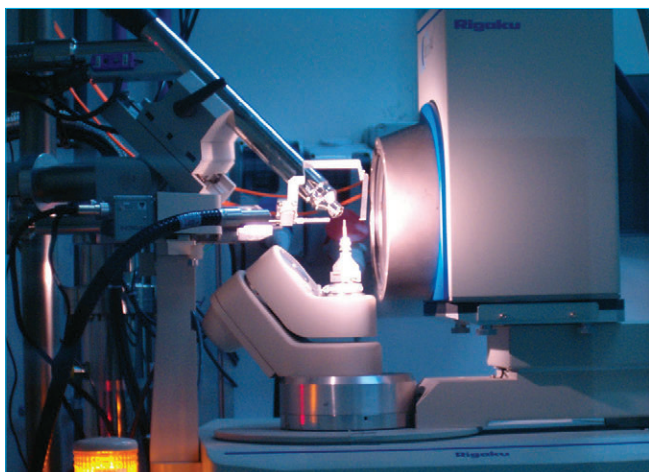




BIOCRISTALLOGRAFIA: PASSATO, PRESENTE E FUTURO NEL DRUG DISCOVERY

Lo sviluppo di agenti terapeutici (Drug Discovery) per il trattamento e la prevenzione delle malattie svolge un ruolo fondamentale nella medicina, migliorando così la salute dell'uomo, nonché l'incremento dell'aspettativa di vita. La biocristallografia odierna, come parte integrante del processo scientifico di Drug Discovery, combinata con le altre tecniche di biologia strutturale, in un'ottica multidisciplinare, fornisce una potente piattaforma per combattere vecchie e nuove minacce per la salute dell'uomo attraverso la creazione di nuovi farmaci.

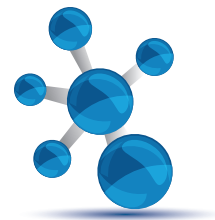


Lo sviluppo di agenti terapeutici per il trattamento e la prevenzione delle malattie ha svolto per molti anni un ruolo fondamentale nella medicina. In effetti, l'uso di estratti naturali per scopi medicinali risale a migliaia di anni fa. Tuttavia, è stato solo nell'ultimi sessant'anni che la ricerca di nuovi farmaci, attraverso differenti tecniche sperimentali, è passata allo sviluppo di nuove molecole di sintesi con applicazioni diagnostiche e farmacologiche,

anche per rispondere alle esigenze di miglioramento della salute dell'uomo e contribuire all'aumento dell'aspettativa di vita.

La storia della scoperta di farmaci nell'industria farmaceutica e/o nei laboratori accademici nell'ultima metà del ventesimo secolo mostra una progressione, iniziata poco dopo che "farmaci miracolosi", come la penicillina, sono diventati, dopo la seconda guerra mondiale, disponibili a tutti. Questo periodo, coincide anche con lo sviluppo della sintesi di chimica organica, creando la possibilità che la preparazione su larga scala di farmaci "non naturali" diventi fattibile anche economicamente. Inoltre, la sintesi chimica offriva la promessa che se un farmaco poteva essere progettato, avrebbe potuto essere prodotto. Passarono ancora alcuni anni, prima che la biologia si mettesse al passo, fornendo le informazioni più dettagliate - a livello molecolare - necessarie per farlo.

Man mano che la sintesi diventava progressivamente più sofisticata, assumeva un ruolo di primo piano nello sviluppo di farmaci e, in particolare, anche nel perfezionamento o nell'ottimizzazione



dell'attività dei farmaci noti. Nonostante questi successi, la scoperta di nuovi farmaci selettivi e specifici, rimaneva ancora estremamente difficile. Un'altra rivoluzione stava iniziando nello stesso periodo, innescata dalla disponibilità commerciale di spettrometri straordinariamente potenti (specialmente spettroscopia di risonanza magnetica nucleare - NMR - e spettrometria di massa - MS) e delle tecniche di separazione (la cromatografia liquida ad alta prestazione-HPLC) per determinare parametri strutturali di esigue quantità di prodotti naturali, biologicamente attivi.

Successivamente, l'attenzione della ricerca iniziò a spostarsi dalla ricerca *random* di prodotti naturali attivi, a un nuovo approccio computazionale "razionale" per il *drug discovery*, vale a dire la progettazione di farmaci assistita da computer e software dedicati. Questo processo fu guidato, non solo dai drastici aumenti della potenza del computer nei primi anni Ottanta, ma anche da significativi progressi simultanei nella biologia strutturale. In particolare, la cristallografia delle proteine a raggi X, ovvero la biocristallografia, ha fornito un flusso continuo di nuove strutture proteiche su cui basare gli studi computazionali per la progettazione di farmaci (*drug design*).

Con l'avvento della biologia strutturale nel processo di *drug discovery* (Fig. 1), i chimici avevano ora l'opportunità di utilizzare informazioni strutturali dettagliate al fine di progredire nei risultati dello *screening* dei possibili candidati farmaci. Special-

mente la biocristallografia a raggi X ha dimostrato di essere uno strumento prezioso in questo senso, essendo in grado di fornire informazioni strutturali, quasi complete, anche sull'interazione del ligando con un target farmacologico.

L'evoluzione della biocristallografia

La biocristallografia iniziò a svilupparsi a metà degli anni Trenta, quando fu evidente che i *pattern* di diffrazione dei raggi X da cristalli di macromolecole [1] contenevano informazioni strutturali, che potevano essere tradotte in modelli atomici di esse [2]. Diverse pietre miliari hanno segnato la storia della biocristallografia (spesso riconosciute anche dal Comitato per il Premio Nobel: quarantacinque sono stati assegnati per contributi collegati direttamente o indirettamente con la cristallografia) e diverse novità si intravedono nel futuro. Per la sua complessità e l'interdisciplinarietà, la biocristallografia ha diversi *colli di bottiglia*:

- il modo in cui i target macromolecolari sono selezionati, progettati e caratterizzati;
- la cristallogenesi e la gestione dei vari parametri fisici e biologici, che incidono sulla cristallizzazione, la crescita e l'ottimizzazione dei cristalli;
- i metodi per l'analisi dei dati e la determinazione della struttura tridimensionale (3D) delle macromolecole.

La biocristallografia ha beneficiato indubbiamente delle tecnologie di sequenziamento, di espressione di proteine e di sintesi degli acidi nucleici, in modo

da disporre sia del materiale da cristallizzare sia delle informazioni chimiche da utilizzare, successivamente, nelle mappe di densità elettronica, nella procedura nota come il "*model building*".

Nel corso degli anni, con il crescente numero di strutture cristalline risolte, la biocristallografia, ha raggiunto la sua età matura, integrandosi anche con le altre tecniche di determinazione strutturale di macromolecole (NMR, calcolo, spettrometria di massa

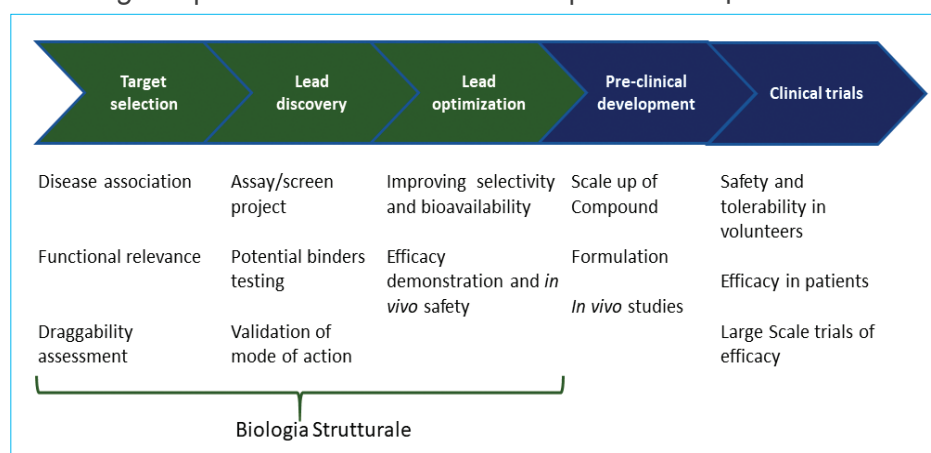


Fig. 1 - Il percorso concettuale seguito lungo il drug discovery, dove la biologia strutturale (principalmente la biocristallografia) è ampiamente utilizzata nelle fasi di lead discovery e quello di lead optimization

ecc.), in quella che viene definita biologia strutturale. In quest'ottica, anche per la ricchezza di dati provenienti dalla genomica, ha contribuito da metà degli anni Novanta, allo sviluppo della genomica e della proteomica strutturale. Queste discipline si basano su un approccio di *high-throughput* sistematico, mirato a determinare rapidamente l'insieme di strutture codificate da genomi selezionati o coinvolti in specifiche funzioni o percorsi biologici. La determinazione della struttura 3D di una biomolecola si può descrivere in cinque passi principali (Fig. 2). Il primo riguarda la scelta, più appropriata, della macromolecola *target*, la sua clonazione, espressione, purificazione e valutazione della purezza in termini di omogeneità chimica e conformazionale.

I prossimi tre passi riguardano la cristallizzazione e la caratterizzazione dei cristalli ottenuti, facendo uso di approcci di multidisciplinari. Nello specifico (i) la ricerca delle condizioni iniziali di cristallizzazione mediante delle strategie di *trial-and-error*, (ii) l'ottimizzazione della qualità del cristallo, e (iii) la valutazione delle proprietà di diffrazione dei cristalli, come la risoluzione, la mosaicità e l'isotropia. Il passo finale è quello di determinazione e analisi della struttura 3D. Nonostante tutta l'esperienza acquisita, un progetto di ricerca nella biocristallografia può essere rallentato, spesso anche bloccato, in ciascuno di questi passaggi e il superamento spesso richiede inventiva e sforzi notevoli.

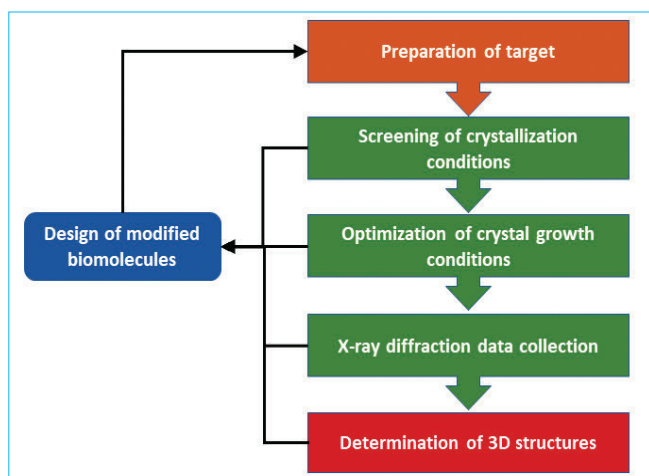


Fig. 2 - Biocristallografia, il percorso per determinare la struttura tridimensionale di una biomolecola

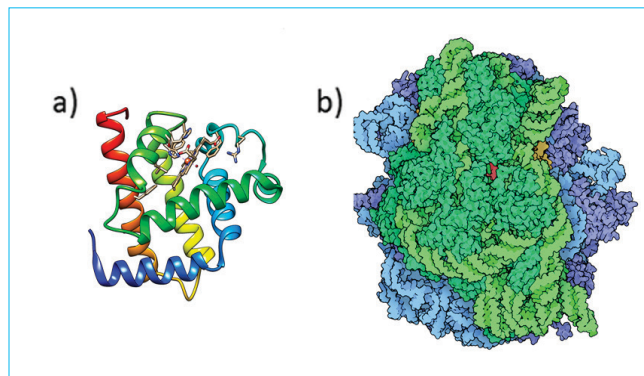


Fig. 3 - Presentazione grafica (UCSF Chimera v1.14) di a) la proteina di mioglobina (codice PDB 1MBN) e del ribosoma 70S (codice PDB 4V5D)

Dalla piccola alla grande molecola

I passi da gigante fatti della biocristallografia, negli ultimi sessant'anni, si possono apprezzare nella Fig. 3, confrontando la struttura 3D di mioglobina di 1260 atomi (risolta nel 1958) con quello di un ribosoma di 296.724 atomi (risolta nel 2009).

Nelle prime proteine risolte, l'iniziale difficoltà fu la mancanza di metodi adeguati per la risoluzione strutturale, in particolare, per superare quello che in cristallografia è noto come il *problema della fase* [3]. Nella terminologia cristallografica, per questa ragione, si usano termini come risolvere la struttura (ottenere la struttura 3D di una molecola) e *phasing* (*strappare* l'informazione della fase dai dati sperimentali - le intensità). Nello stesso momento un'altra difficoltà è apparsa, vale a dire, come far crescere "buoni" cristalli di macromolecole *biologicamente attive*. A questo proposito, due scoperte metodologiche furono essenziali. La prima si è verificata alla fine degli anni Sessanta e fu l'implementazione di *micro-metodi*, che permettevano la cristallizzazione delle biomolecole tramite test di saggi (*trials*) in un volume nell'intervallo 10-50 μ l (con un ridotto consumo del campione). La seconda svolta è arrivata nei primi anni Novanta con lo sviluppo di *kit di screening*, che permettono di esplorare rapidamente vari parametri e combinazioni di solventi di cristallizzazione [4]. Queste due scoperte insieme all'uso di tecniche di biologia molecolare per la preparazione dei campioni, la disponibilità di strutture di calcolo (computer sempre più potenti) e di sorgenti quali quelle di luce di sincrotrone, diedero un cambio di passo della biocristal-



lografia, mettendola in grado di risolvere strutture di biomolecole sempre più grandi e complesse.

Definire un target macromolecolare appropriato e cristallizzarlo

Nella biologia strutturale, il successo è spesso determinato dall'appropriata scelta della molecola *target*. A seconda del target biologico da studiare, diverse sono le strategie di *drug discovery*. Da un lato, quando l'obiettivo è risolvere una struttura 3D di una biomolecola, di interesse biologico, l'origine tassonomica della macromolecola è meno critica della sua cristallizzabilità. In questa situazione, l'origine biologica diventa anche una variabile nella cristallizzazione. D'altra parte, quando l'obiettivo è risolvere la struttura di una biomolecola specifica per un organismo, per esempio quello umano, per motivi farmacologici, la cristallizzabilità può diventare un vero collo di bottiglia, rendendo necessario un grande sforzo per produrre un *target* adatto per la cristallizzazione. La cristallizzazione, di solito, inizia con approcci sia di tipo *trial-and-error*, sia semi-razionale di screening. Quando viene trovata una prima condizione valida di cristallizzazione, il passo successivo è quello di perfezionare i vari parametri di cristallizzazione, in modo da ottenere cristalli di migliore qualità per gli esperimenti di diffrazione.

Migliorare i metodi

Nell'era delle prime proteine risolte [5], la determinazione della struttura era ancora molto empirica. La prima svolta arrivò con lo sviluppo di un robusto metodo di *phasing*, basato sull'introduzione di atomi pesanti nei cristalli. Questa procedura è chiamata sostituzione isomorfa singola/multipla (SIR-MIR). Questo approccio ha condotto ai modelli atomici di mioglobina ed emoglobina

all'inizio degli anni Sessanta [2, 6], rimanendo ancora oggi in uso, in varie forme. Infatti, questo metodo è stato la chiave per il *phasing* di dati di diffrazione di cristalli di ribosoma [7]. Naturalmente, lo sviluppo, in concomitanza, di sistemi di calcolo informatico (la combinazione computer e software) è stato fondamentale. Gli anni Novanta hanno portato un cambiamento radicale nella biocristallografia. Il primo importante sviluppo fu il congelamento dei cristalli, a circa 100 K, in un flusso di azoto liquido, un metodo già noto in chimica e introdotto in biologia con i cristalli di ribosoma. Questa tecnica permetteva di mantenere più stabili i cristalli di proteina durante la raccolta dati. In secondo luogo, l'accesso alla luce di sincrotrone, ha aumentato drasticamente la costruzione in tutto il mondo di nuove strutture di terza generazione. La disponibilità di radiazioni intense con la possibilità di variare la lunghezza d'onda facilitarono lo sviluppo di un nuovo metodo di *phasing*, la dispersione anomala ad una o più lunghezze d'onda (SAD-MAD) [8, 9]. La combinazione di tutti questi metodi è alla base dell'esplosione di dati 3D nel PDB (*Protein Data Bank*), che si è verificata a metà degli anni Novanta (Fig. 4). L'aumento del numero di strutture 3D, con nuovi tipi di *foldings*, nel

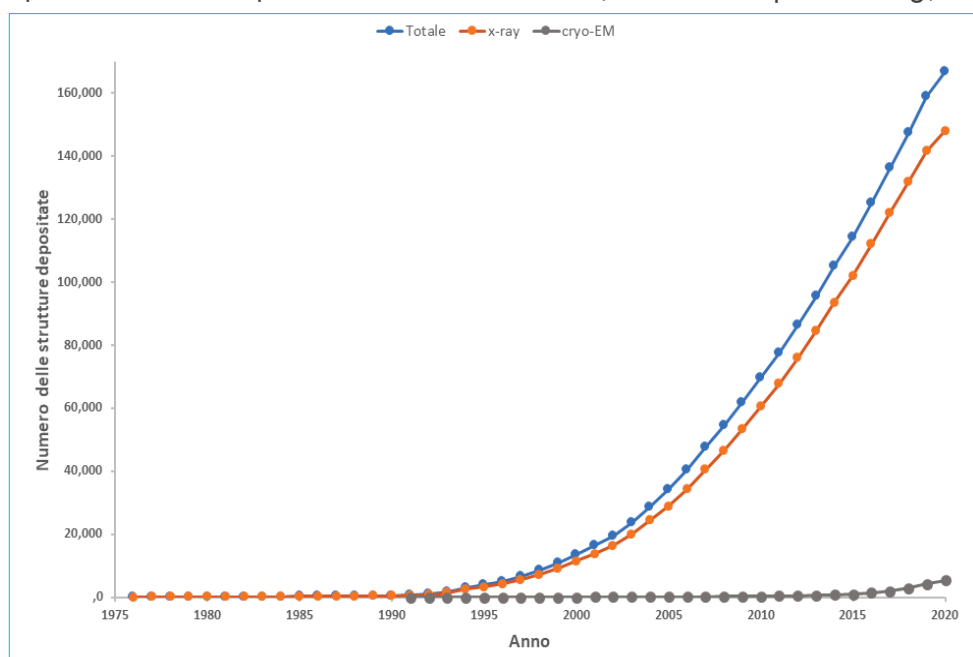


Fig. 4 - Illustrazione della crescita del contenuto nel PDB (<https://www.rcsb.org/>), dal 1975. La curva per le strutture risolte dalla comunità dei cristallografi (in color arancione) dimostra il contributo enorme dato dalla biocristallografia

PDB ha aumentato l'efficacia di un'altra tecnica di *phasing*, il metodo della sostituzione molecolare MR [10, 11]. Oggi disponiamo di software eccezionali per un *global phasing* delle biomolecole [12-14], combinando i metodi sopracitati con altre tecniche di calcolo e di *imaging*.

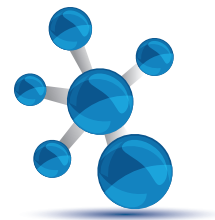
Altre scoperte, derivanti da progressi metodologici, diedero un'ulteriore spinta alla biologia strutturale. Una di queste tecniche è, senza dubbio, la microscopia crio-elettronica (cryo-EM) [15]. Questa tecnica ha una lunga storia, essendo stati necessari oltre quarant'anni di lavoro, dedicato alla comunità di biologia strutturale, per sviluppare una miriade di progressi tecnologici (rilevatori, automazione, software e altro), che hanno reso possibile la moderna cryo-EM, consentendo in questo modo di accrescere in modo significativo il numero delle strutture di biomolecole risolte ad alta risoluzione (Fig. 4). Dalla combinazione di cryo-EM con la biocristallografia, ma anche con altre tecniche come la diffusione di raggi X a basso angolo (small-angle X-ray scattering-SAXS), la dinamica molecolare (un metodo di simulazione al computer per l'analisi dei movimenti fisici di atomi e molecole) e il *modeling*, nuove problematiche biologiche stanno ora avendo risposte. A titolo di esempio, ora è possibile ottenere delle istantanee ad alta risoluzione di ribosomi funzionali, durante la fase di iniziazione o l'allungamento della sintesi proteica [16], avere dei dettagli strutturali sulla regione intracellulare delle proteine coinvolte nel trasporto di magnesio nelle cellule umane [17], effettuare studi delle proteine/complessi proteici, coinvolti nei meccanismi molecolari delle malattie genetiche rare [18-20]. Inoltre, queste tecniche sono ancora oggi essenziali per la determinazione della struttura di altri grandi assiemi, quali i virus [21, 22]. Attualmente, la determinazione della struttura di un target molecolare può generalmente essere effettuata in pochi mesi, quando avrebbe richiesto anni se non decenni, in passato. Tuttavia, il punto di partenza, per ogni progetto di biocristallografia, rimarrà sempre un buon cristallo che diffrange.

Le nuove "vecchie" sfide

Con l'evoluzione della biocristallografia, anche le domande rivolte ad essa si sono drasticamente

evolute. Il fatto che sia ora possibile ottenere dati di diffrazione di raggi X di alta qualità, da un singolo cristallo di dimensioni nel *range* di decine di micron, ha cambiato notevolmente gli obiettivi. Si deve sempre ricordare che quarant'anni fa, un'analisi strutturale di una biomolecola, richiedeva molti cristalli di dimensione di qualche mm. Oggi, con gli sviluppi metodologici e delle strumentazioni, invece, è possibile utilizzare anche pochi e piccoli cristalli - tranne che per la diffrazione di neutroni - per poter studiare proteine di membrana, lipoproteine, proteine non strutturate, grandi complessi RNA o nucleoproteine e altri complessi. Proteine intrinsecamente non strutturate o le proteine con regioni disordinate rappresentano, ancora oggi, una vera sfida. Un'altra domanda è decriptare i cambiamenti cinematici nelle strutture macromolecolari in *azione*, in altre parole lo sviluppo di una cristallografia *time-resolved*, ovvero di una "biologia 4D", dove la quarta dimensione è il tempo. Un approccio più diretto sarebbe l'acquisizione di informazioni 3D transitorie nel cristallo. Questo sogno dei cristallografi era già stato testato sperimentalmente alla fine degli anni Ottanta, fornendo mappe di densità elettronica da dati di diffrazione a raggi X (in geometria Laue), raccolte nel range del millesimo di secondo [23]. Recentemente, metodologie sofisticate per la cristallografia *time resolved* sono state validate con successo con numerosi modelli di enzimi [24]. Con la prossima generazione di sorgenti luminose a raggi X e con nuovi strumenti, si può prevedere un futuro fiorente per la cristallografia *time resolved*, non solo per l'enzimologia, ma anche per ottenere una visione cinematografica dei processi macromolecolari. Approcci ibridi che uniscono biocristallografia con cryo-EM, NMR, SAXS, biofisica e metodi computazionali continueranno a migliorare e la loro importanza nella biologia strutturale e nel *drug discovery* senza dubbio aumenterà [21].

La biocristallografia odierna, combinata con le altre tecniche di biologia strutturale, in un'ottica multidisciplinare, fornisce una potente piattaforma per l'ideazione di nuovi farmaci con la possibilità di screening di ligandi nel cristallo [25], fornendo dati preziosi 3D per combattere nuove minacce come i virus patogeni emergenti [26, 27].



Conclusioni

Lo sviluppo degli agenti terapeutici del futuro coinvolgerà chiaramente le stesse discipline scientifiche di base, che sono sempre state al centro della scoperta dei farmaci (Fig. 1), vale a dire la biologia strutturale per fornire informazioni sui *target biologici*, la chimica per progettare e sintetizzare i candidati di un farmaco, e la farmacologia per determinare gli effetti dell'interazione tra il farmaco e il *target*. Portare la scoperta di nuovi farmaci al livello successivo potrebbe richiedere un approccio completamente nuovo, ma più probabilmente deriverà dall'introduzione nel processo di drug discovery di nuove discipline e/o tecnologie notevolmente migliorate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.D. Bernal, D. Crowfoot, *Nature*, 1934, **133**, 794.
- [2] J.C. Kendrew, G. Bodo *et al.*, *Nature*, 1958, **181**, 662.
- [3] D. Sayre, in *Science of Crystal Structures*, I. Hargittai, B. Hargittai (Eds.), Springer International Publishing, Cham, 2015, pp. 3-18.
- [4] J. Jancarik, S.-H. Kim, *J. Appl. Cryst.*, 1991, **24**, 409.
- [5] M.F. Perutz, in *Methods in Enzymology*, Elsevier, 1985, pp. 3-18.
- [6] M.F. Perutz *et al.*, *Nature*, 1968, **219**, 29.
- [7] A. Yonath *et al.*, *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography*, 1998, **54**, 945.
- [8] W. Hendrickson, *Science*, 1991, **254**, 51.
- [9] C. Giacovazzo, D. Siliqi, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2004, **60**, 73.
- [10] P. Evans, A. McCoy, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2008, **64**, 1.
- [11] R. Caliandro *et al.*, *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography*, 2009, **65**, 512.
- [12] M.D. Winn *et al.*, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2011, **67**, 235.
- [13] D. Lieschner *et al.*, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2019, **75**, 861.
- [14] M.C. Burla *et al.*, *Journal of Applied Crystallography*, 2007, **40**, 609.
- [15] *Nat. Methods*, 2016, **13**, 1.
- [16] E. Villa *et al.*, *Proc. of the National Academy of Sciences*, 2009, **106**, 1063.
- [17] P. Giménez-Mascarell *et al.*, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**, 6279.
- [18] D. Siliqi *et al.*, *Crystals*, 2018, **8**, 109.
- [19] P. Stepensky *et al.*, *Journal of Medical Genetics*, 2017, **54**, 558.
- [20] P. Roversi *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, **114**, 8544.
- [21] A.C. Steven, W. Baumeister, *Journal of Structural Biology*, 2008, **163**, 186.
- [22] D. Wrapp *et al.*, *Science*, 2020, **367**(6483), 1260.
- [23] J. Hajdu *et al.*, *Trends in Biochemical Sciences*, 1988, **13**, 104.
- [24] D. Bourgeois, A. Royant, *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, **15**, 538.
- [25] T.L. Blundell *et al.*, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2006, **361**, 413.
- [26] M. Bollati *et al.*, *Antiviral Research*, 2010, **87**, 125.
- [27] B. Chen *et al.*, *Sig. Transduct. Target. Ther.*, 2020, **5**, 89.

Biocrystallography: Past, Present e Future in Drug Discovery

The development of therapeutic agents (Drug Discovery), for the treatment and prevention of diseases plays a fundamental role in medicine, by improving the human health as well as the increase in life expectancy. The modern biocrystallography, as an integral part of the scientific process of Drug Discovery, combined with other structural biology techniques, in a multidisciplinary perspective, provided a powerful platform to combat old and new menaces to human health through the creation of new drugs.