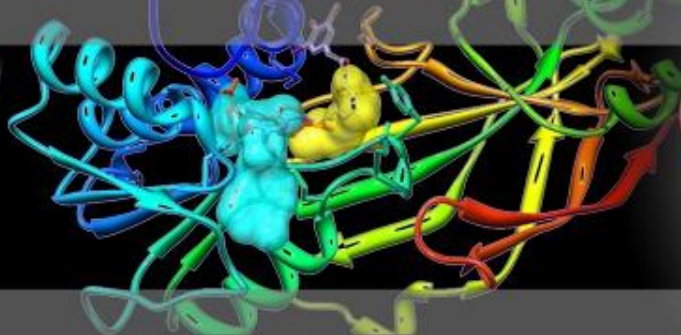




Inibitori Non Nucleosidici della Trascrittasi Inversa: studi di Molecular Modelling e 3-D QSAR per lo sviluppo di un farmacoforo generico

Relatore :
Prof. Rino Ragno

Laureando:
Yuri Zanni

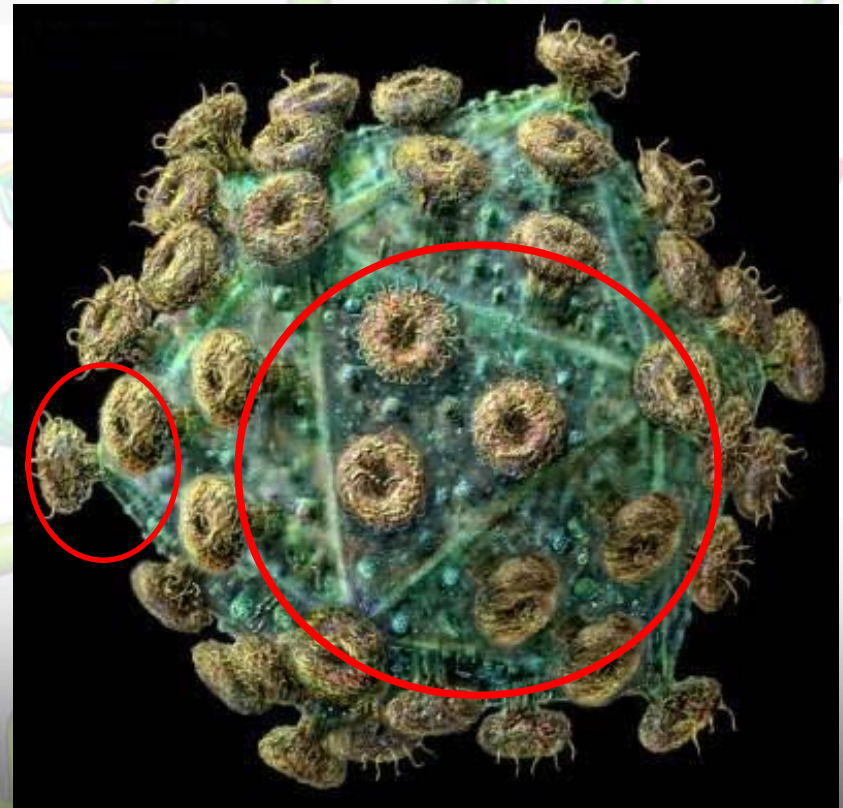
HIV AIDS

Il **virus HIV** è un retrovirus del genere *lentivirus* (**HIV** *Human Immunodeficiency Virus*) ed è responsabile della **sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS)**.

Il capside ha una forma icosaedrica,
Il pericapside ospita le proteine di
membrana gp 120

Il Core è costituito da :

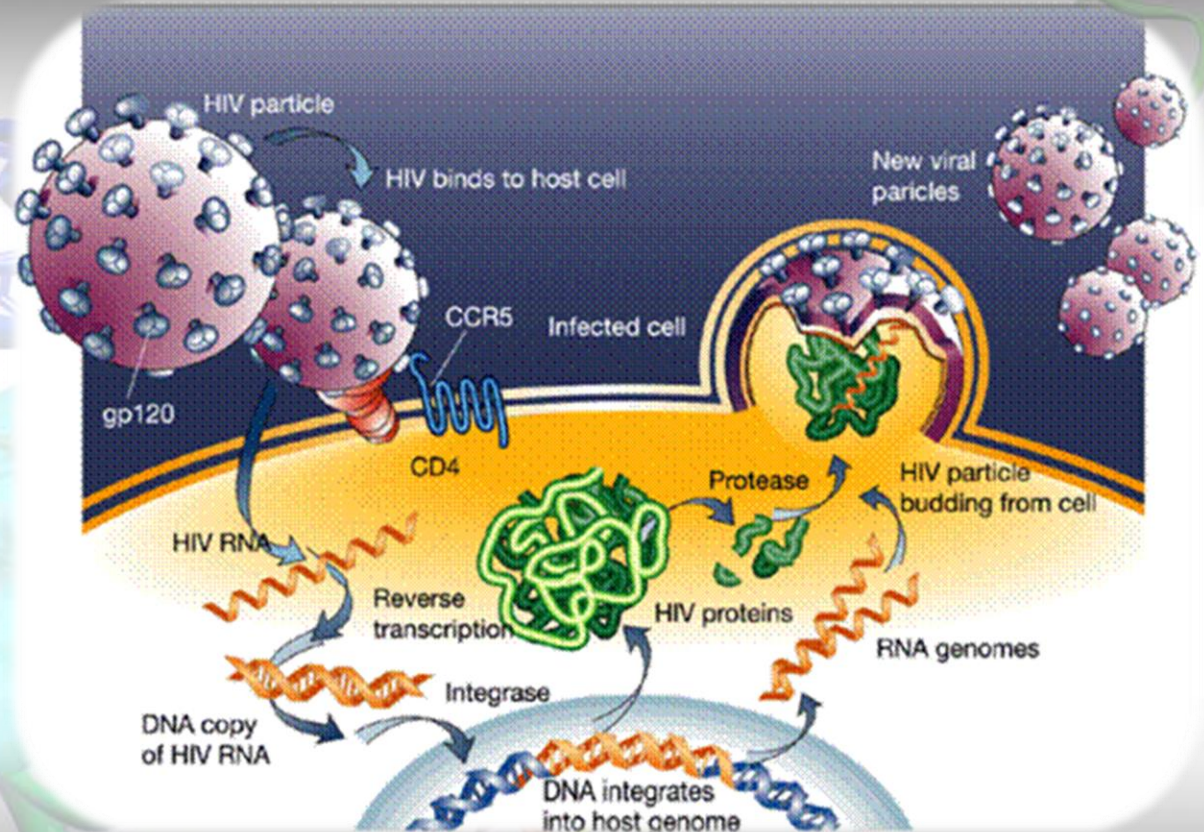
- due copie di RNA a polarità positiva
- trascrittasi inversa
- proteasi
- integrasi



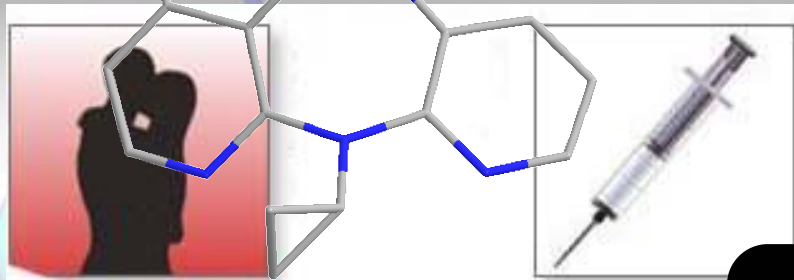
Ciclo virale

Il virus si lega alla cellula ospite attraverso i recettori CD4.

Penetrato nella cellula il suo RNA viene trascritto a DNA ad opera della *trascrittasi inversa* e successivamente integrato nel genoma della cellula ospite dall' *integrasi* virale.



Vie di trasmissione e strategie farmacologiche

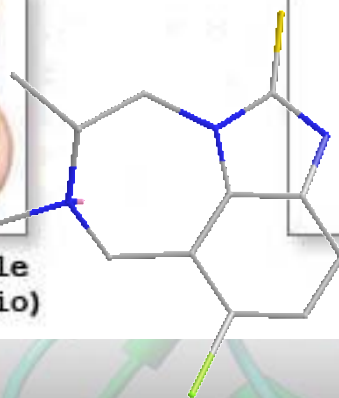


Via Sessuale Nevirapina

Via ematica



Via Verticale (Madre-Figlio)



TIBO

NNRTIs

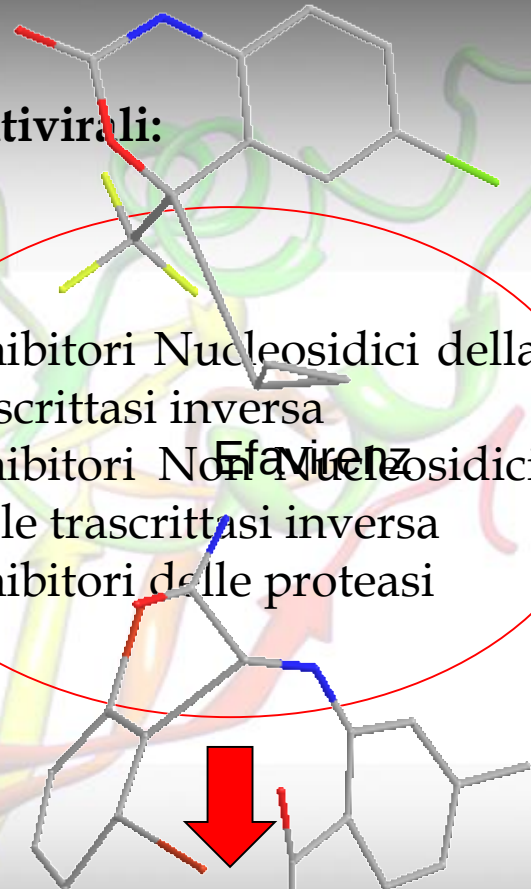


Antivirali:

Inibitori Nucleosidici della trascrittasi inversa

Inibitori Non Nucleosidici della trascrittasi inversa

Inibitori delle proteasi



Highly Active Anti-Retroviral Therapy (HAART)

(a-Cloro APA)

3-D QSAR

Lo studio QSAR si può definire come una relazione matematica tra un'attività biologica di un sistema molecolare e le sue caratteristiche geometriche e chimico-fisiche.

La relazione matematica trovata permette di stabilire “regole” che possano essere usate per valutare e predire l'attività di nuovi composti.

Input: n descrittori $P_1, \dots, P_n$ e il valore dell'attività biologica (EC_{50} per esempio) per m composti.

	Attività	P_1	P_2	...				P_n
Cpd 1	0.7	3.7						
Cpd 2	3.2	0.4						
...								
Cpd m								

Campi di interazione molecolare - GRID

Le molecole sono poste in una griglia 3D e vengono calcolate le energie di interazione tra molecola e il *probe* per ciascun punto della griglia. Il programma GRID permette il calcolo dei Campi di Interazione Molecolare (M.I.F.)

$$E_{xyz} = E_{lj} + E_{el} + E_{hb} + S$$

dove :

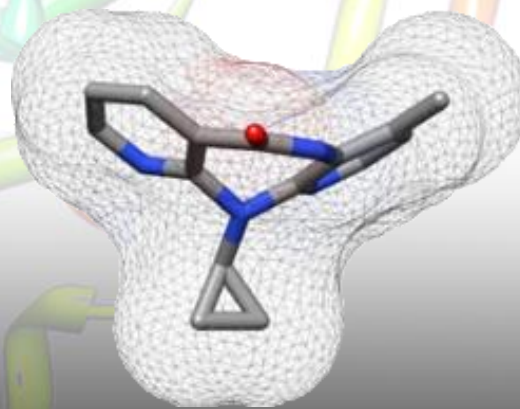
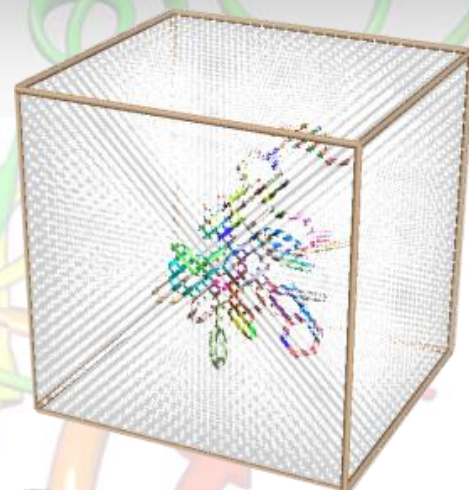
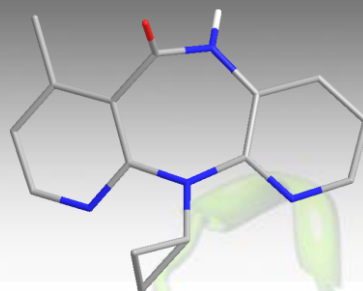
E_{lj} = potenziale di Lennard-Jones

E_{el} = potenziale elettrostatico

E_{hb} = potenziale di legame idrogeno

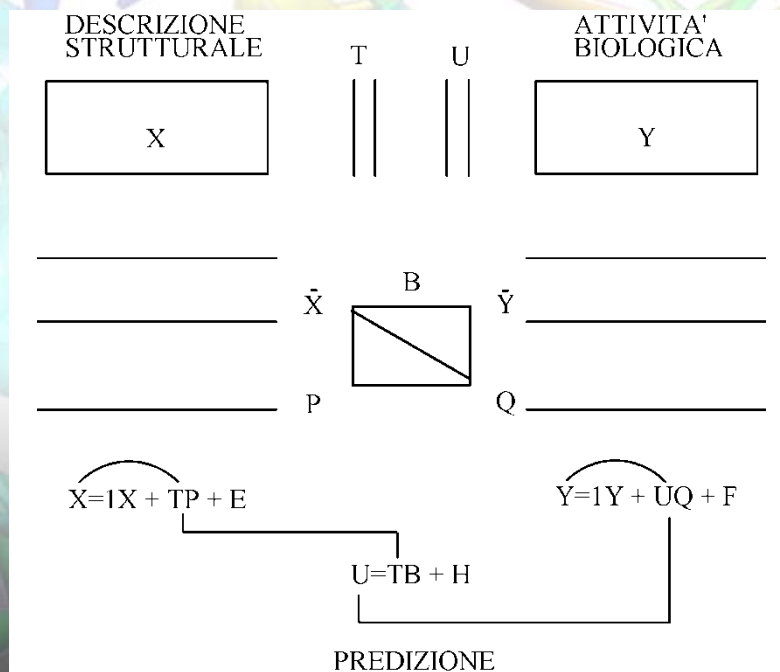
S = termine entropico

I valori dei punti di interazione della griglia, (M.I.F.) sono quindi utilizzati come variabili, che vengono poi processate attraverso analisi di regressione lineare (PLS) .



GOLPE

La correlazione tra le variabili e l'attività biologica è stata effettuata mediante modelli statistici di regressione lineare multivariata *Partial Least Squares* (PLS) con l'ausilio del programma GOLPE (General Optimal Linear PLS Estimation). Il metodo PLS è un modello predittivo a due blocchi, infatti mette in relazione una matrice X, che costituisce la struttura chimica, con una matrice Y, che contiene le attività biologiche, con lo scopo di interpretare Y in funzione di X e di predire Y da X.



Scelta del probe

$$r^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (Y_{\text{exp},i} - Y_{\text{calc},i})^2}{\sum_{i=1}^N (Y_{\text{exp},i} - \bar{Y})^2}$$

$$q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (Y_{\text{exp},i} - Y_{\text{pred},i})^2}{\sum_{i=1}^N (Y_{\text{exp},i} - \bar{Y})^2}$$

$$\text{SDEP} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Y_{\text{exp},i} - Y_{\text{pred},i})^2}{N}}$$

Probe	Variabili	r ²	SDEP	q ²
C1	1034	0,99	0,39	0,89
Dry	969	0,99	0,66	0,66
Probe	Variabili	r²	SDEP	q²
H2o	1034	0,99	0,39	0,89
N1-OH	937	0,99	0,45	0,89
OH	1065	0,99	0,43	0,85
Dry-OH	1469	0,98	0,59	0,8
N1-OH	937	0,99	0,45	0,89
N1-C1	1105	0,99	0,40	0,88
N1-C3	1105	0,99	0,39	0,87
C3-OH	1052	0,99	0,40	0,88
C1-OH	1087	0,99	0,40	0,88

Sequenza delle operazioni per la costruzione del Farmacoforo

Costruzione del training set

Ricerca delle
Cristallografie

Raccolta dati di
attività

Completamento
delle
cristallografie

Minimizzazione

Allineamento

Procedura
Grid/Golpe

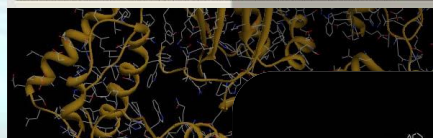
Pdb Box

Studio
Structure
based

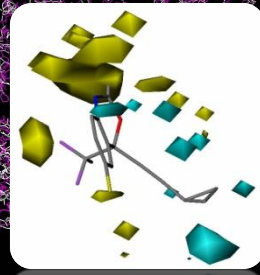
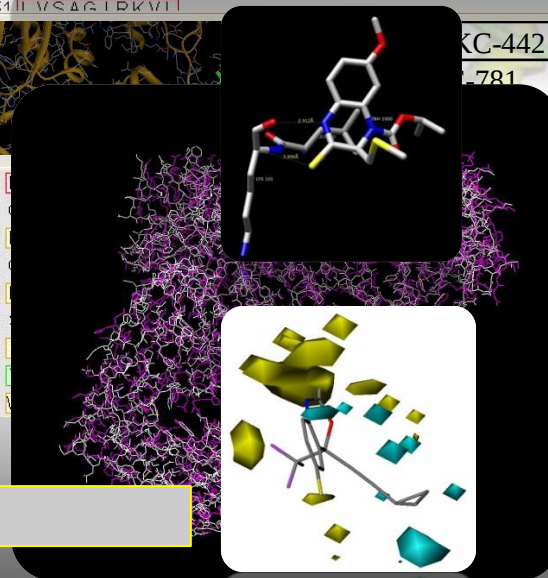
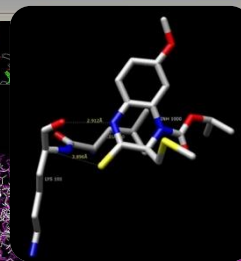
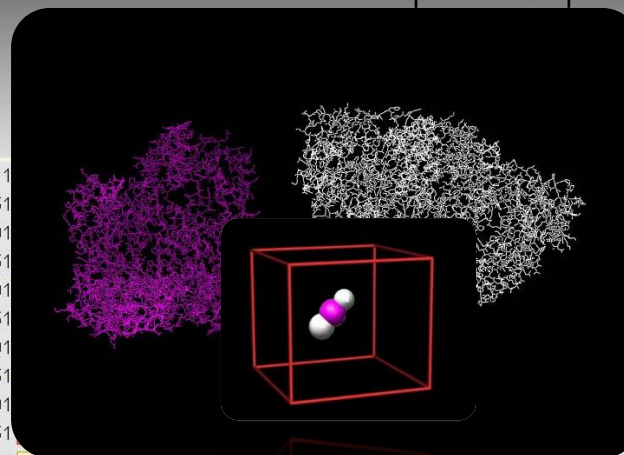
Mappe di
contorno

Sviluppo del Farmacoforo

1vrt.pdb (#0) chain A 1
1vrt.pdb (#0) chain A 51
1vrt.pdb (#0) chain A 101
1vrt.pdb (#0) chain A 151
1vrt.pdb (#0) chain A 201
1vrt.pdb (#0) chain A 251
1vrt.pdb (#0) chain A 301
1vrt.pdb (#0) chain A 351
1vrt.pdb (#0) chain A 401
1vrt.pdb (#0) chain A 451
1vrt.pdb (#0) chain A 501
1vrt.pdb (#0) chain A 551

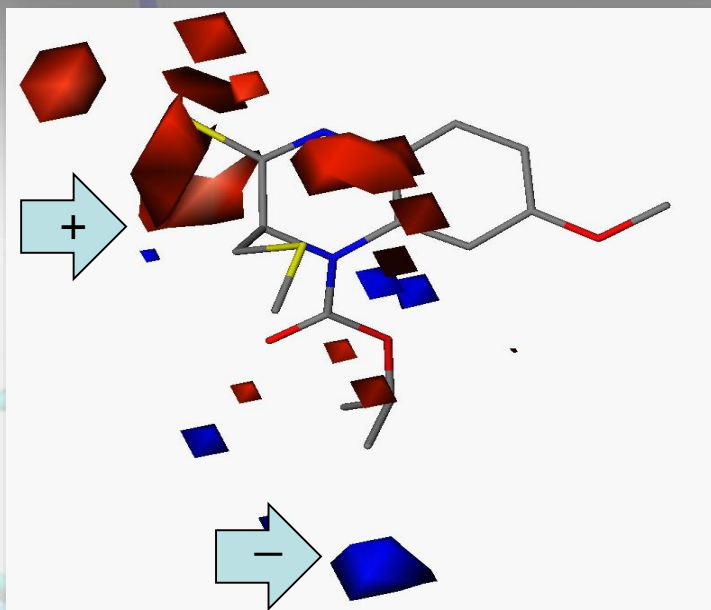


1vrt.pdb (#0) chain B 1
1vrt.pdb (#0) chain B 51
1vrt.pdb (#0) chain B 101
1vrt.pdb (#0) chain B 151
1vrt.pdb (#0) chain B 201
1vrt.pdb (#0) chain B 251
1vrt.pdb (#0) chain B 301
1vrt.pdb (#0) chain B 351
1vrt.pdb (#0) chain B 401

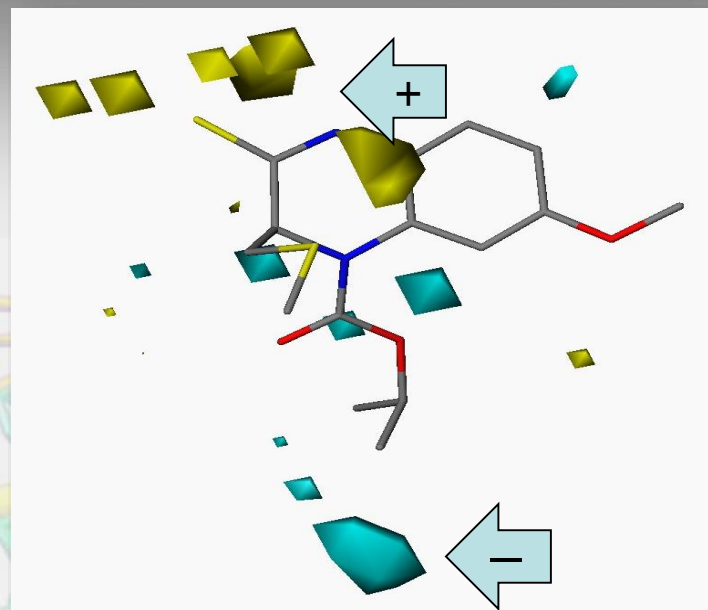


		ATTIVITA		
		μM	NORM.	Nev
		0,012	0,00279	4,30
	EMEKEGKISKI		0,03529	0,17
	VQLGIPHPAGL		0,02941	0,17
	PGIRYQYNVLP		0,02824	0,17
	GSDLEIGQHRT		0,23256	4,30
	TVQPIVLPEKD			
	TEVIPLTEAAE			
	QIYQEPFKNLK		0,05767	4,30
	KLPIQKETWET		0,16279	4,30
	FYVDGAANRET			
	GLEVNIIVTDSQ			
	YALGTTQAQPDQSESELVNQITTEQLTKKEKVVYLAWVPAHKGIGGNEQVDDK		0,34884	4,30
	IVSAGIRKVTI			
KC-442	WT	0,106	0,02465	4,30
781	WT	0,023	0,00535	4,30
	WT	0,148	0,03442	4,30
	WT	0,020	0,00698	4,30
	ICTEMEKEGKISKI		0,04651	4,30
	FWEVQLGIPHPAGL		5,00000	0,08
	NETPGIRYQYNVLP			
	LYVGS DLEIGQHRT		212,500	
	DKWTVQPIVLPEKD		00	0,08
	KALTEVIPLTEAAE			
	WTYQIYQEPFKNLK			
	PKFKLPIQKETWET		2,36667	0,30
	AEFTF			
	WT	0,630	2,10000	0,30
	WT	1,500	0,34884	4,30
NEVIRAPINA	WT	4,300	1,00000	4,30
CL-APA	WT	1,000	0,23256	4,30

Analisi delle mappe di contorno

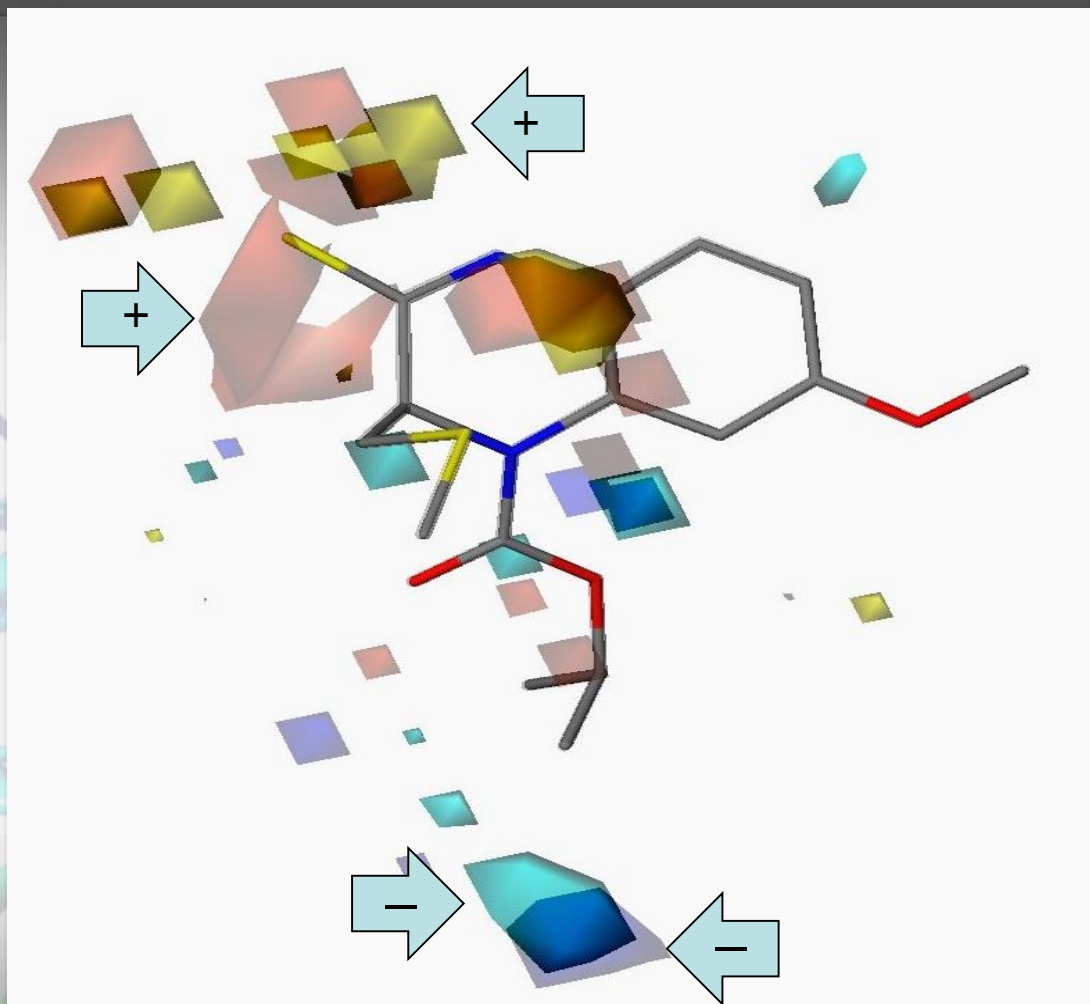


Probe C1 contributi sterici



Probe N1- OH contributi
elettrostatici e sterici

Analisi delle mappe di contorno



Probe C1; Probes N1- OH
contributi elettrostatici

Contributi

Contributi Positivi

	1 B Q M	1 D T T	1 D T Q	1 E T T	1 F K 9	1 H N I	1 H N V	1 I K W	1 R E V	1 R T 1	1 R T 4	1 R T 5	1 R T 6	1 R T 7	1 R T H	1 T K T	1 T K Z	1 T L 1	1 T L 3	1 T V 6	1 T V R	1 V R T	1 V R U
Imidaz.																				X	X		
Urea				X	X			X		X					X								
Tiourea	X	X					X		X		X	X	X	X									
Tioetere	X																						
Trifluoro																							
Metile					X			X															
Ammide																X	X	X	X				
Cloro					X		X				X	X		X				X			X		X
Bromo				X		X																	
Etile																X	X	X					
Metile						X	X		X														
Chet.																						X	
Ammina																							
Ar.	X		X											X								X	

Contributi Positivi

	1 B Q M	1 D T T	1 D T Q	1 E T T	1 F K 9	1 H N I	1 H N V	1 I K W	1 R E V	1 R T 1	1 R T 4	1 R T 5	1 R T 6	1 R T 7	1 R T H	1 T K T	1 T K Z	1 T L 1	1 T L 3	1 T V 6	1 T V R	1 V R T	1 V R U
Imidaz.																				X	X		
Urea				X	X			X		X					X								
Tiourea	X	X					X		X		X	X	X	X									
Tioetere	X																						
Trifluoro Metile					X			X															
Ammide																X	X	X	X				
Cloro					X		X				X	X		X				X			X		X
Bromo				X		X																	
Etile																X	X	X					
Metile						X	X		X														
Chet.																						X	
Ammina																							
Ar.	X		X											X								X	

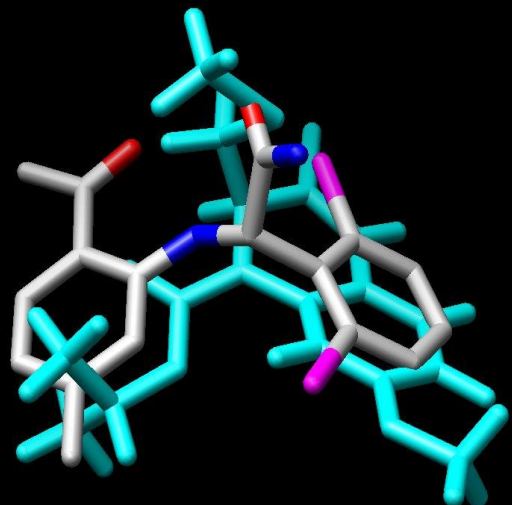
Contributi Negativi

	1 B Q M	1 D T T	1 D T Q	1 E T T	1 F K 9	1 H N I	1 H N V	1 I K W	1 R E V	1 R T 1	1 R T 4	1 R T 5	1 R T 6	1 R T 7	1 R T H	1 T K T	1 T K Z	1 T L 1	1 T L 3	1 T V 6	1 T V R	1 V R T	1 V R U
Etere	X									X	X		X	X									
Ciano																							
Ammina																X							
Ar.																							
Cloro									X								X		X				
Bromo				X																			
Cicloesa.										X						X	X	X	X				
Ciclopr.					X			X														X	
Metile						X																	
Nitro															X								

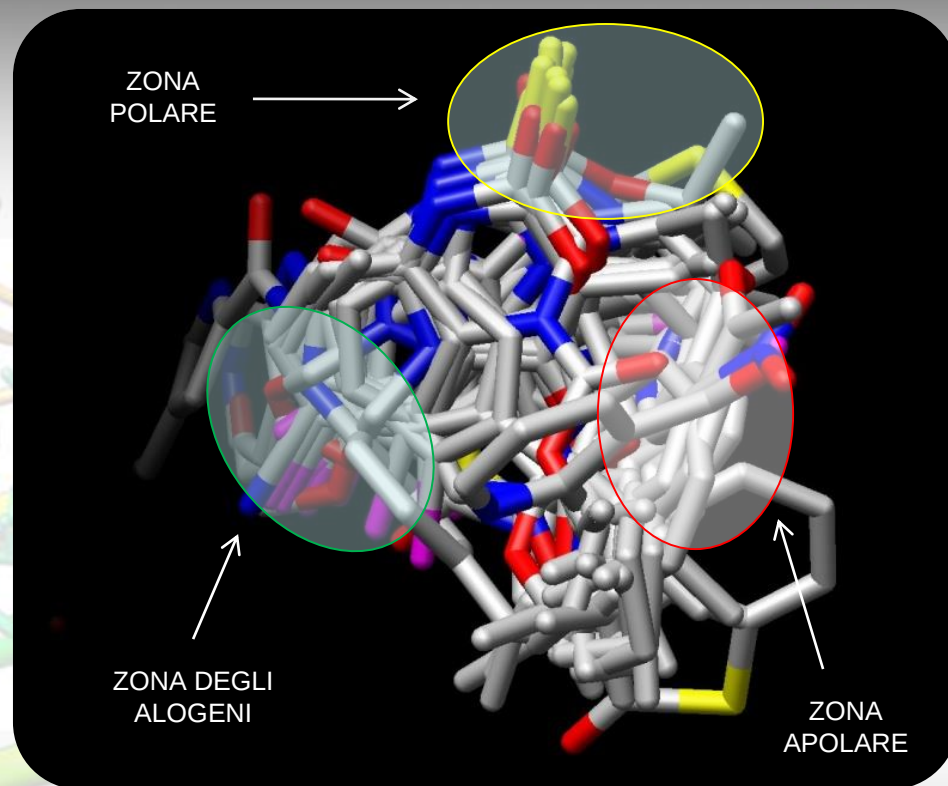
Contributi Negativi

	1 B Q M	1 D T T	1 D T Q	1 E T T	1 F K 9	1 H N I	1 H N V	1 I K W	1 R E V	1 R T 1	1 R T 4	1 R T 5	1 R T 6	1 R T 7	1 R T H	1 T K T	1 T K Z	1 T L 1	1 T L 3	1 T V 6	1 T V R	1 V R T	1 V R U
Etere	X									X	X		X	X									
Ciano																							
Ammina																							
Ar.															X								
Cloro									X								X		X				
Bromo				X																			
Cicloesa.										X						X	X	X	X				
Ciclopr.					X			X														X	
Metile						X																	
Nitro															X								

Allineamento dei gruppi funzionali



Analizzando tutte assieme le molecole allineate ci siamo resi conto, che si potevano distinguere, alcune zone aventi le stesse caratteristiche chimiche.



Conformazione Butterfly - like

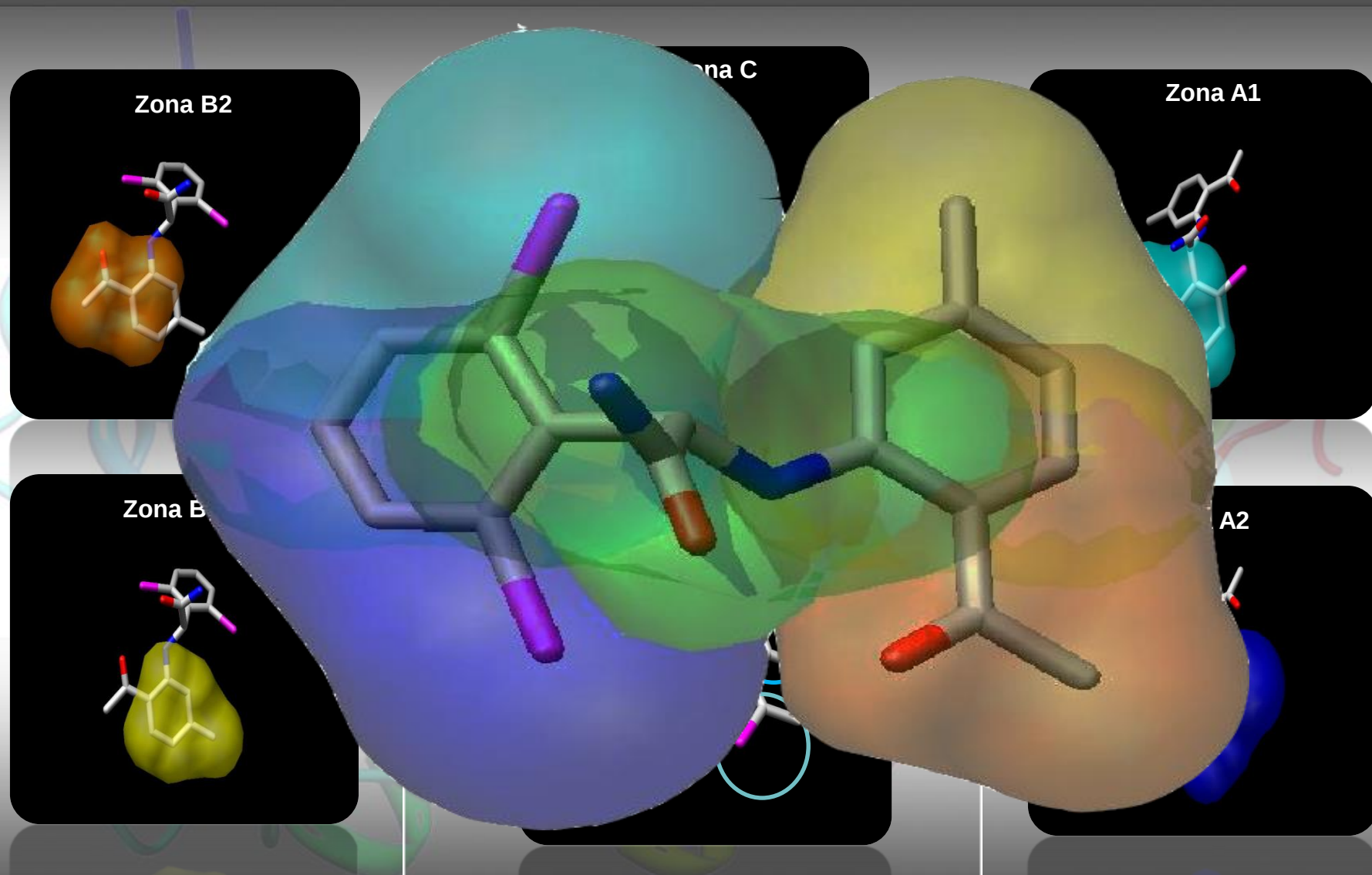
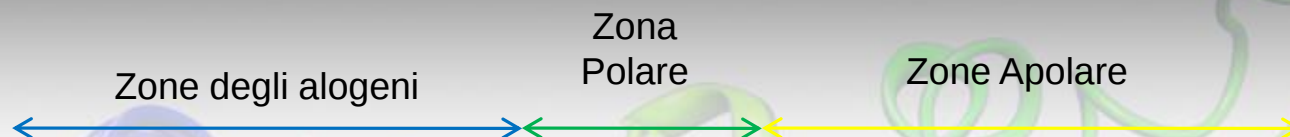
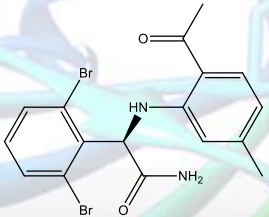
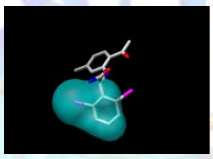
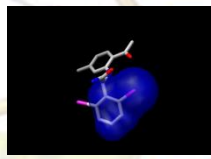
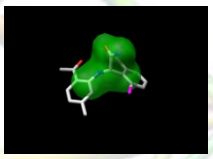
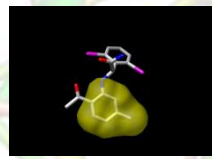
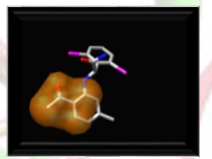
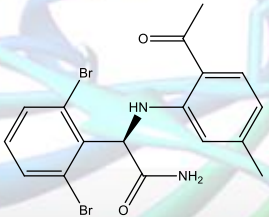
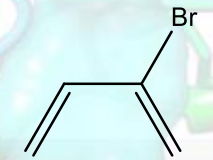
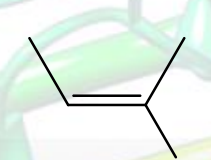
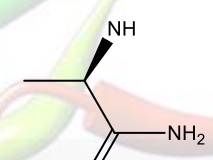
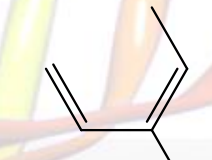
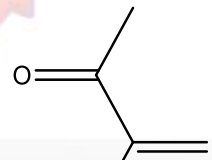
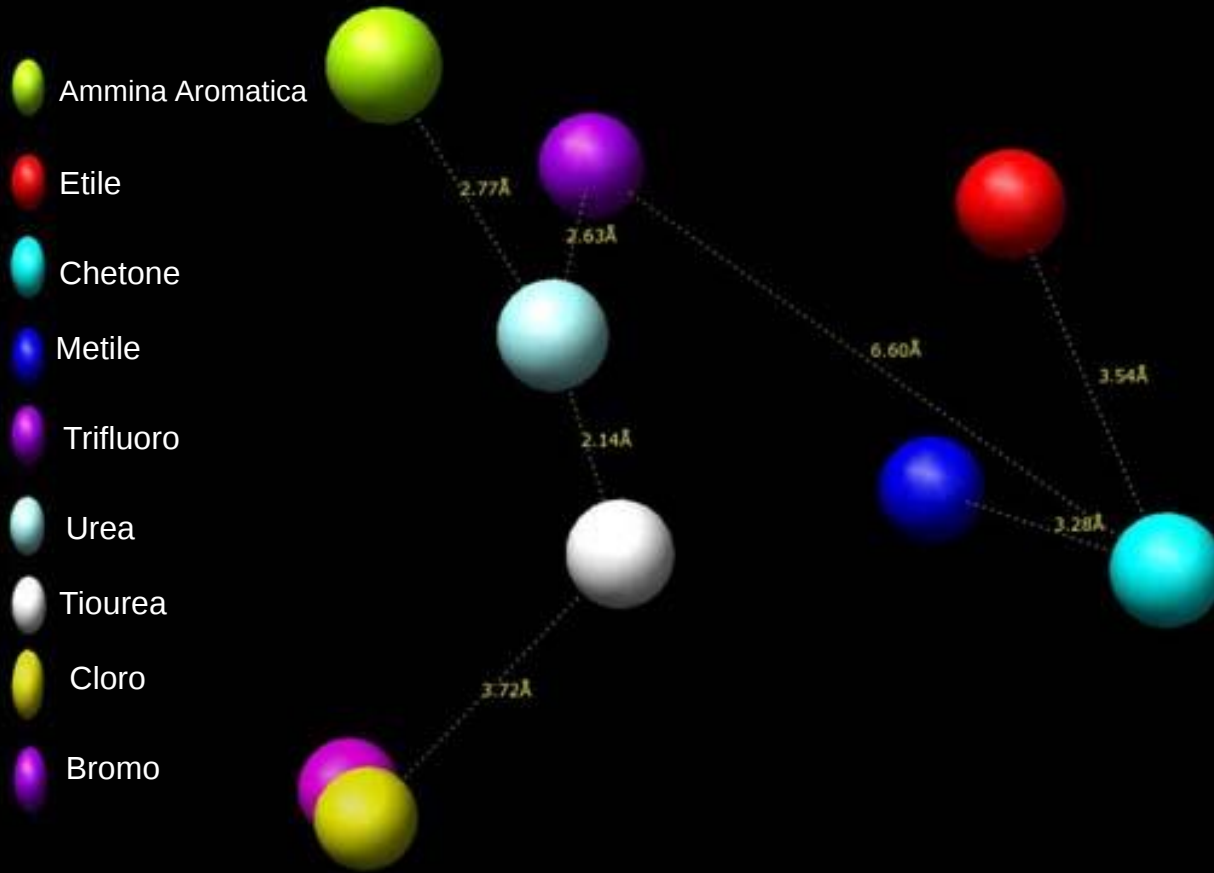


Tabella delle Aree



Cod. PDB	Struttura Chimica	Zona A1	Zona A2	Zona C	Zona B1	Zona B2
1HNV						
						

Disposizione media dei gruppi funzionali

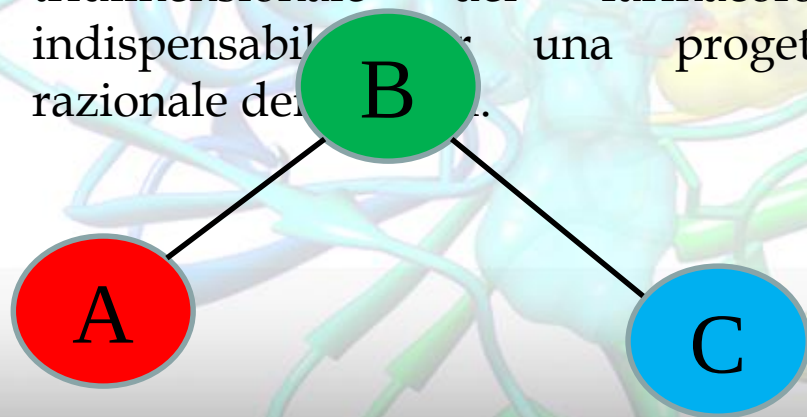


Conos
 importa
 calcola
 gruppo
 simili a
 abbian
 singolo gruppo funzionale.

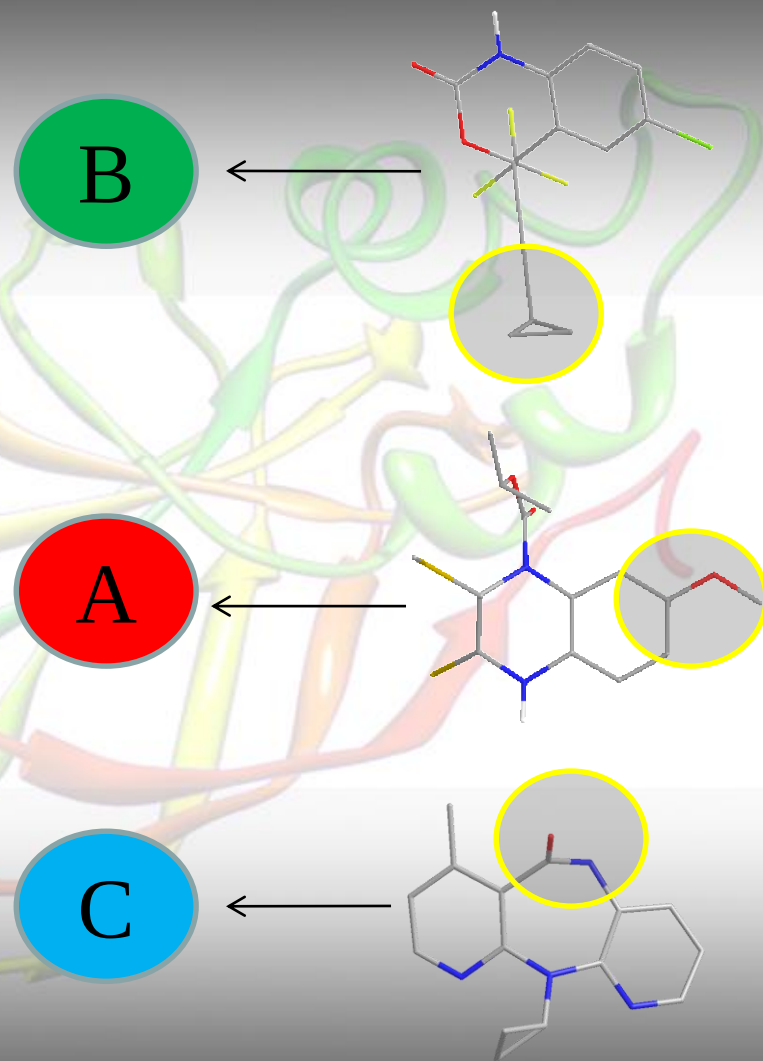
Concetto del farmacoforo

La IUPAC definisce il farmacoforo come "un insieme di caratteristiche steriche ed elettroniche che sono necessarie per garantire interazioni ottimali tra la molecola ed il target biologico per attivare (o bloccare) la sua risposta biologica".

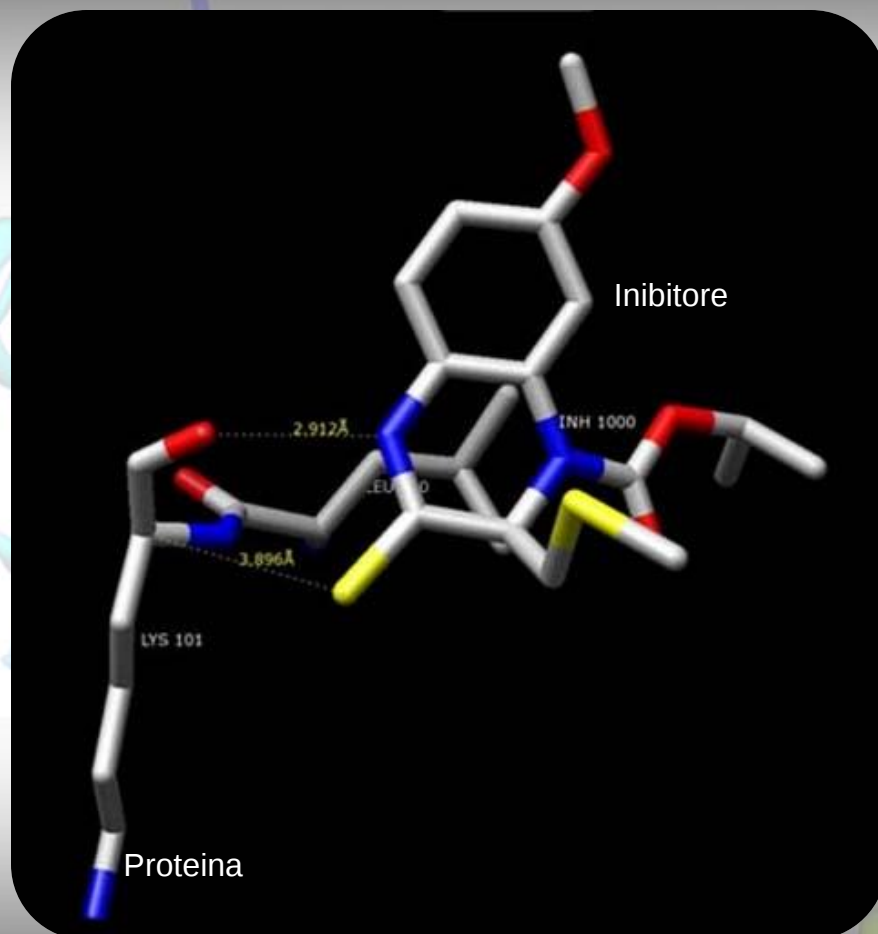
La conoscenza della struttura tridimensionale del farmacoforo è indispensabile per una progettazione razionale del farmaco.



Nuovo Lead-Compound



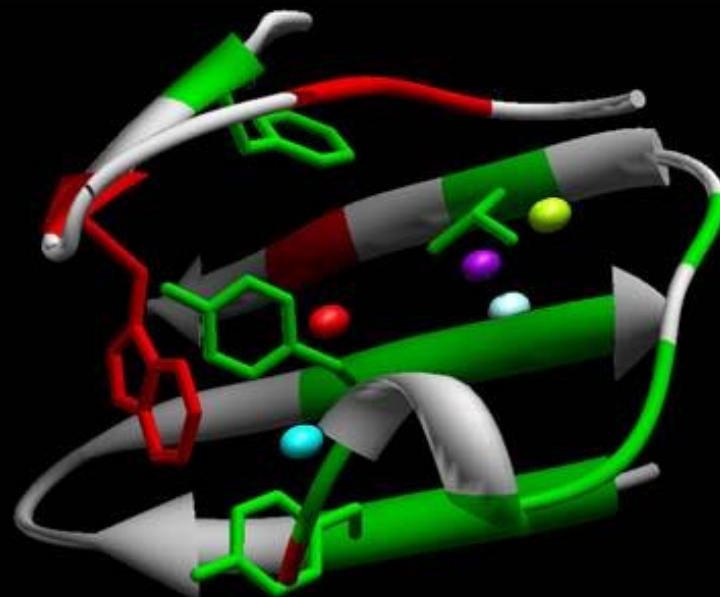
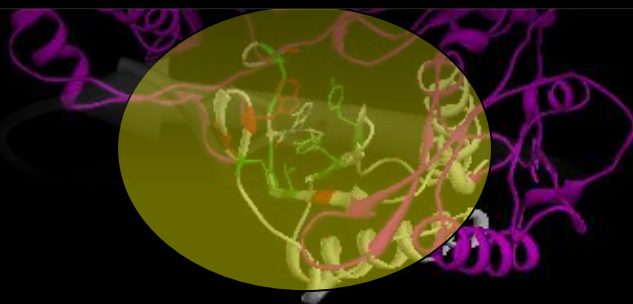
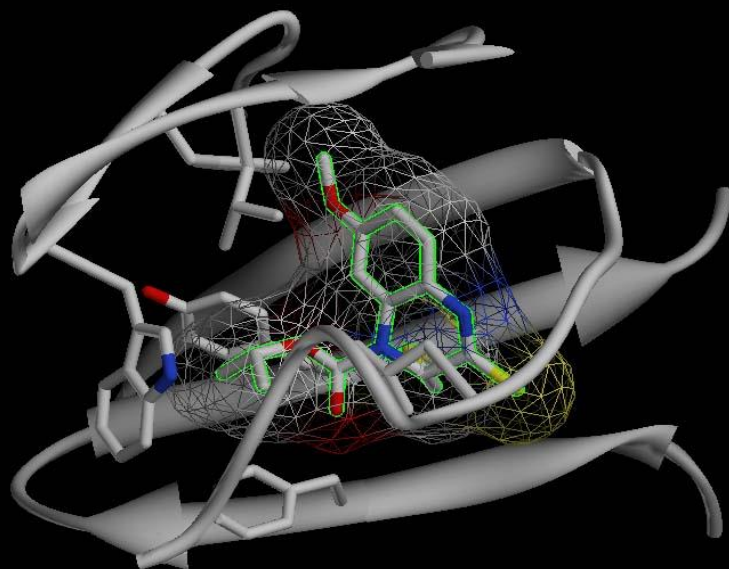
Analisi Structure-Based



Contributi Negativi

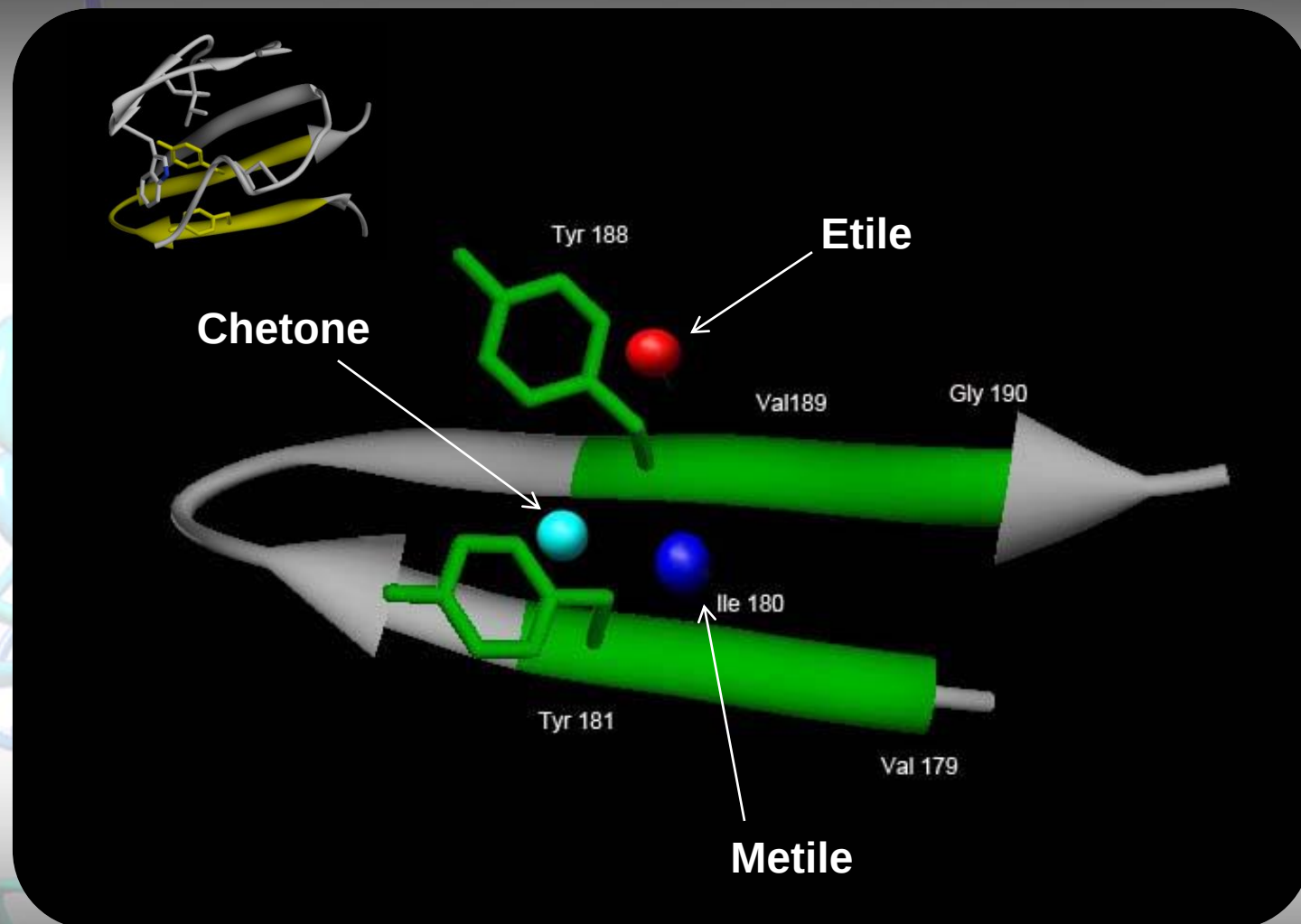
Gruppi	Aminoacidi
Etere	Val106, Leu234, Phe227, His235
Cianurea	Lys103, Tyr181, Phe227, Val106
Tioetere	Lys103, Lys101, Leu100
Trifurca	
Metilica	Val106, Tyr181, Lys103
Amide	Tyr188, Leu180
Cloro	Leu234, Phe227
Bromo	Val106, Phe227, Lys103
Bromo	Leu234, Pro229
Cicloesa.	Pro95, Tyr181, Trp229
Etile	Val106, Val179, Tyr188
Ciclopr.	Tyr181, Trp229, Leu234
Metile	Tyr188, Val189
Chetone	Trp229, Leu234, Tyr181
Nitro	Tyr181
Ammina	Val108, His96, Tyr181, Val108
Aromatic	Tyr181, Tyr188, Leu100

Tasca recettoriale

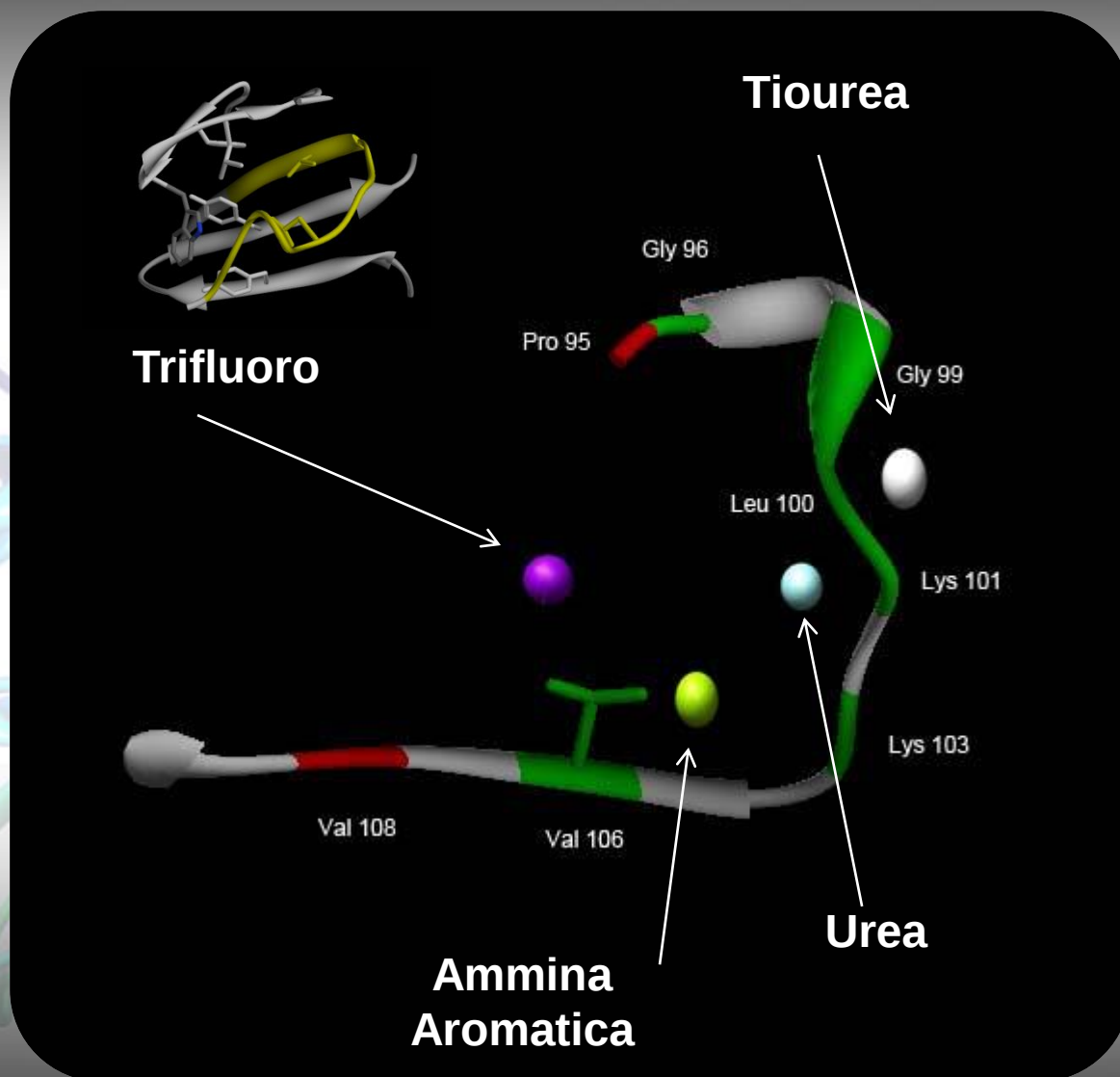


Per analizzare la nostra struttura Farmacoforica all'interno della tasca recettoriale, abbiamo estratto solo la tasca proteica, dove effettivamente si legano le nostre molecole, che corrisponde alla sequenza amminoacidica che va dalla Pro 95 al His 235

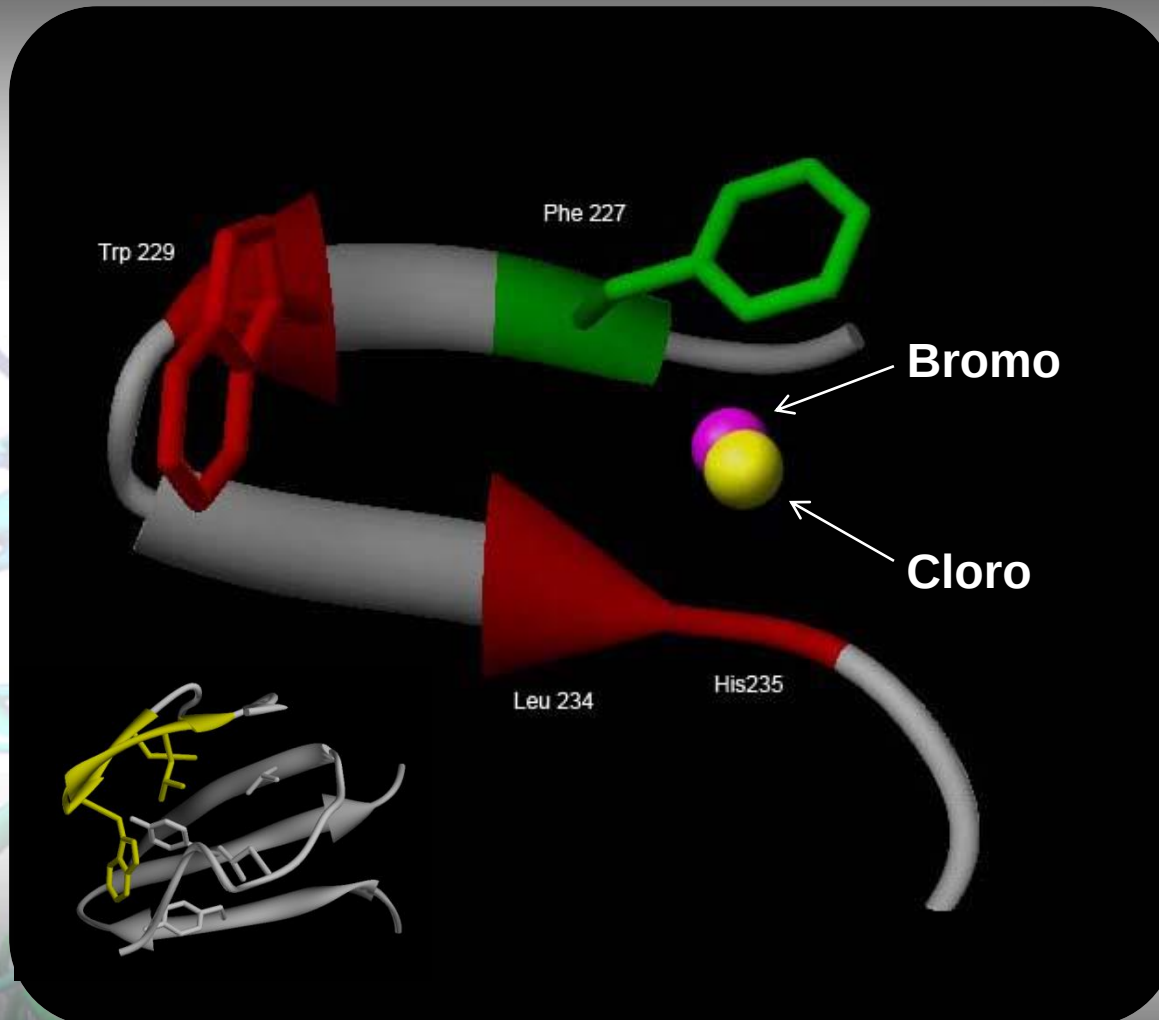
Porzione farmacoforica Val 179 – Gly190



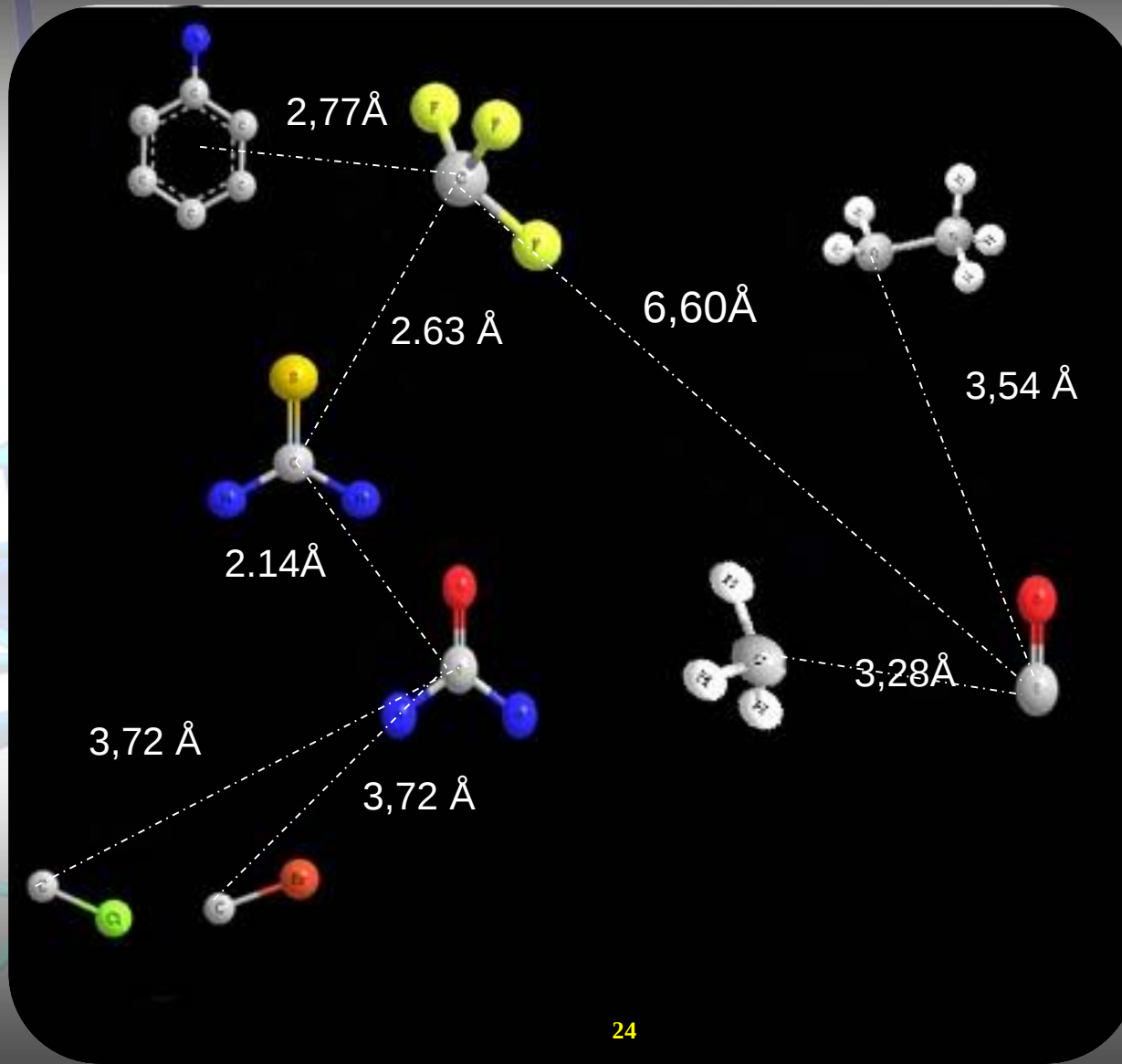
Porzione Farmacoforica Pro 95 - Val 108



Porzione farmacoforica Phe 227 – His 235



Ipotesi strutturale Lead-Compound



Conclusioni

Siamo orgogliosi del traguardo raggiunto, perché prima d'ora, non esisteva nessun lavoro, capace di descrivere in maniera così dettagliata un Farmacoforo per gli inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa del virus dell' HIV.

Gli ottimi risultati raggiunti sono stati ottenuti grazie all'eterogeneità delle strutture chimiche del nostro training-set, avendo utilizzato molecole molto diverse tra loro da un punto di vista chimico, ma simili da un punto di vista farmacologico. Concludendo questo lavoro vuole essere un valido contributo, per migliorare le proprietà delle molecole già esistenti, ed aprire nuovi orizzonti verso la sintesi di nuovi composti.

Sviluppi futuri:

- Screening di sostanze naturali
- Realizzazione del progetto super molecola

Ringraziamenti



Ringrazio il
Prof. Rino Ragno ed il
Gruppo di Ricerca RCMD
per il supporto ricevuto durante
il corso della mia Tesi di Laurea