Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
132° (2015), Vol. XXXVIII, Parte II, pp. 275-281

MARIO BRUFANI *

In ricordo di Alessandro Ballio

Ringrazio la Professoressa Emilia Chiancone, Presidente dell'Accademia delle Scienze detta dei XL, per avermi invitato ad illustrare brevemente i rapporti di collaborazione scientifica e di amicizia che ho avuto con il Prof. Alessandro Ballio. Premetto che Alessandro Ballio è stato per me soprattutto un amico e, quindi, lo chiamerò semplicemente Sandro, come facevano tutti i suoi amici. Con Sandro abbiamo avuto collaborazioni scientifiche, collaborazioni organizzative e gestionali e, soprattutto, rapporti umani.

Per quello che riguarda le collaborazioni scientifiche, abbiamo interagito principalmente su due progetti. Il primo è stato quello della fusicoccina (Fig. 1), per il quale ho collaborato limitatamente, determinando con altri Colleghi la struttura cristallografica di questa fitotossina di grande interesse per Sandro.

Il secondo progetto, per me di grande importanza dal punto di vista professionale, ha riguardato la semisintesi di un antibiotico, ideato in collaborazione con un'industria farmaceutica italiana e poi sviluppato dalla stessa. Per questo progetto Sandro mi ha dato importanti suggerimenti e aiuti indiretti.

Relativamente alla fusicoccina, altri Colleghi hanno parlato e parleranno estensivamente del lavoro svolto dal gruppo di Sandro su questa importante tossina vegetale [1]; io voglio, invece, evidenziare alcuni aspetti umani della collaborazione. Quando Sandro venne nel Centro di Strutturistica Chimica del CNR, successivamente intestato a Giordano Giacomello, nel quale io lavoravo, aveva già per la fusicoccina un'ipotesi di struttura, scaturita da studi chimici e spettroscopici, ma voleva per essa una ulteriore conferma.

In quel periodo (anni 1967-1968) la determinazione delle strutture per via cristallografica richiedeva ancora molto tempo e molto lavoro. L'intensità delle macchie di diffrazione ai raggi X da parte di un cristallo singolo della sostanza venivano

* Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università degli Studi «La Sapienza», Roma.
E.mail: mario.brufani@alice.it

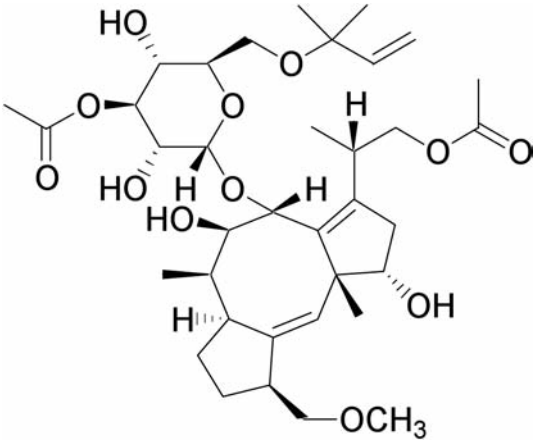

Fig. 1. Fusicoccina.

ancora lette a occhio su lastre fotografiche, usando scale di riferimento arbitrarie. La fusicoccina aveva uno spettro con circa 1.700 riflessi di diffrazione misurabili. Inoltre, gli sviluppi in serie di Fourier dei dati spettrali, che permettevano di tracciare le mappe di densità elettronica della molecola, venivano eseguiti con calcolatori lenti e con scarse capacità di calcolo. In più, come avviene di frequente, le prime mappe di densità elettronica della fusicoccina erano poco risolte e non permettevano di individuare subito l'intera molecola. I calcoli iterativi eseguiti successivamente, hanno permesso di individuare senza ombra di dubbio l'intera struttura, che coincideva con quella precedentemente ipotizzata da Sandro. Potete immaginare la soddisfazione di tutto il gruppo, ma soprattutto di Sandro, di fronte a questa importante conferma sperimentale. La determinazione della struttura della fusicoccina, oggetto del lavoro anche di altri gruppi, veniva indiscutibilmente attribuita a Sandro ed al suo gruppo. La pubblicazione del lavoro sulla struttura della fusicoccina, che comprendeva sia gli studi chimici e spettroscopici, che quelli cristallografici, ebbe degli aspetti particolari, che mi hanno coinvolto personalmente e che ritengo utile ricordare. Sandro non voleva pubblicare il lavoro su riviste inglesi e americane perché temeva che potesse filtrare in anticipo qualche dato, potenzialmente utile agli altri gruppi di ricerca che lavoravano sullo stesso argomento. Decidemmo, di comune accordo, di pubblicare il lavoro sulla rivista svizzera *Experientia.* Per assicurarci una rapida pubblicazione ricorremmo all'aiuto del Prof. Vladimir Prelog, Premio Nobel per la Chimica e allora Direttore del Dipartimento di Chimica Organica del Politecnico di Zurigo (ETH). Io avevo fatto parte del gruppo del Prof. Prelog per circa due anni e mezzo. In quel periodo Sandro venne in Svizzera due volte. La prima a Zurigo e durante questa visita ebbe un incontro cordiale con Prelog. Ci ritrovammo poi tutti, a distanza di circa un anno, alla *Bürgenstock Conference.* Bürgenstock è

una splendida località sul lago di Lucerna, fuori stagione un po' triste. La conferenza era ad invito e con un numero di partecipanti limitato. La situazione era ideale per familiarizzare. In quell'anno l'atmosfera divenne ancora più familiare per uno scherzo, ben riuscito, organizzato dai Professori Dreiding e Prelog, due giganti della chimica. Successivamente Prelog fu nominato anche membro dell'Accademia Pontificia delle Scienze, mantenendo sempre buoni rapporti con gli amici romani. Pertanto, anche grazie all'interessamento di Prelog, il lavoro sulla fusicoccina fu pubblicato rapidamente, senza che trapelasse all'esterno alcuna informazione prima della stampa su *Experientia* [2]. In questo modo la struttura della fusicoccina è rimasta indiscutibilmente legata al nome di Sandro e del suo gruppo.

Ai tempi del lavoro sulla fusicoccina, Sandro venne nel mio laboratorio, accompagnato da un borsista tedesco, il Dr. K. Rauer, che lavorava con Sandro presso il Fermentatore Pilota dell'Istituto Superiore di Sanità su problemi correlati all'acido 6-amminopenicillanico [3]. Il Dr. Rauer, collaborando con R. Pfleger e E. Garthe, aveva ottenuto, per condensazione degli α-idrazoni degli acidi acetil-gliossilici, dei composti azotati, probabilmente con carattere aromatico, di formula bruta **I**, per i quali i ricercatori tedeschi avevano ipotizzato come possibili le strutture **II** e **III** senza riuscire, però, a confermarle con certezza (Fig. 2) [4].

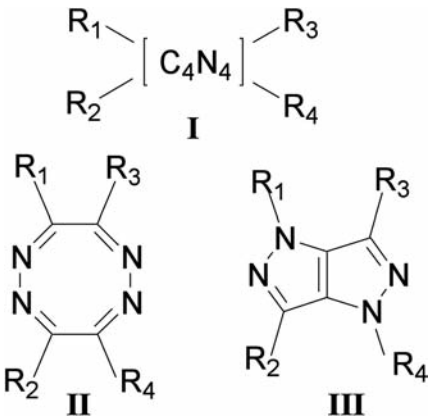

Fig. 2.

A sua richiesta determinammo la struttura cristallografica di uno di questi composti. Il lavoro in questo caso fu molto veloce, perché a differenza della fusicoccina, il composto dei ricercatori tedeschi aveva un peso molecolare basso. La struttura che risultò dall'analisi cristallografica era del tutto imprevista. Indubbiamente la sostanza aveva carattere aromatico; la planarità della molecola e le distanze di legame non lasciavano alcun dubbio in tal senso. Si trattava, però, di una struttura nella quale l'aromaticità richiedeva una separazione di carica tra i 4 atomi di azoto che essa conteneva; due dovevano avere un eccesso di elettroni (N^-) e due un difetto

(N^+). Si trattava, pertanto, di uno dei primi composti mesoionici (poi ne sono stati sintetizzati altri) con parziale carattere ionico per il quale era possibile scrivere le strutture di risonanza **IV** (Fig. 3) [5, 6].

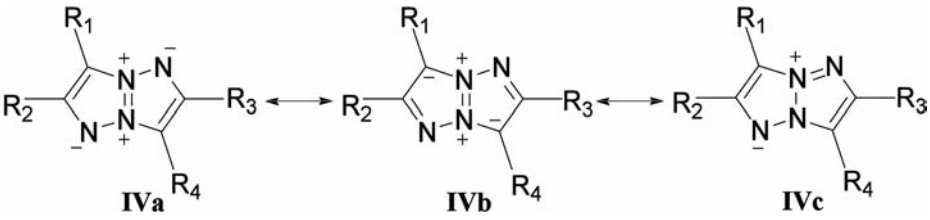

Fig. 3.

Circa 12 anni dopo questo episodio, stavo affrontando, in collaborazione con un'industria farmaceutica italiana, un problema di ricerca farmaceutica nel settore degli antibiotici. Avevamo ipotizzato di modificare la struttura dell'antibiotico antitubercolare rifampicina (Fig. 4), per renderla non assorbibile e quindi utilizzabile come disinfettante intestinale.

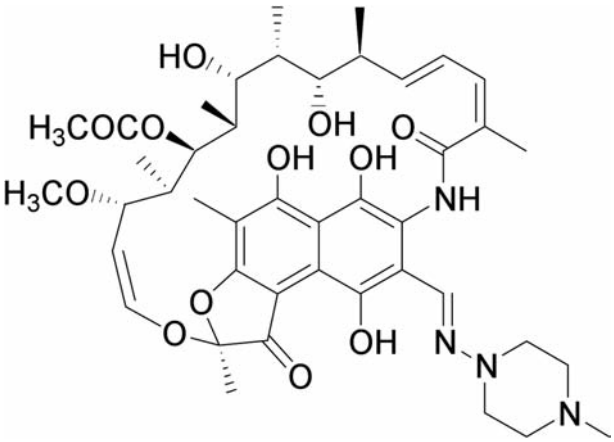

Fig. 4. Rifampicina.

La rifampicina è un antibiotico antitubercolare scoperto nei laboratori dell'industria farmaceutica italiana Lepetit. Si riteneva che questo antibiotico avesse definitivamente sconfitto la tubercolosi; purtroppo sono poi emersi, come accade con tutti gli antibiotici, ceppi di micobatteri della tubercolosi resistenti ad essa. La condizione di non assorbimento da noi ipotizzata era drastica; perché il nuovo antibiotico potesse essere usato come disinfettante intestinale, la sua somministrazione non doveva provocare concentrazioni ematiche in grado di rendere resistenti i micobatteri

occulti eventualmente presenti nell'organismo del paziente. Il problema poteva essere affrontato razionalmente in quanto il foglietto esterno della membrana citoplasmatica delle cellule eucariotiche è ricco di fosfatidil-colina e ha un'elevata carica positiva mentre le membrane citoplasmatiche batteriche non hanno questa caratteristica. Sandro mi è stato di grande aiuto nel razionalizzare questo approccio al problema. È stato fatto un primo tentativo introducendo nella posizione 3 dell'anello naftalenico delle rifamicine un gruppo trimetil-ammonico, nel quale, come è noto, è presente una carica positiva localizzata. Il tentativo fallì in quanto la molecola risultante aveva perso quasi del tutto l'attività antibatterica, pur non essendo stati modificati in essa i gruppi interagenti con il bersaglio batterico (la RNA-polimerasi batterica). È ipotizzabile che il gruppo ammonico da noi introdotto nella molecola ostacolasse anche l'ingresso nelle cellule batteriche. Abbiamo fatto un secondo tentativo creando nella molecola della rifamicina SV una funzione mesoionica azotata, simile a quella presente nella sostanza del Dr. Rauer e collaboratori, esaminata 12 anni prima. La sostanza che ne è scaturita si chiama rifaximina (Fig. 5) ed è il farmaco, prodotto dalla ricerca farmaceutica italiana che, per quanto a mia conoscenza, negli ultimi 30 anni ha avuto il maggiore successo terapeutico e commerciale [7]. Viene, infatti, utilizzato in tutto il mondo come disinfettante intestinale, ma anche per il trattamento dell'encefalopatia epatica e di varie altre disfunzioni intestinali con componente batterica ed infiammatoria.

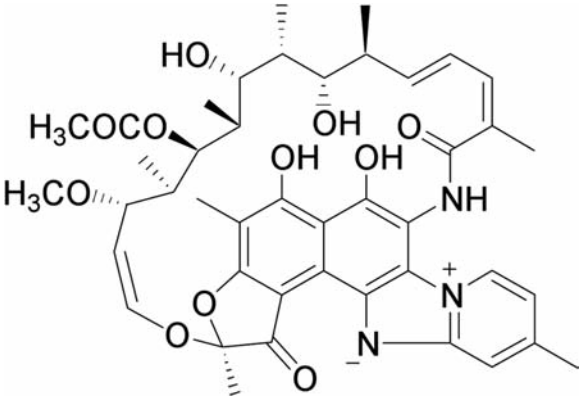

Fig. 5. Rifaximina.

La rifaximina infatti, come altre rifamicine, attiva il recettore nucleare PXR (recettore X del pregnano), espresso nel fegato e nell'intestino. L'attivazione di questo recettore attiva a sua volta la trascrizione di vari geni tra i quali alcuni che codificano per gli enzimi responsabili della cosiddetta fase metabolica 1, che provoca l'inattivazione di molti farmaci al loro passaggio epatico. Gli stessi enzimi possono metabolizzare altre sostanze di origine esogena ed endogena tossiche o infiammatorie. È ben noto che la rifampicina causa la rapida metabolizzazione dell'acido lipo-

colico, tossico per il fegato e responsabile di alcune forme di colestasi epatica. Infatti, la rifampicina stessa viene alcune volte usata, con molta cautela per non ingenerare ceppi batterici resistenti, per il trattamento di alcune forme di colestasi epatica.

La descrizione di questo episodio della mia attività professionale mi consente di puntualizzare i rapporti scientifici che avevo con Sandro. Sandro era un biochimico colto e molto rigoroso sul piano scientifico; io ero un chimico e per alcuni anni mi ero dedicato alla strutturistica cristallografica. Ho poi cominciato, in conseguenza di alcune opportunità che mi si sono presentate, ad occuparmi di ricerca farmaceutica. La ricerca farmaceutica moderna prevede di ipotizzare i nuovi farmaci come entità in grado di modificare complessi meccanismi biochimici. Sandro è stato per me in questo campo un maestro ideale in quanto mi ha dato un grande aiuto nella formulazione degli approcci razionali alla ricerca farmaceutica, indicandomi, quando necessario, con molto garbo, come era nelle sue abitudini, gli eventuali punti deboli delle mie ipotesi di ricerca. Con lui ho trascorso tante ore a discutere dei meccanismi di azione degli antibiotici, argomento che conosceva bene e che lo interessava. Abbiamo discusso anche altri temi, a volte più frivoli, ma l'argomento principale delle nostre conversazioni universitarie erano gli antibiotici.

Dal punto di vista organizzativo e gestionale, ho collaborato con Sandro alla realizzazione e alla gestione della sede distaccata del Dipartimento di Scienze Biochimiche di via degli Apuli. Al Dipartimento di Biochimica aderivano allora molti docenti della Facoltà di Medicina e un numero più limitato di docenti della Facoltà di Scienze, tra i quali Sandro e il sottoscritto. Sandro decise di allestire una sede separata del Dipartimento che ospitasse i docenti della Facoltà di Scienze e scelse a questo fine due palazzine del quartiere San Lorenzo, che erano state la sede degli uffici dell'Azienda che produceva la Birra Wührer. Le difficoltà, politiche e tecniche, che incontrò furono notevoli. Dal punto di vista politico, oltre ad ottenere le necessarie autorizzazioni, dovette superare le avversità di una parte degli abitanti del quartiere San Lorenzo che occuparono per un lungo periodo le due palazzine. Dal punto di vista tecnico le due palazzine erano sfalsate in altezza ed è stato necessario collegarle con scale interne ad ogni piano. Ho collaborato personalmente con Sandro soltanto nell'ultima parte dell'impresa, quando abbiamo dovuto scegliere gli arredi di laboratorio, in quanto precedentemente ero in un'altra sede universitaria. Sandro ha continuato a curare la sede di via degli Apuli con impegno anche dopo la sua inaugurazione, considerandola, giustamente, una sua creatura.

Con Sandro ci siamo frequentati anche fuori degli ambienti universitari incontrandoci a pranzo o cena con le rispettive famiglie, in città e al mare, dove passavamo le nostre vacanze. Negli ultimi periodi l'invecchiamento ha costretto entrambi ad affrontare vari problemi, soprattutto di salute. Ci siamo consolati a vicenda a conferma di quanto ho premesso: Sandro è stato per me prima un maestro e poi un collega, ma soprattutto un grande amico.

BIBLIOGRAFIA

[1] Ballio A., Chain E.B., De Leo P., Erlanger B.F., Mauri M., Tonolo A., 1964. Fusicoccin: a new wilting toxin produced by *Fusicoccum amygdali*, Nature, 203, 297.

[2] Ballio A., Brufani M., Casinovi C.G., Cerrini S., Fedeli W., Pellicciari R., Santurbano B., Vaciago A., 1968. The structure of fusicoccin A, Experientia, 24, 631-635.

[3] Ballio A., Chain E.B., Dentice di Accadia F., Mauri M., Rauer K., Schlesinger J., Schlesinger S., 1961. Identification of a compound related to 6-aminopenicillanic acid, isolated from culture media of *Penicillium chrysogenum*, Nature, 191, 909-910.

[4] Pfleger R., Garthe E., Rauer K., 1963. The dimerizing condensation of ethyl acetylglyoxylate α-hydrazone, Chemische Berichte, 96, 1827-1839.

[5] Brufani M., Fedeli W., Giacomello G., Vaciago A., 1963. X-ray structural analysis of an aromatic nonbenzenoid ring system: 1,3a,4,6a-tetraazapentalene (1,5-dehydro-vic-triazolo[2,1-a]-vic-triazole), Chemische Berichte, 96, 1840-1843.

[6] Brufani M., Fedeli W., Giacomello G., Vaciago A., 1963. Struttura molecolare del sale di rubidio dell'acido 2,5-dimetil-1,3a,4,6a-tetraazapentalen-3,6-dicarbossilico, Gazzetta Chimica Italiana, 93, 1556-1570.

[7] Brufani M., Cellai L., Cerrini S., Fedeli W., Marchi E., Segre A., Vaciago A., 1984. X-Ray crystal structure of 4-deoxy-3'-bromopyrido[1',2'-1,2]imidazo[5,4-c]rifamycin S, Journal of Antibiotics, 37, 1623-1627.