

Understanding and interpreting the information developed through screening methods, high throughput or otherwise, requires an understanding of the “**language of screening.**”



Concentration Response Curves (IC_{50})

IC_{50} concentration of *hit* compound necessary to silence (inhibit) 50% of the activity effect

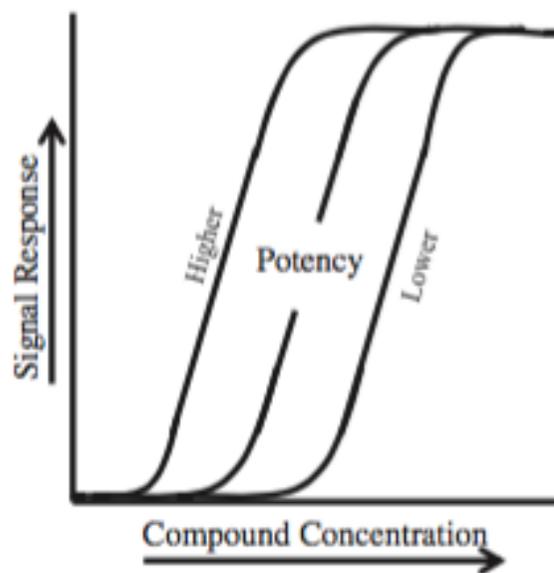
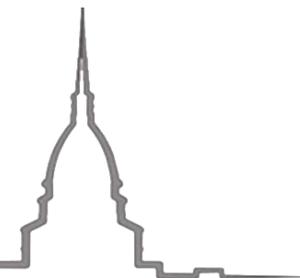
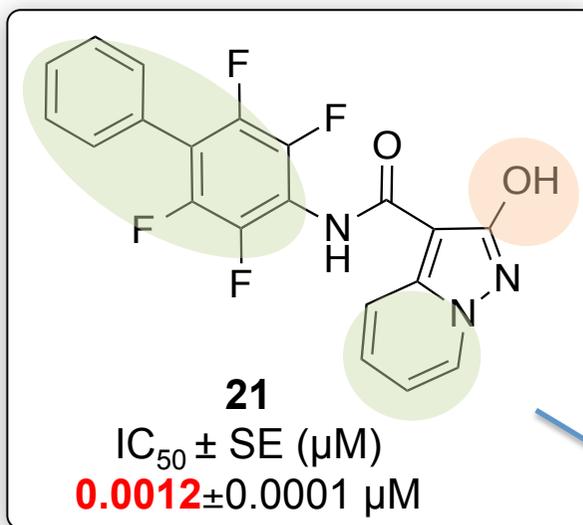
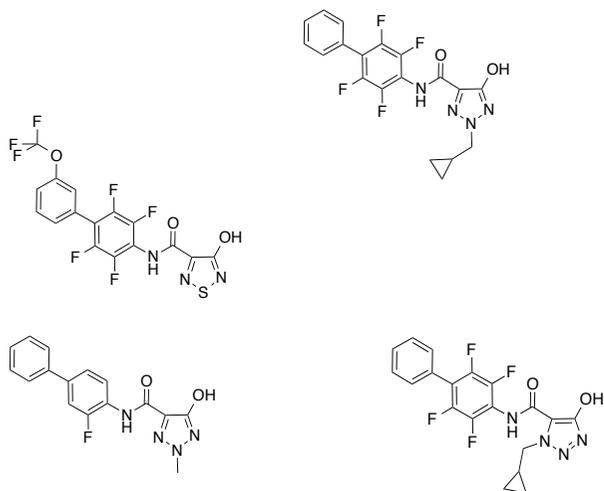


FIGURE 4.1 The relative potency of sets of compounds can be compared by determining the change in signal intensity with an increasing concentration of each compound. The curve created by plotting the concentration against the signal intensity will shift to the left as the potency increases and to the right as potency decreases. The concentration that provides 50% of the maximal response is the IC_{50} of a compound under the assay conditions employed.

They do not directly represent a compound's affinity for a macromolecular target, but rather its ability to reduce the maximum signal in a given assay by 50%



Design *h*DHODH inhibitors



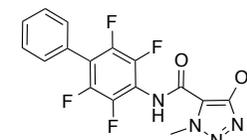
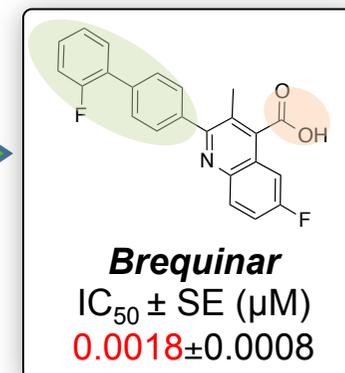
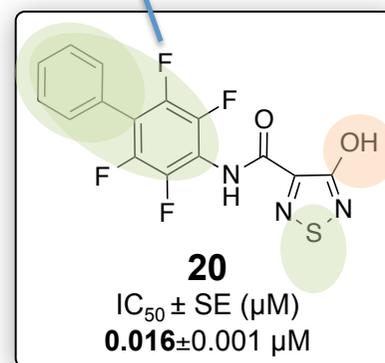
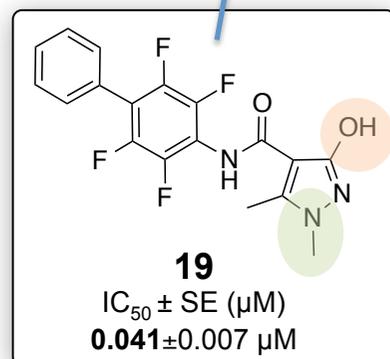
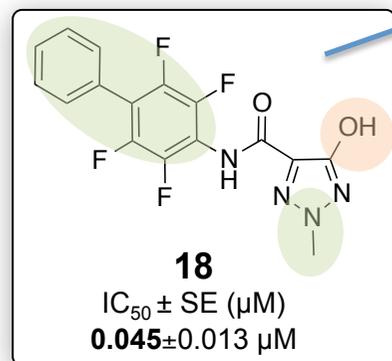
Generation

2

Cpd counter



21



Sainas S., et al *E.J. Med. Chem.* 2017, 129, 287-302
 Sainas S., et al, *JMC* 2018, submitted

Marco L. Lolli

University of Torino (UniTO)

Design *h*DHODH inhibitors

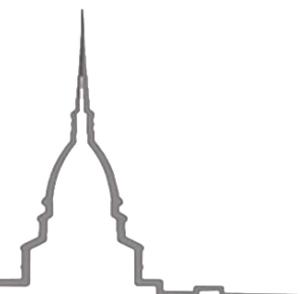
Compound	<i>h</i> DHODH ^a IC ₅₀ ± SE (μM)	Proliferation ^b IC ₅₀ ± SE (μM)	Cytotoxicity ^c (effect ≥ 30%) (μM)	Immuno-suppression ^d IC ₅₀ ± SE (μM)
Brequinar	0.0018±0.0003	0.93±0.08	45.0±2.5	4.3±0.1
Teriflunomide	0.388±0.064	43.22±1.24	53±3	54.3±3.1
18	0.045±0.013	1.88±0.06	>100	8.9±0.7
19	0.041±0.007	2.22±0.13	82.0±3.2	10.7±0.3
20	0.016±0.001	1.04±0.04	78.0±6.4	6.2±0.4
21	0.0012 ± 0.0002	0.75±0.04	60.4±1.2	0.78±0.06

a) *h*DHODH, *in vitro* assay;

b) inhibition of cell proliferation (Jurkat T cells);

c) cytotoxicity, concentration of compounds causing a significant (≥30%) cytotoxic effect (Jurkat T cells);

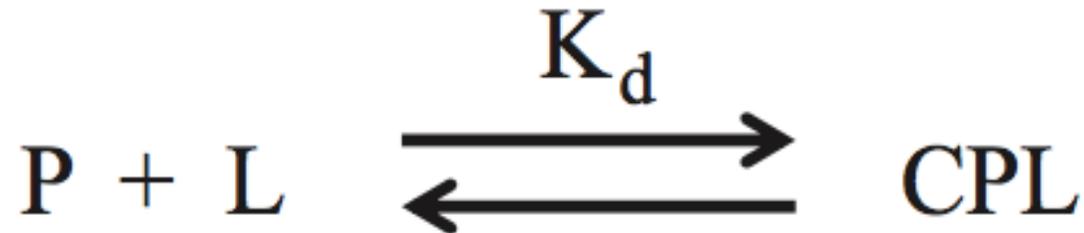
d) inhibition of proliferation of PHA-stimulated PBMCs.



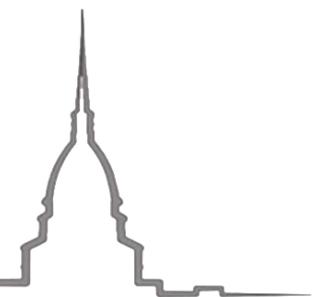
Dissociation Constants (K_d)

Binding constants are a measure of the strength of the interaction between molecules. Comparison of compound binding across multiple assay conditions is best accomplished through the use of binding constants for the **natural ligand, substrate, or inhibitor**.

The affinity of a ligand for a biomolecule is its **dissociation constant**, K_d. In the simplest scenario in which there is only one ligand binding site and no cofactors, a ligand and a macromolecule can form a complex in a reversible fashion according to reaction

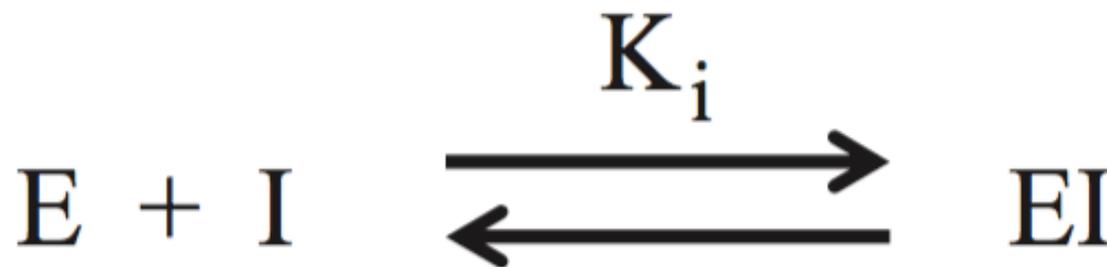


The interaction of a protein (P) with a ligand (L) to form a protein/ligand complex (CPL) is defined by its dissociation constant (K_d).



Inhibition Constants (K_i)

In a similar fashion, inhibition constants, K_i 's, for a given inhibitor of a macromolecular target can be used to compare compounds. As was the case with the natural ligand, in the simplest scenario with only one binding site and no cofactors, the interaction of an inhibitor with a target biomolecule in which the inhibitor (I) and biomolecule (E) interact to form a complex (EI).



The interaction of an enzyme (E) with an inhibitor (I) resulting in the formation of an enzyme/inhibitor complex (EI) is defined by its inhibition constant (K_i).

Main results

Compound	[³ H]AMPA IC ₅₀ (μM)	[³ H]KA K _i (μM)	[³ H]CGP39653 K _i (μM)	Distal carboxylate or its mimic pK _a
(S)-Glu	0.34	0.38	0.20	4.2
AMPA	0.039	>100	>100	4.8
(+)-HFPA	0.11	18	13	3.48
(S)-TDPA	0.065	>100	>100	5.10
15	2.9 [5.56±0.05] ^b	> 100	> 100	6.11 ± 0.02 ^c
16	1.4 [5.86±0.05] ^b	> 100	> 100	6.42 ± 0.01 ^c
17		In progress		-
18		In progress		-
19		In progress		-
20		In progress		-
NMDA	> 100	> 100	6.2	-
22	> 100	> 100	34 [4.49±0.09] ^b	-
31	> 100	> 100	37 [4.44±0.08] ^b	-

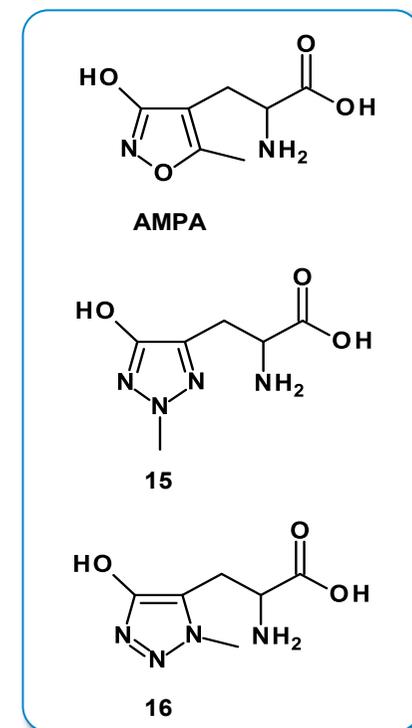


Table 1. ^a AMPA, KA, and NMDA receptors were studied using [³H]AMPA, [³H]KA, and [³H]CGP 39653 as radio-ligands, respectively. ^b Mean pIC₅₀ ± SEM (shown in brackets) and the corresponding IC₅₀ values were calculated from full concentration-response curves of three individual experiments. ^c Determined by potentiometric.

Main results

Compound	[³ H]AMPA IC ₅₀ (μM)	[³ H]KA K _i (μM)	[³ H]CGP39653 K _i (μM)	Distal carboxylate or its mimic pK _a
(S)-Glu	0.34	0.38	0.20	4.2
AMPA	0.039	>100	>100	4.8
(+)-HFPA	0.11	18	13	3.48
(S)-TDPA	0.065	>100	>100	5.10
15	2.9 [5.56±0.05] ^b	> 100	> 100	6.11 ± 0.02 ^c
16	1.4 [5.86±0.05] ^b	> 100	> 100	6.42 ± 0.01 ^c
17		In progress		-
18		In progress		-
19		In progress		-
20		In progress		-
NMDA	> 100	> 100	6.2	-
22	> 100	> 100	34 [4.49±0.09] ^b	-
31	> 100	> 100	37 [4.44±0.08] ^b	-

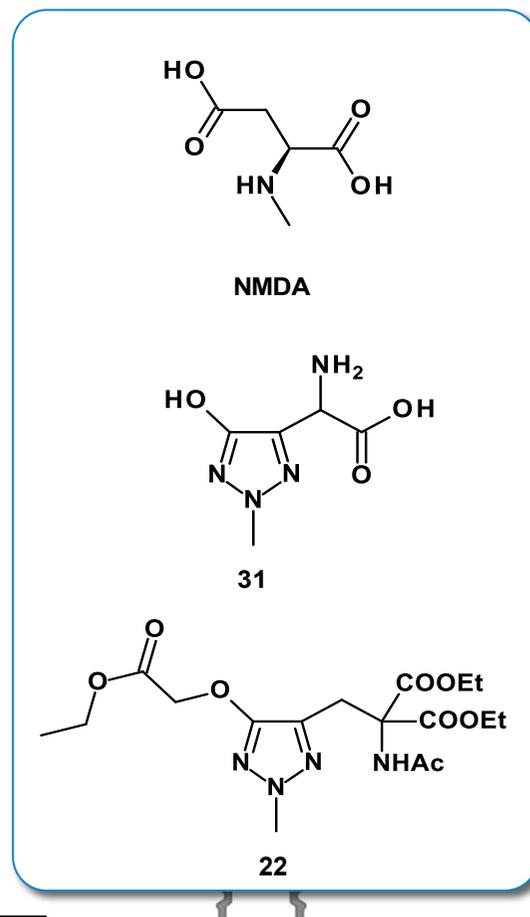
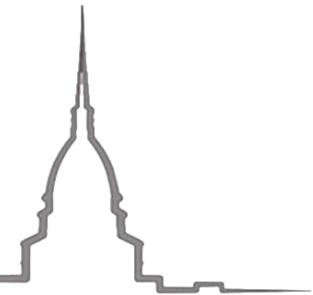


Table 1. ^a AMPA, KA, and NMDA receptors were studied using [³H]AMPA, [³H]KA, and [³H]CGP 39653 as radio-ligands, respectively. ^b Mean pIC₅₀ ± SEM (shown in brackets) and the corresponding IC₅₀ values were calculated from full concentration-response curves of three individual experiments. ^c Determined by potentiometric.

Efficacy versus Binding: EC_{50}

Binding assays insight into how well a test compound displaces a radioligand from its binding site, but provides little, if any, indication as to the functional effect of the compound.

The **readout** from a functional assay could be the amount of second messenger produced by the test compound. The concentration that produces **50%** of the maximum effect produced by the test compound is defined as its EC_{50} .



Efficacy versus Binding: EC_{50}

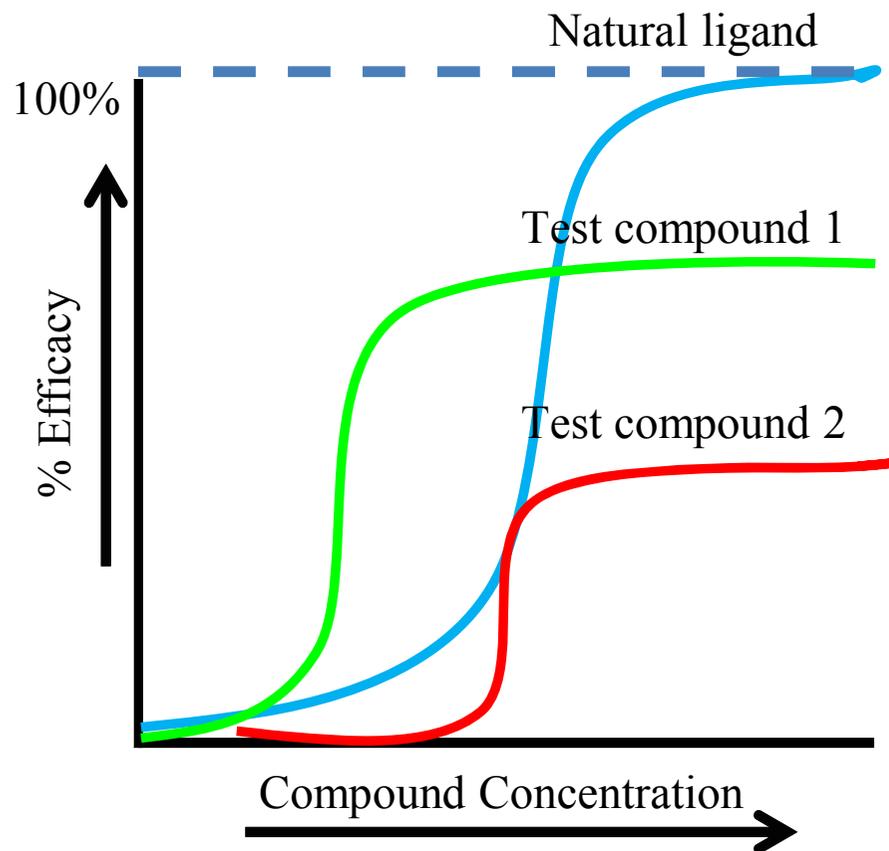
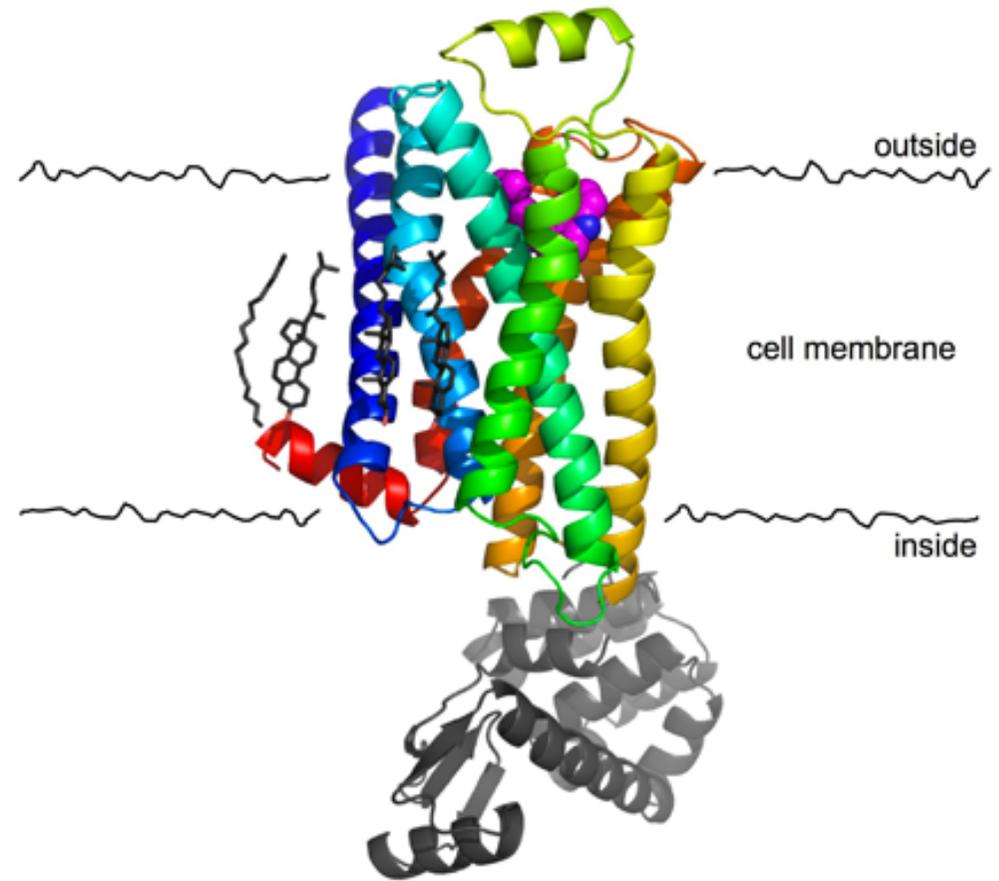


FIGURE 4.2 In the assay data portrayed, the natural ligand (blue) establishes the “100%” efficacy level for a given compound. Test compound 1 (green) has a significantly improved EC_{50} , but it does not reach 100% efficacy. Test compound 2 (red) has the same EC_{50} as the natural ligand, but is substantially less efficacious, as the maximum response is well below that of the natural ligand. Both EC_{50} and percent efficacy must be considered in determining the relative importance of candidate compounds.

Recettori come bersagli di farmaci

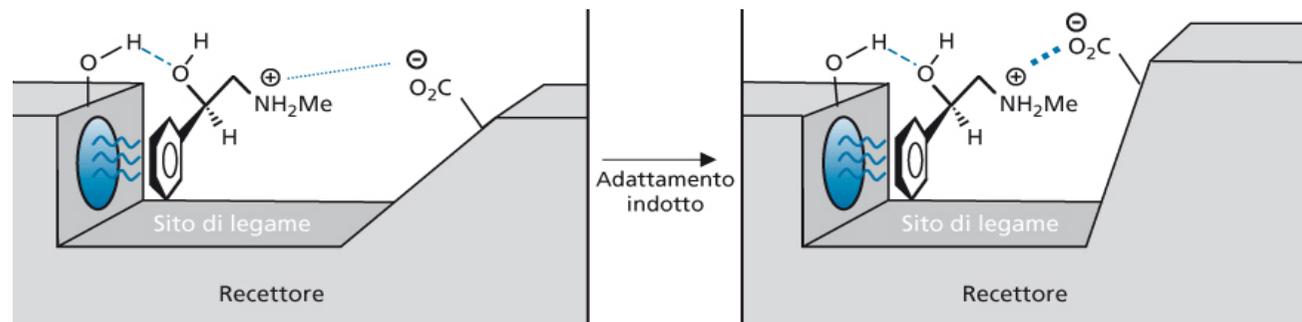
I recettori ed i loro messaggeri chimici sono cruciali per i sistemi di comunicazione dell'organismo. Quando tale comunicazione è errata può avere inizio una grande varietà di disturbi. Un problema potrebbe essere il rilascio di troppi messaggeri chimici o troppo pochi. E' a questo punto che i farmaci possono giocare un ruolo o come messaggeri sostitutivi o bloccando i recettori dal ricevere i loro messaggi naturali.

I farmaci che mimano i messaggeri naturali sono noti come **agonisti**. I farmaci che bloccano i recettori sono noti come **antagonisti**.



Agonisti

Ligando (farmaco, metabolita, neurotrasmettitore, ormone) che legandosi al recettore specifico produce una risposta biologica; determina una variazione conformazionale del recettore (adattamento indotto). Ha un'alta affinità per il suo recettore ed una attività intrinseca.

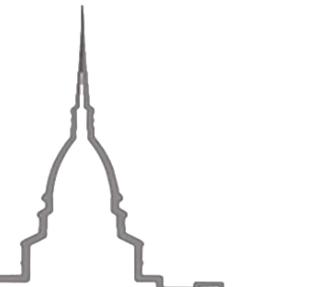


Agonista pieno:

produce il responso massimale. Ha un'alta affinità per il suo recettore ed una alta attività intrinseca.

Super agonista:

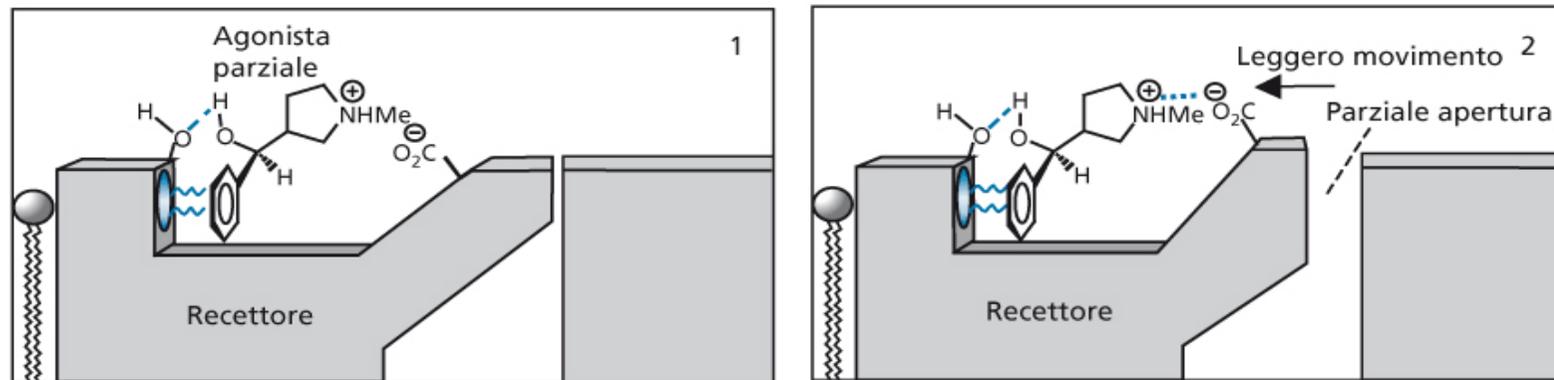
produce il responso massimale superiore a quello dell'endogeno ed una alta attività intrinseca.

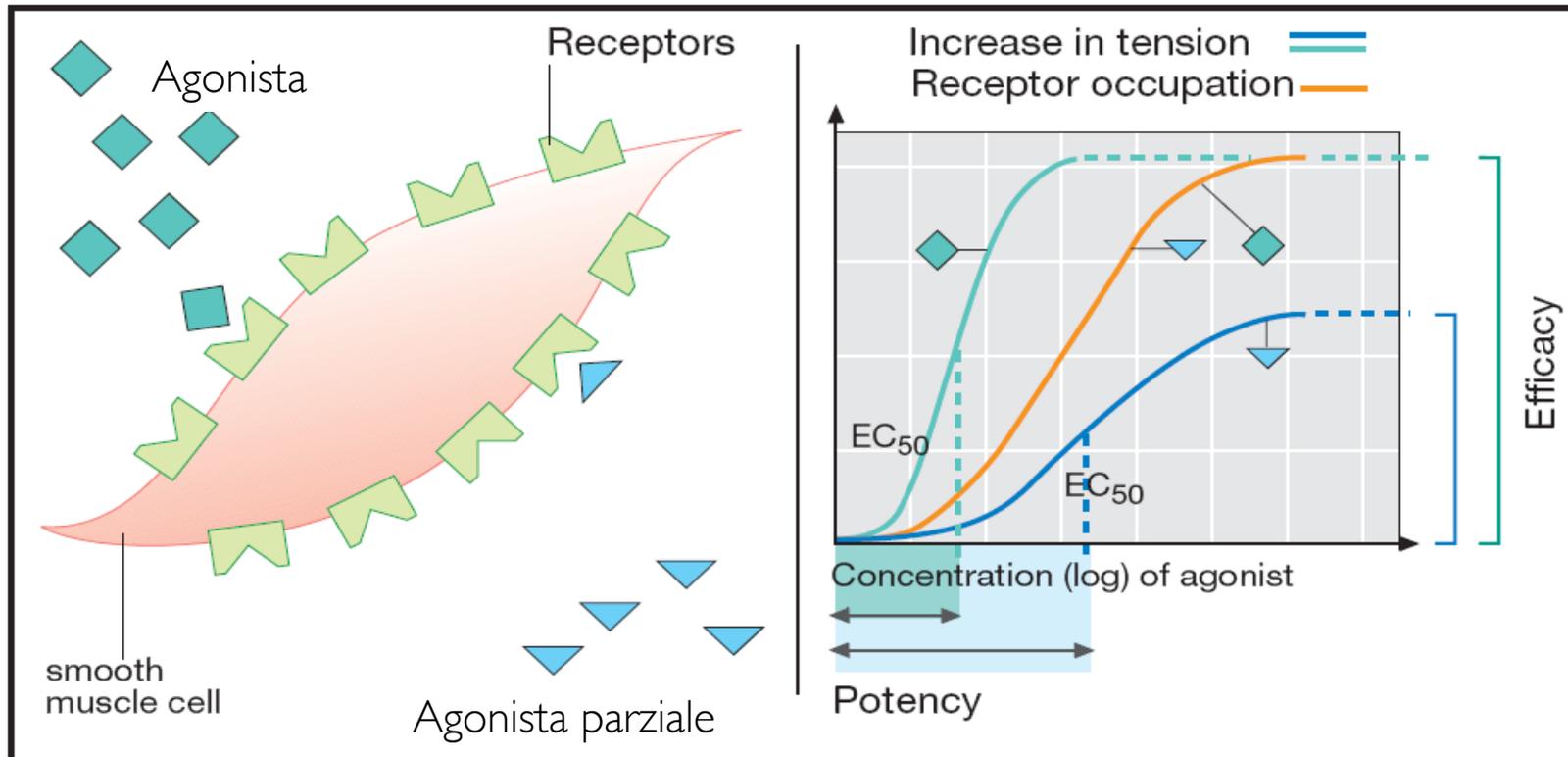


Agonisti

Agonista parziale

produce un responso che non è mai quello massimo prodotto dall'agonista pieno. Ha un'alta affinità per il recettore ed una bassa attività intrinseca.

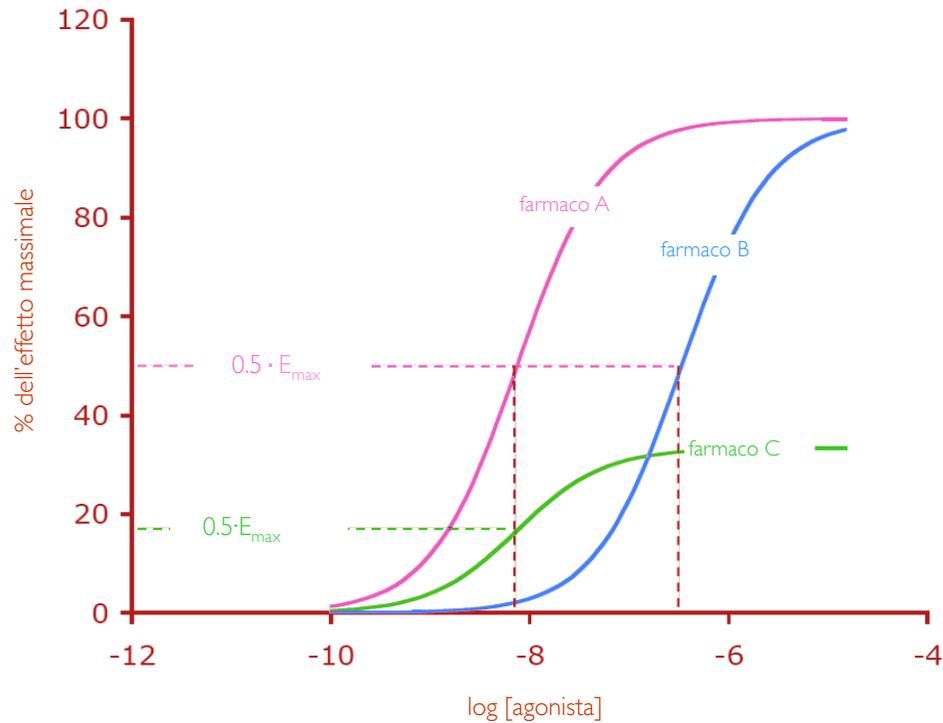




B. Potency and Efficacy of agonists

La potenza di un agonista può essere espressa in termini di concentrazione alla quale si raggiunge il 50% della risposta massimale.

L'efficacia invece è espressa come % dell'effetto massimale raggiunto.



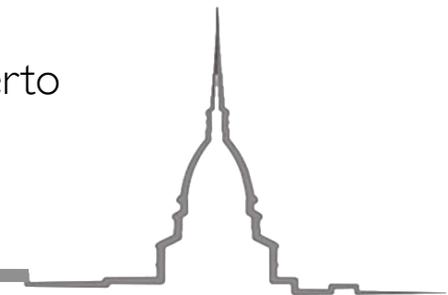
L'efficacia quantifica l'effetto massimo (E_{max}) di un farmaco.

La potenza è una misura comparativa; è rappresentata dalle diverse dosi di due farmaci necessarie per produrre lo stesso effetto farmacologico.

In questo esempio, il farmaco **A** è più potente sia di **B** che di **C**, in quanto occorre una dose maggiore di **B** e di **C** per produrre lo stesso effetto di **A**.

Per quanto concerne l'efficacia, il farmaco **A** e il farmaco **B** sono ugualmente efficaci. Il farmaco **C** invece è meno efficace del farmaco **B**, ma è più potente.

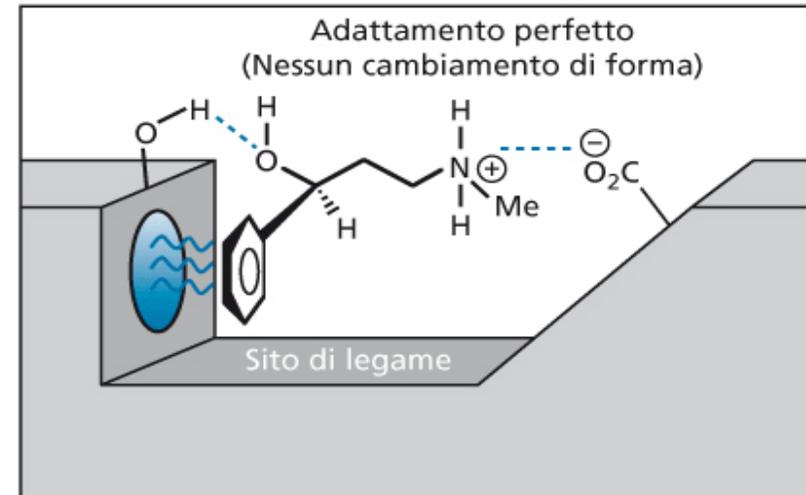
Il farmaco **A** e il farmaco **B** sono due agonisti pieni, mentre il farmaco **C** è un agonista parziale. L'efficacia è quindi una misura dell'efficienza da parte di un certo ligando nel trasdurre l'occupazione del recettore in una risposta cellulare.



Antagonisti

molecola che si adatta perfettamente al recettore ma non provoca nessun cambiamento di forma e pertanto nessuna risposta, non lo attiva. Occupando però il sito recettoriale, impedisce l'effetto di un agonista.

Si dice che ha affinità per il recettore, ma non ha attività intrinseca.



Un antagonista può essere:

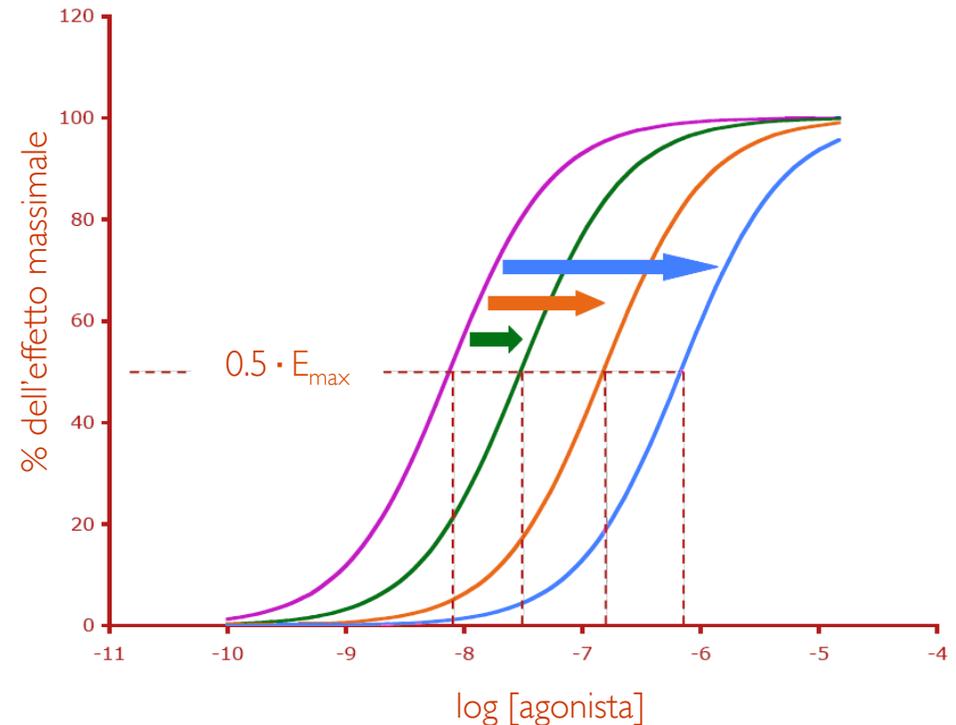
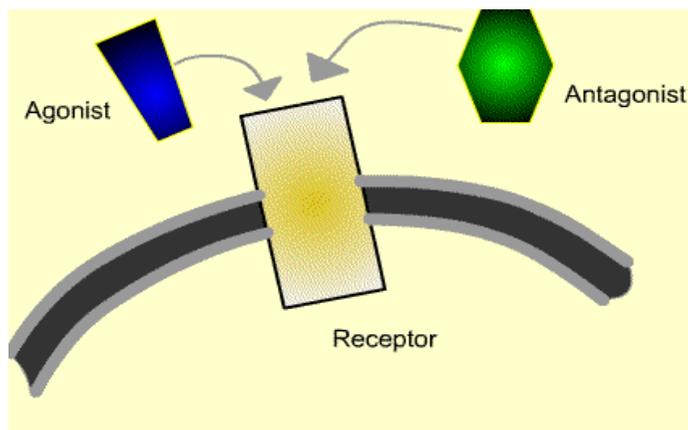
1. Reversibile Competitivo
2. Reversibile non competitivo (antagonista ALLOSTERICO)
3. Irreversibile: forma legami covalenti con il recettore.

I) Reversibile competitivo

antagonismo

compete per lo stesso sito di riconoscimento dell'agonista;

il legame con il recettore è sempre sormontabile da opportune concentrazioni di agonista. Ovvero anche se l'antagonista è presente, aumentando la concentrazione di agonista si può ripristinare l'effetto massimale. Tuttavia in presenza di antagonista, la curva dose-effetto dell'agonista è spostata verso destra, verso più alte concentrazioni.



- ◆ curva in assenza di antagonista
- ◆, ◆, ◆ curve in presenza di concentrazioni crescenti di antagonista competitivo

Analisi di Schild

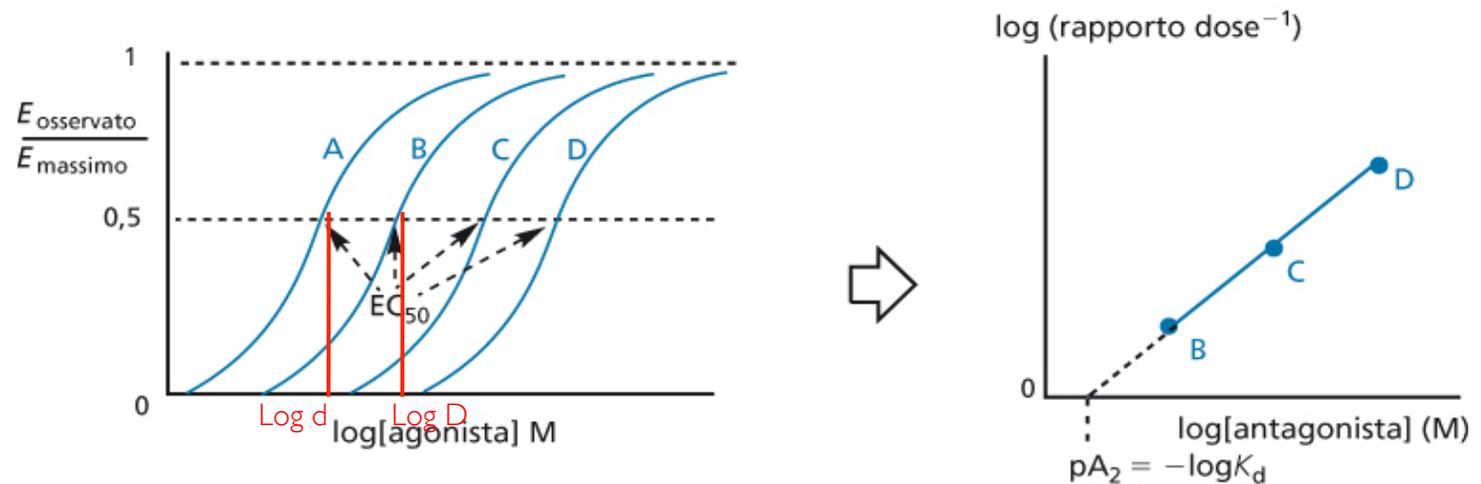
antagonismo

È utilizzata per determinare la costante di dissociazione K_d degli antagonisti competitivi. Confrontando il log del reciproco del rapporto dose ($[D]/[d]$) con il logaritmo della concentrazione dell'antagonista si ottiene una retta che interseca l'asse delle X al valore di $pA_2 (= -\log K_d)$ che rappresenta l'affinità dell'antagonista competitivo.

$$pA_2 = -\log K_d \quad \text{dove} \quad K_d = \frac{[D][R]}{[DR]} \quad D + R \rightleftharpoons DR$$

d = conc. di agonista richiesta per produrre un certo effetto in assenza di antagonista

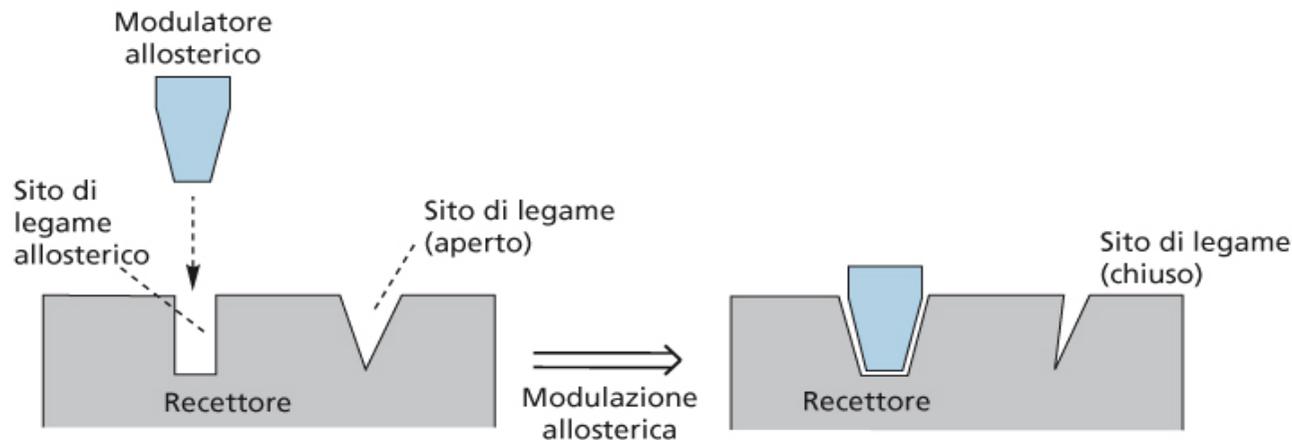
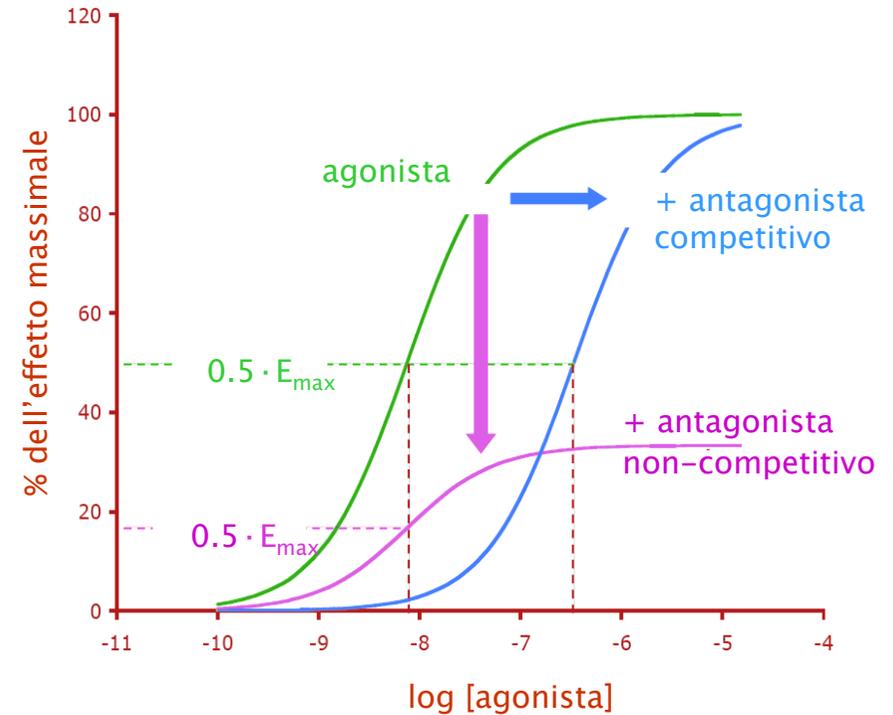
D = conc. di agonista richiesta per produrre lo stesso effetto in presenza di antagonista



Analisi di Schild. A, nessun antagonista presente; B-D, in presenza di concentrazioni crescenti di antagonista.

2) Reversibile non competitivo (Allosterico)

interagisce con un sito distinto, ma interdipendente, dal sito di riconoscimento dell'agonista e previene l'attivazione del recettore da parte



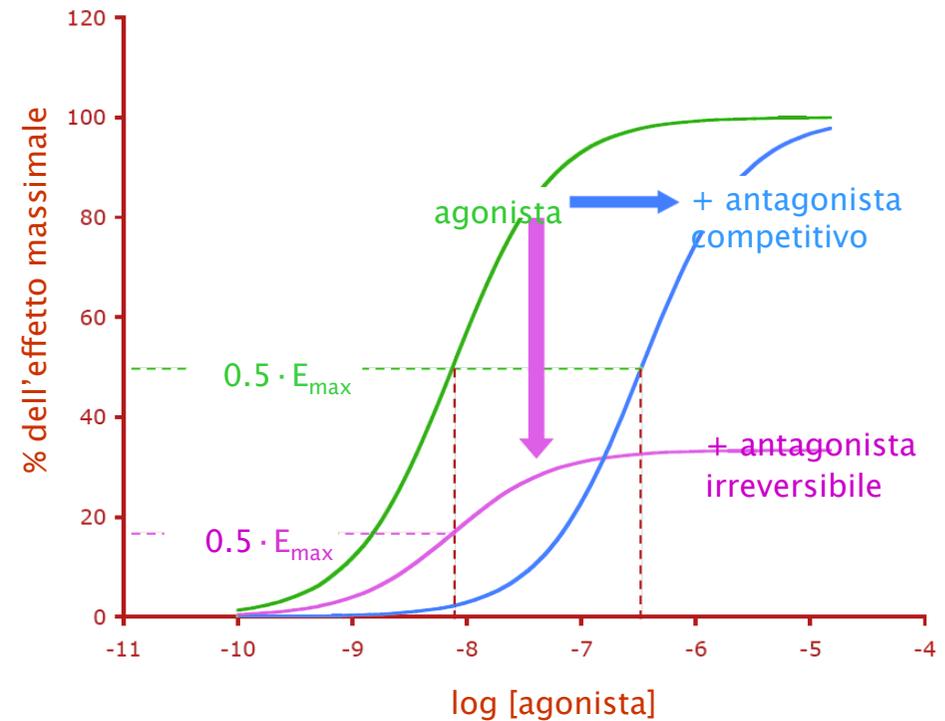
Principio attraverso cui un antagonista allosterico deforma un sito di legame.

3) Irreversibile

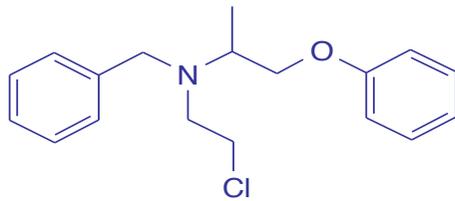
ligando che lega fortemente il recettore, solitamente perché forma con esso un legame covalente (es., fenossibenzamina).

La definizione di “irreversibile” è riferita al fatto che pur lavando ripetutamente il preparato nel tentativo di allontanare l'antagonista non è più possibile recuperare la risposta iniziale.

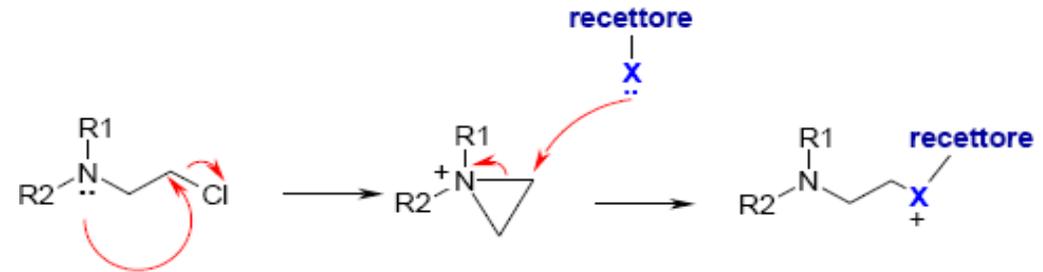
Poiché gli antagonisti irreversibili rendono una frazione dei recettori disponibili incapaci di formare complessi ligando-recettore, essi riducono la risposta massima in modo insormontabile.



Esempio:



fenossibenzamina



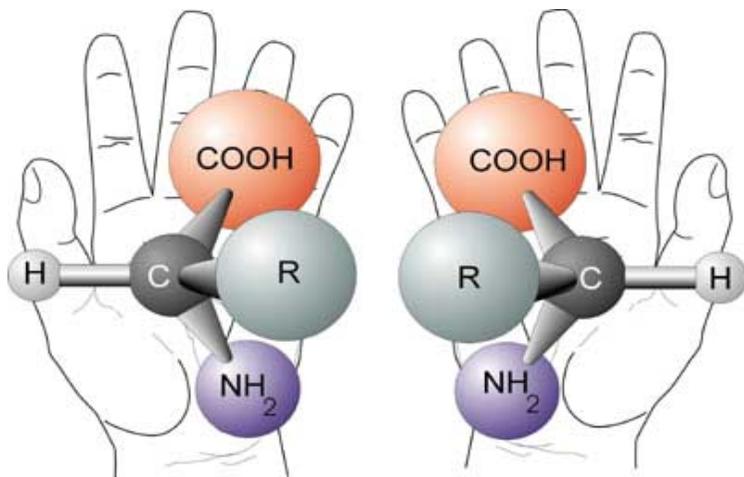
Si ritiene che agisca alchilando covalentemente la Cys36 dell'elica transmembrana 3 dei recettori α -adrenergici.

Poiché gli antagonisti irreversibili rendono una frazione dei recettori disponibili incapaci di formare complessi ligando-recettore, essi riducono la risposta massima in modo insormontabile.

Interazione stereospecifiche farmaco-recettore

Un oggetto è definito chirale se non è sovrapponibile alla sua immagine speculare.

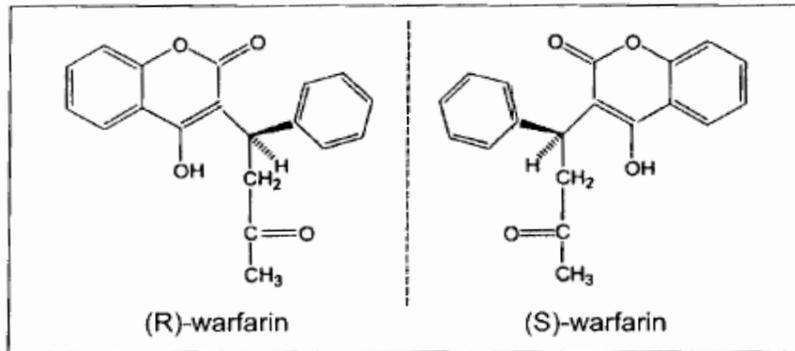
Il termine chirale deriva dalla parola greca « kheir » che significa mano. Le mani sono infatti un'ottimo esempio di chiralità. Esse sono una l'immagine speculare dell'altra, tuttavia non si possono orientare le due mani nello spazio in modo che risultino sovrapponibili.



Per i composti ad interesse farmacologico, la chiralità è dovuta, nella maggior parte dei casi, alla presenza di un atomo di carbonio tetraedrico al quale sono legati quattro atomi o gruppi diversi.

Le due forme isomeriche del composto chirale, non sovrapponibili, sono definite **enantiomeri**.

Chiralità



Gli enantiomeri hanno proprietà chimiche e fisiche uguali. Per distinguerli è necessaria un'interazione con un'entità anch'essa chirale (es. luce polarizzata).

La chiralità è molto diffusa a livello animale, in cui non è l'eccezione ma la regola.

Il comportamento farmacologico di un farmaco chirale, dal momento dell'assorbimento a quello dell'eliminazione, è determinato dall'interazione con sistemi chirali, quali le proteine, gli enzimi e i recettori.

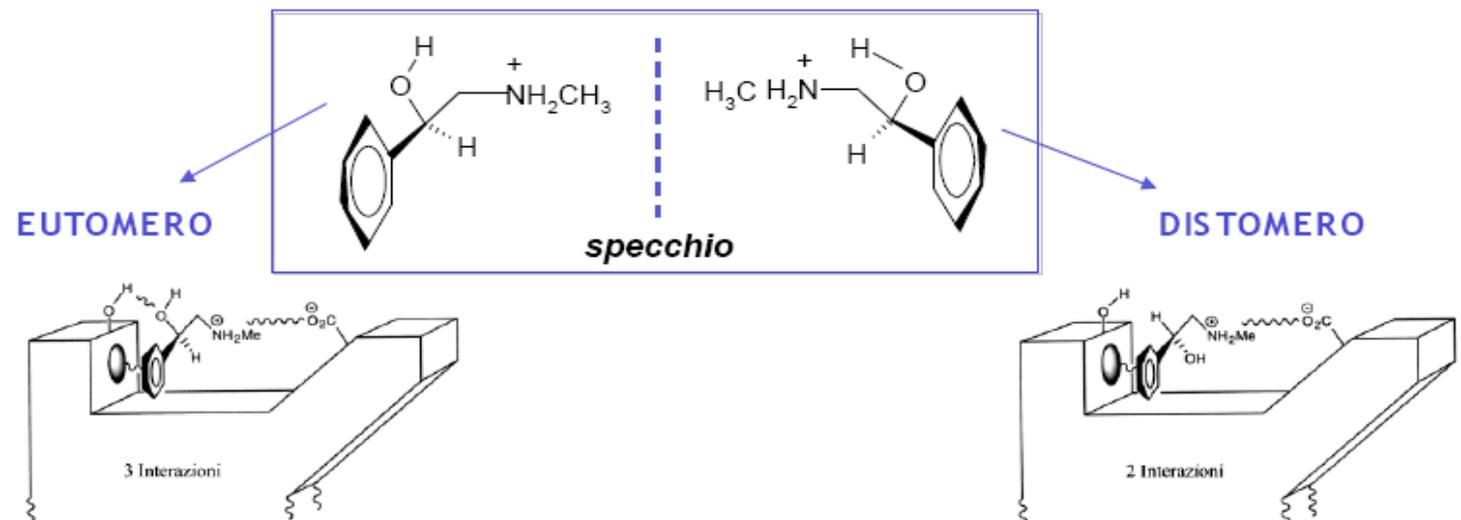
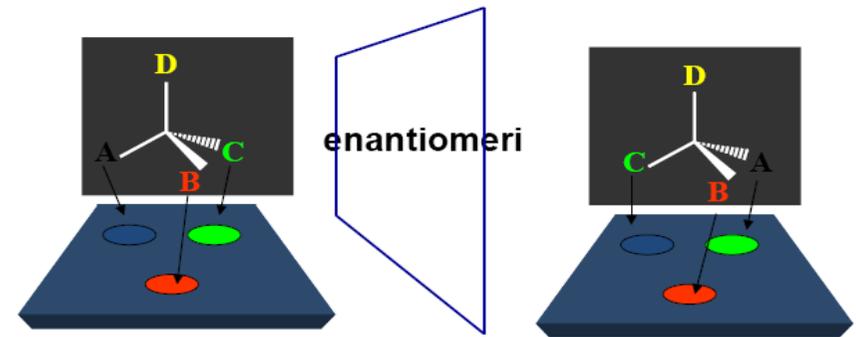
Pertanto i due enantiomeri in un ambiente chirale sono due composti diversi e come tali devono essere trattati nella caratterizzazione delle proprietà del farmaco in esame.

Chiralità

Quando uno solo di due possibili isomeri di un farmaco chirale è biologicamente attivo si dice che l'interazione farmaco-recettore è stereo-specifica.

Le interazioni farmaco-recettore sono spesso stereo-selettive: uno degli stereoisomeri può essere più attivo dell'altro.

L'isomero più attivo è detto **eutomero**, quello meno attivo **distomero**, e il rapporto tra le loro attività **rapporto eudismico**.



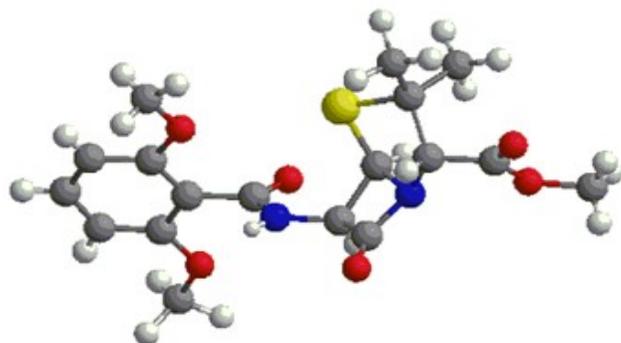
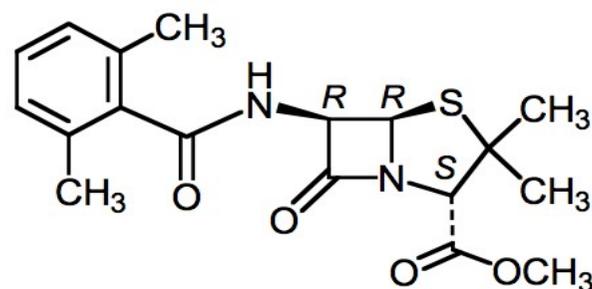
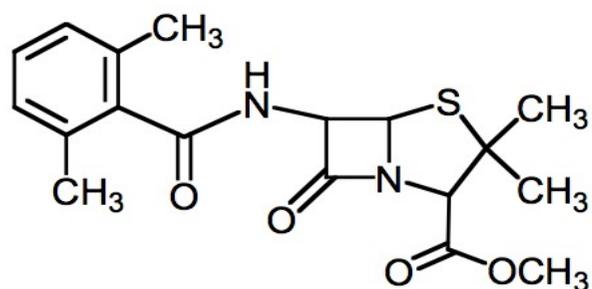
Chiralità

Possono verificarsi 6 casi:

1. Stessa attività farmacologica ma potenza diversa
 2. Solo l'eutomero è attivo
 3. Possono essere entrambi attivi ma solo uno è tossico
 4. Attività diversa per i due enantiomeri
 5. Attività opposta
 6. Un enantiomero riduce gli effetti collaterali dell'altro
-

Principio attivo	categoria	Effetti nocivi
(-) talidomide	Immunomodulatore e antiangiogenico	Malformazione embrione in donne in gravidanza ⁷
(-) ibuprofene	FANS	Inattivo
D-Dopa	Anti-Parkinson	Inattivo
L-sucrosio	Dolcificante	Non metabolizzato
L-penicillamina	Antiartrite	Tossico
(+) Warfarin	Anticoagulante	Inattivo
(S) Propranololo	B-bloccante	Tossico
(R) Vigabatrin	Antiepilettico	Altamente tossico
Acido S-tiaprofenico	FANS	Inattivo
(+) Tramadolo	Analgesico	Nausea e vomito
(+) Tiroxina	Ormone	Inattivo
(S) Fluibuprofene	FANS	Inattivo
(+) Metadone	Analgesico	Inattivo
(+) Morfina	Analgesico	Inattivo
(-) Tetramisolo	Antielmintico	Inattivo
(+) Verapamil	Calcio antagonisti	Inattivo

I farmaci si utilizzano molto spesso come isomeri ottici puri poiché gli isomeri meno attivi o inattivi non contribuirebbero all'efficacia del medicinale ma eventualmente solo alla sua tossicità (zavorra). Circa 11 % i farmaci usati a stereochimica definita negli anni '80, 50 % quelli negli anni '90.



Formula di struttura della meticillina metilestere dove non è specificata la configurazione dei centri chirali: si intende la miscela racemica.