



Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
Facoltà di Farmacia



*Analisi delle interazioni farmaco-recettore:
applicazione di tecniche computazionali
allo studio delle interazioni tra antracicline
e reduttasi citosoliche*

Tesi Sperimentale in Chimica Farmaceutica
Corso di laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche
ANNO ACCADEMICO 2006-2007
Sessione estiva



Relatore: Dr. Rino Ragno

Candidato: Davide Pirolli



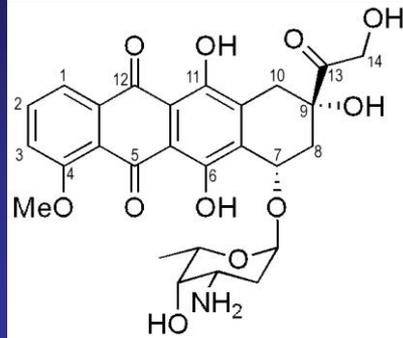
Con siglio Nazionale
delle Ricerche

Correlatore: Dr.ssa Maria Cristina De Rosa

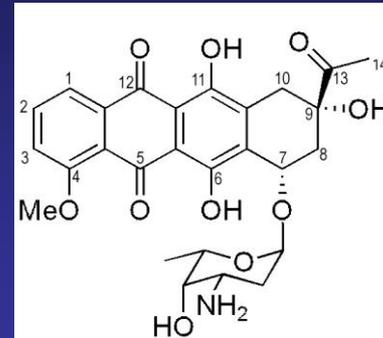
Doxorubicina (DOX) e Daunorubicina (DNR) isolate da *Streptomyces peucetius* nei primi 1960s

Impieghi DOX

- tumore polmonare
- tumori solidi dell'infanzia
- sarcomi dei tessuti molli
- linfomi



DOX



DNR

Impieghi DNR

- leucemie acute

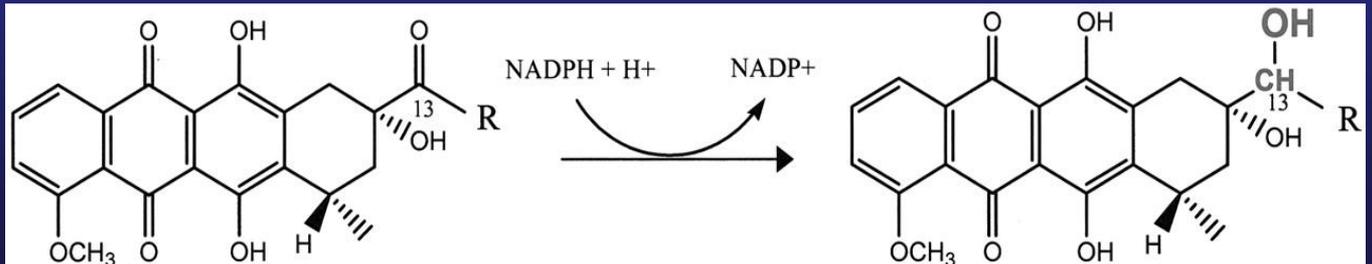
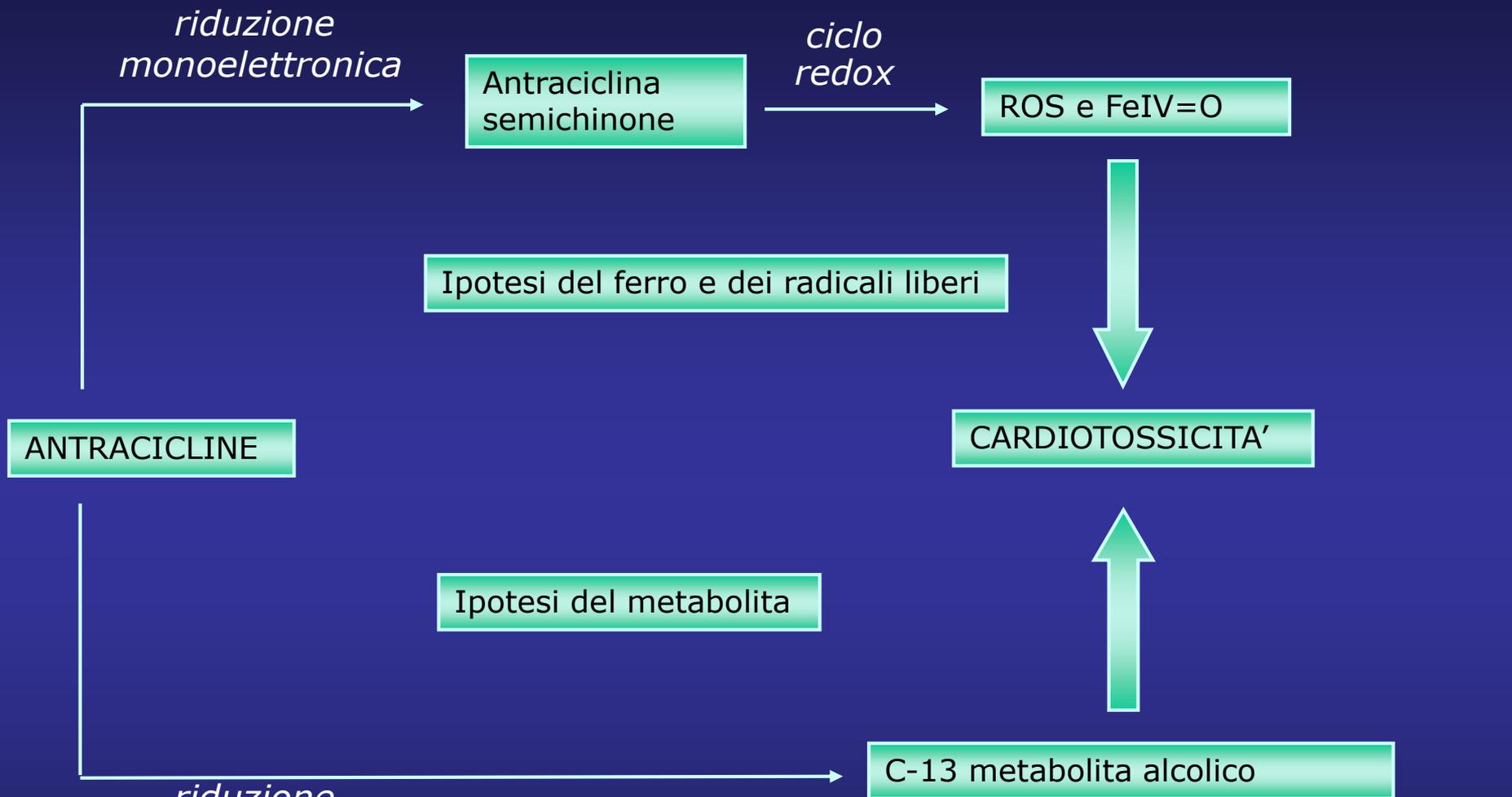
Il meccanismo di azione di **DOX** e **DNR** nelle cellule tumorali è ancora controverso:

- inibizione della topoisomerasi II → danni al DNA
- intercalazione nel DNA → inibizione sintesi macromolecole
- generazione di radicali liberi → danni al DNA, perossidazione lipidica
- alchilazione del DNA
- induzione di apoptosi

Le problematiche associate all'utilizzo di **DOX** e **DNR** (sviluppo di resistenza nelle cellule tumorali, cardiotoxicità) hanno portato alla ricerca di "migliori antracicline" :

- identificati ~ 2000 analoghi
- solo pochi analoghi hanno superato la fase di sperimentazione clinica

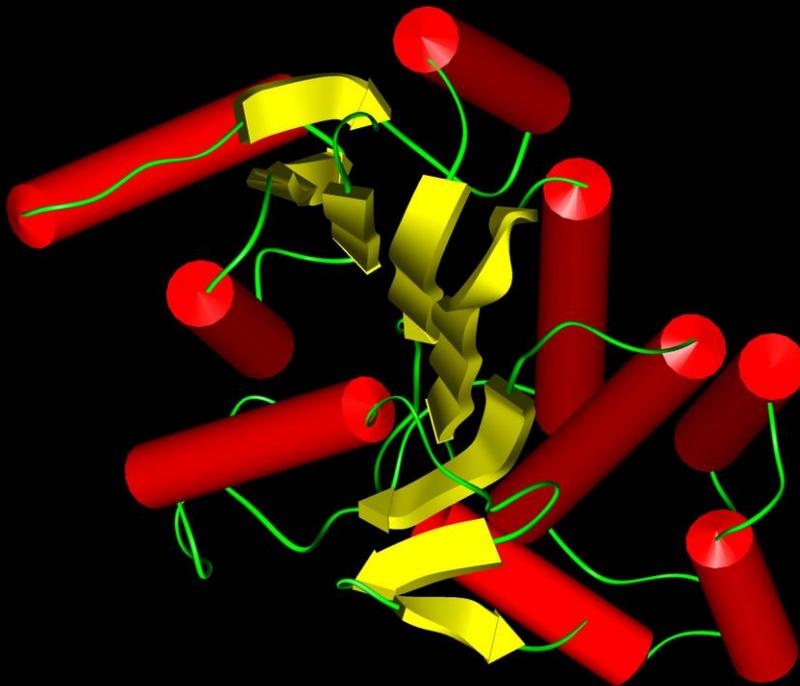
Meccanismi di tossicità cardiaca provocata dalle antracicline



(SDR) Short-Chain Dehydrogenases/Reductases

~ 3000 strutture primarie note divise in 4 famiglie

- 11 β -idrosteroidi deidrogenasi (HSD)
- Membro 4 della superfamiglia SDR
- L-xilulosio reduttasi
- CBRs



Tetrade catalitica conservata

- Asn
- Lys
- Ser
- Tyr

α/β folding pattern conservato

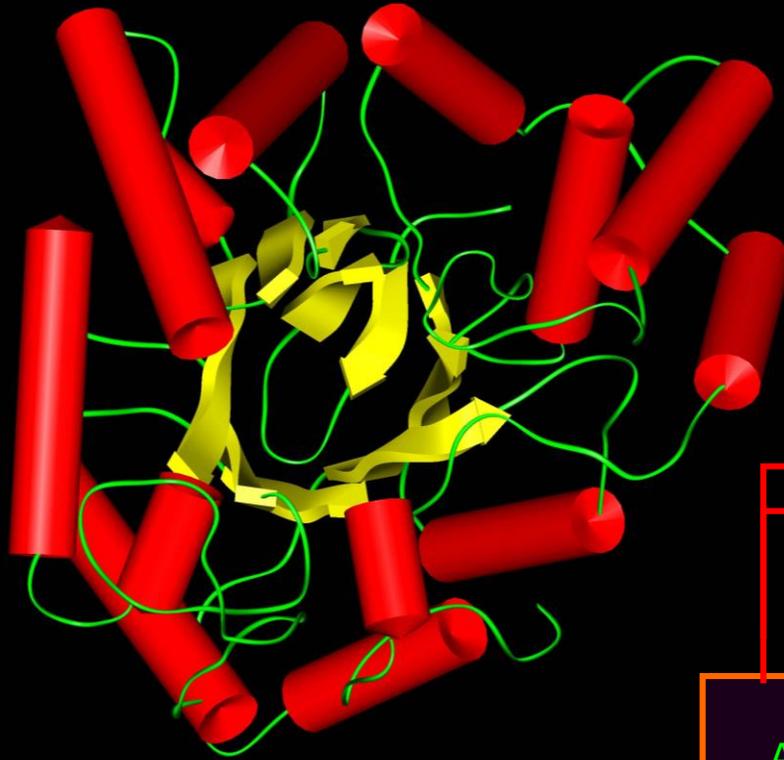
CBR1

Riduce un ampio "range" di composti carbonilici (chinoni, aldeidi aromatiche, chetosteroidi, prostaglandine, DOX, DNR) nei corrispondenti alcoli.

(AKR) Aldo-Keto Reductases

Tetrate catalitica conservata

- Asp
- Lys
- His
- Tyr



~ 100 sequenze suddivise in 14 famiglie

Superfamiglia organizzata in una gerarchia di 14 famiglie (AKR1 → AKR14) con identità di sequenza <40%

ogni famiglia suddivisa in sottofamiglie i cui membri hanno identità di sequenza >60%

AKR1 suddivisa in varie sottofamiglie tra cui:

AKR1A, aldeide reduttasi di mammifero

AKR1B, aldoso reduttasi di mammifero

AKR1C, idrossisteroide deidrogenasi (HSDs)

AKR1D, Δ^4 -3-chetosteroide-5 β -reduttasi

Riducono aldeidi aromatiche (preferite da AKR1A) e alifatiche, aldo- e cheto-zuccheri, gruppi funzionali aldeidici, aldeidi, xenobiotici tra cui DOX, DNR.

folding pattern conservato: (α/β)₈-barrel

Dati sperimentali relativi all'interazione tra antracicline e reduttasi NADPH-dipendenti

Lavori su omogenati di cellule miocardiche

- Mordente A. et al., Biochemical Pharmacology (2003)
- Kaiserova H. et al., J Enzyme Inhib Med Chem (2005)

	CBR1	AKR1A1	AKR1C2
DNR	2140	312	116

V_{max}/K_m in U/mg/M (Ohara H. et al., Biological Pharmacology, 1995)

NON SI HANNO INFORMAZIONI STRUTTURALI
SULL'INTERAZIONE TRA ANTRACICLINE E
REDUTTASI CITOSOLICHE

	CBR1
DOX	0.0029
DNR	0.0118

K_{cat}/K_m in $\mu M^{-1}S^{-1}$ Slupe A. et al., Cardiovascular Toxicology (2005)

PROTEZIONE DEL MIOCARDIO DAGLI EFFETTI
CARDIOTOSSICI DELLE ANTRACICLINE

*sviluppo di nuove antracicline con
bassa affinità per le reduttasi
citosoliche che formino meno
metabolita alcolico*

*sviluppo di inibitori delle reduttasi
responsabili della
formazione dei metaboliti
alcolici*

CONOSCENZA 3D DELL'INTERAZIONE TRA
ANTRACICLINE E REDUTTASI

SCOPO DELLA TESI

Docking

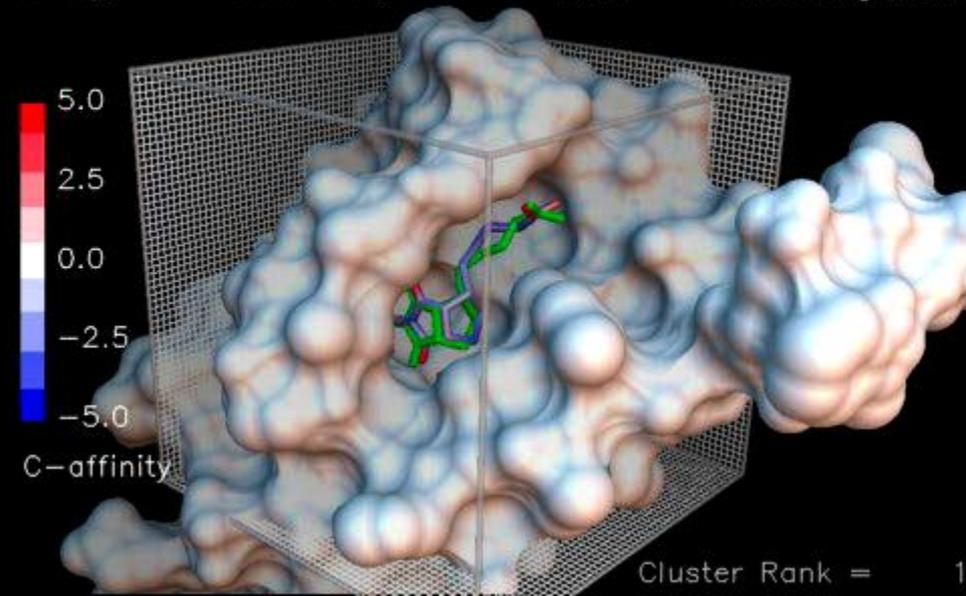
Metodi computazionali per la predizione della struttura 3D del complesso intermolecolare formato da due o più molecole (proteina-ligando, proteina-DNA, proteina-proteina, DNA-ligando).

In particolare il docking "proteina-ligando" è uno strumento fondamentale nella ricerca di nuovi farmaci: la predizione accurata dell'interazione di un ligando con una macromolecola di struttura 3D nota è alla base del "rational drug design".

1) Esplorazione del campo conformazionale: gli algoritmi di ricerca producono tutti i possibili orientamenti con i quali un ligando interagisce con un suo sito recettoriale

2) "Scoring" dei complessi proteina-ligando: identificazione del modo di "binding" corretto attraverso la stima dell'energia di legame del complesso intermolecolare

Energy = -52.98 kcal/mol RMSD = 0.89 Angstrom



Validazione della procedura di docking

Riproduzione dei complessi cristallografici:

complesso **carbonil reduttasi** umana (CBR1)/idrossi-PP (pdb code: 1WMA)

complesso **aldoso reduttasi** umana (AKR1B1)/alrestatina (pdb code: 1AZ1)

complesso **aldoso reduttasi** umana (AKR1B1)/fidarestat (pdb code : 1PWW)

complesso **aldeide reduttasi** porcina (AKR1A2)/fidarestat (pdb code: 2A00)

La struttura cristallografica di AKR1A1 (pdb code 2ALR) è priva dei residui 214-225 che corrispondono ad un loop flessibile della proteina, regione di specificità del substrato.

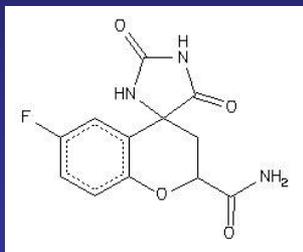


"homology modelling"

Modello 3D della aldeide reduttasi umana

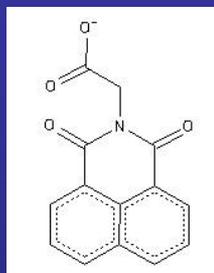
Ligandi utilizzati nel "bound docking" e i "probes" che li descrivono

Fidarestat



PROBE	DESCRIPTION	VDWR	NEFF	Q	HD	HA
H	Neutral hydrogen atom	1.15	1	0.00	0	0
OH2	Water	1.70	7	0.00	2	2
DRY	Hydrophobic probe	1.65	7	0.00	2	2
N1	Neutral flat NH	1.65	7	-0.08	1	0
N2	Neutral flat NH2	1.70	8	0.00	2	0
O	sp ² carbonyl oxygen atom	1.60	6	-0.25	0	2
OC=	Aromatic ether oxygen	1.60	6	-0.10	0	1
F	Organic fluorine atom	1.45	8	0.00	0	2

Alrestatina



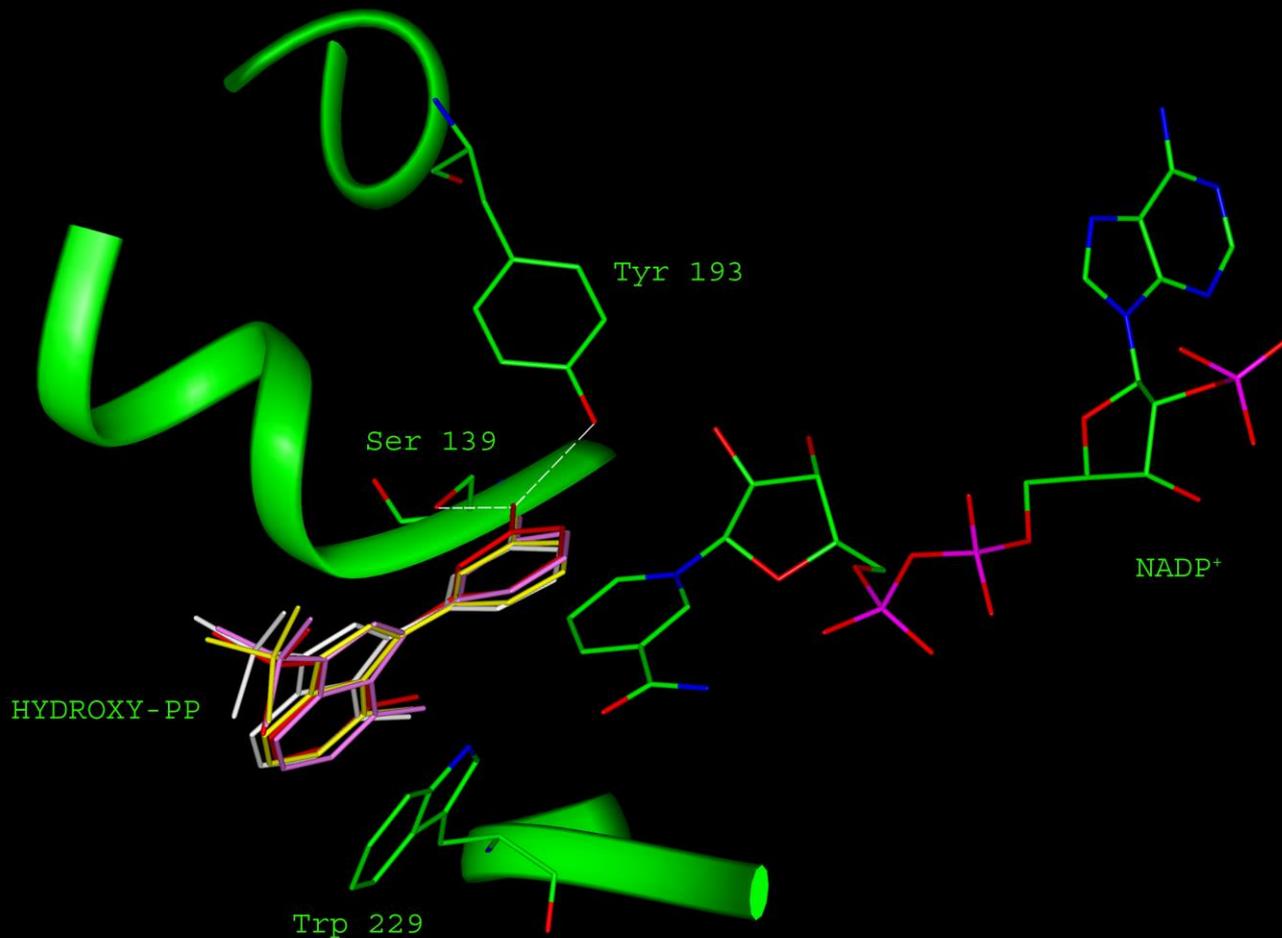
PROBE	DESCRIPTION	VDWR	NEFF	Q	HD	HA
H	Neutral hydrogen atom	1.15	1	0.00	0	0
OH2	Water	1.70	7	0.00	2	2
DRY	Hydrophobic probe	1.65	7	0.00	2	2
O::	sp ² carboxy oxygen atom	1.60	6	-0.45	0	2
O	sp ² carbonyl oxygen atom	1.60	6	0.25	0	2

Idrossi-PP



PROBE	DESCRIPTION	VDWR	NEFF	Q	HD	HA
H	Neutral hydrogen atom	1.15	1	0.00	0	0
OH2	Water	1.70	7	0.00	2	2
DRY	Hydrophobic probe	1.65	7	0.00	2	2
OH	Phenol OH group	1.65	7	-0.15	1	1
N:=	sp ² N with lone pair	1.65	6	0.00	0	1
N2	Neutral flat NH2	1.70	8	0.00	2	0

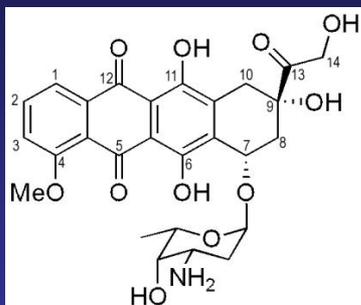
CARBONIL REDUTTASI/idrossi-PP



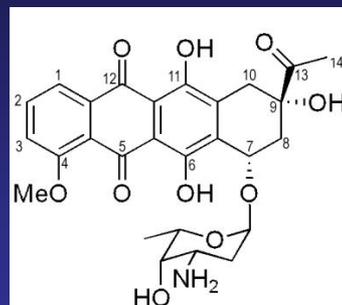
$\Delta E = 0.8 \text{ kcal/mol}$

$\text{RMSD} < 0.5 \text{ \AA}$

"Probes" utilizzati per i docking di DOX e DNR



DOX

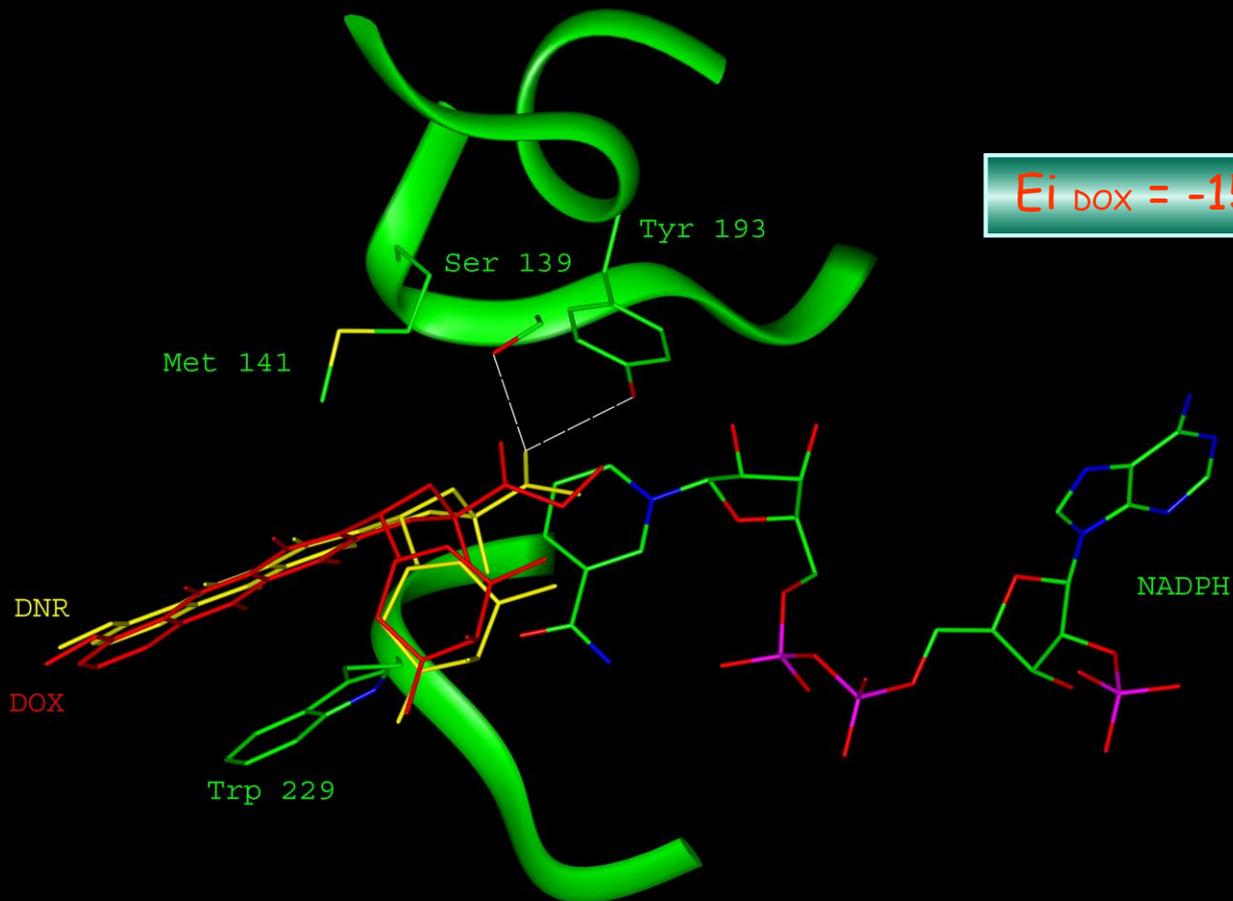


DNR

PROBE	DESCRIPTION	VDWR	NEFF	Q	HD	HA
H	Neutral hydrogen atom	1.15	1	0.00	0	0
OH2	Water	1.70	7	0.00	2	2
DRY	Hydrophobic probe	1.65	7	0.00	2	2
N2:	sp3 NH2 with lone pair	1.70	8	0.00	2	1
O	sp2 carbonyl oxygen atom	1.60	6	-0.25	0	2
O1	Alkyl hydroxy OH group	1.65	7	-0.10	1	2
OH	Phenol OH group	1.65	7	-0.15	1	1
OC2	Ether oxygen	1.60	6	-0.20	0	2
C3	Methyl CH3 group	1.95	8	0.00	0	0

CARBONIL REDUTTASI/ DNR e DOX

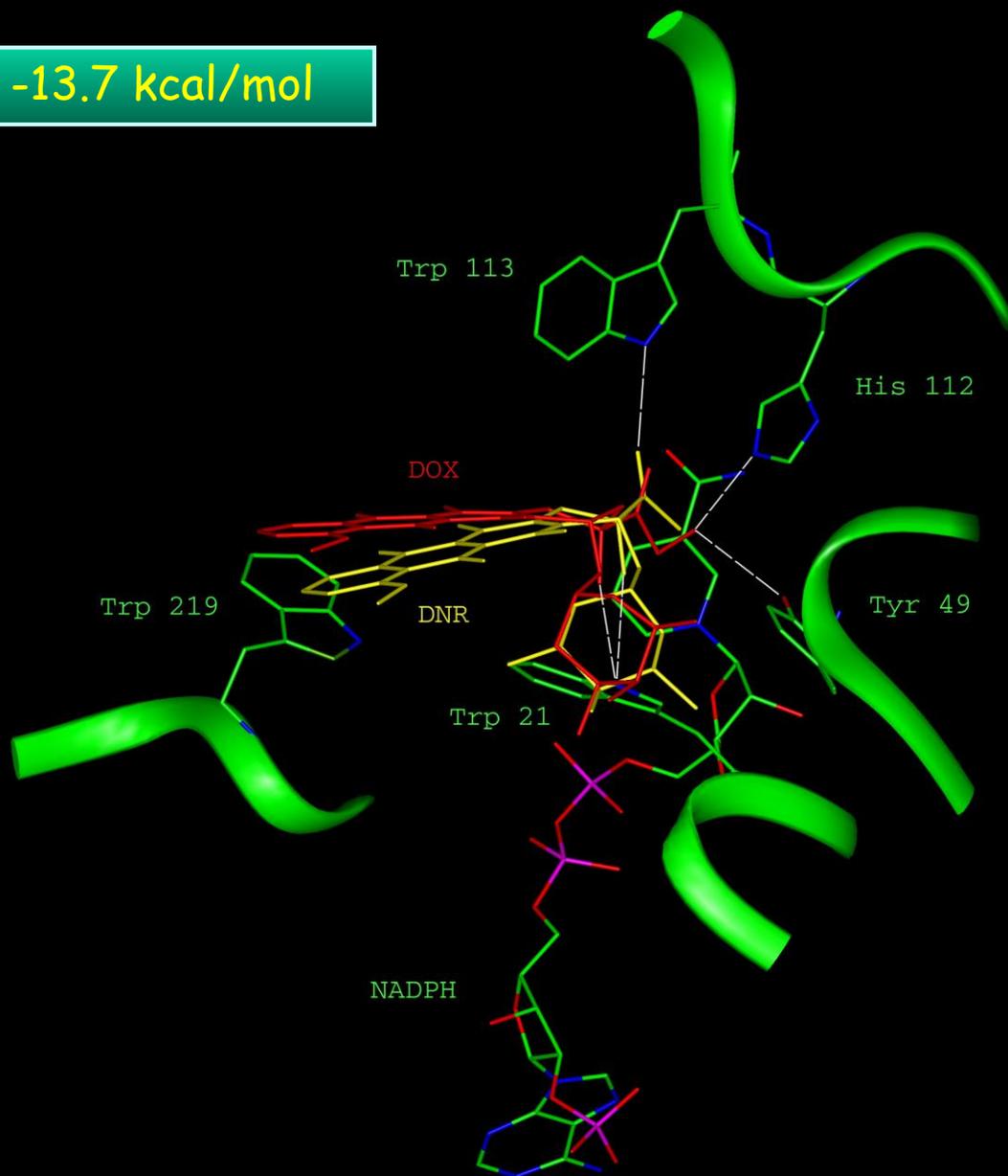
$E_{i \text{ DNR}} = -17.9 \text{ kcal/mol}$



$E_{i \text{ DOX}} = -15.4 \text{ kcal/mol}$

ALDEIDE REDUTTASI/ DNR e DOX

$E_i_{DNR} = -13.7 \text{ kcal/mol}$

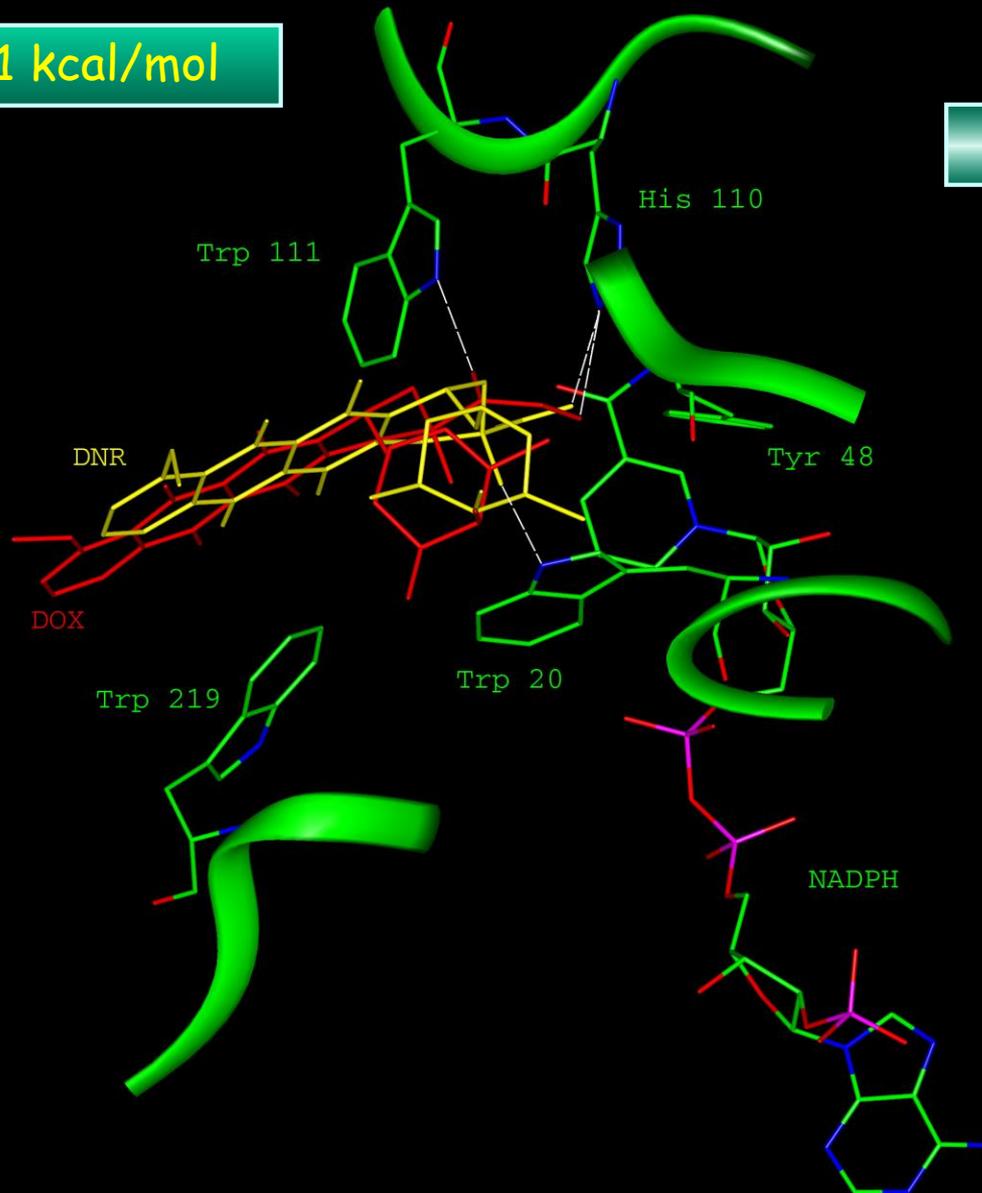


$E_i_{DOX} = -12.1 \text{ kcal/mol}$

ALDOSE REDUTTASI/ DNR e DOX

$E_i_{DNR} = -15.1 \text{ kcal/mol}$

$E_i_{DOX} = -14.7 \text{ kcal/mol}$



Risultati dei calcoli di docking

MIFs (Molecular Interaction Fields) di GRID descrive correttamente le interazioni tra le reduttasi NADPH-dipendenti e i loro ligandi.

Solo nel caso della CBR1 il "global minimum" coincide con l'orientamento di DOX e DNR richiesto dalla riduzione confermando l'evidenza sperimentale per cui questo enzima è quello che riduce più efficacemente i due farmaci.

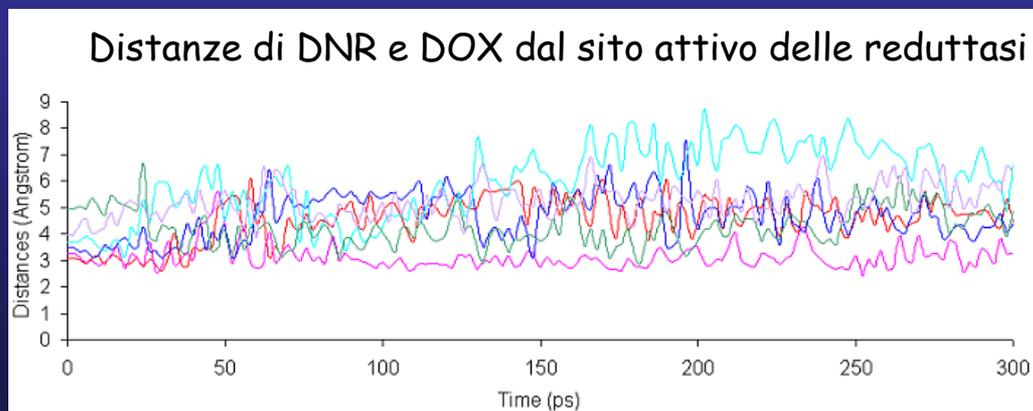
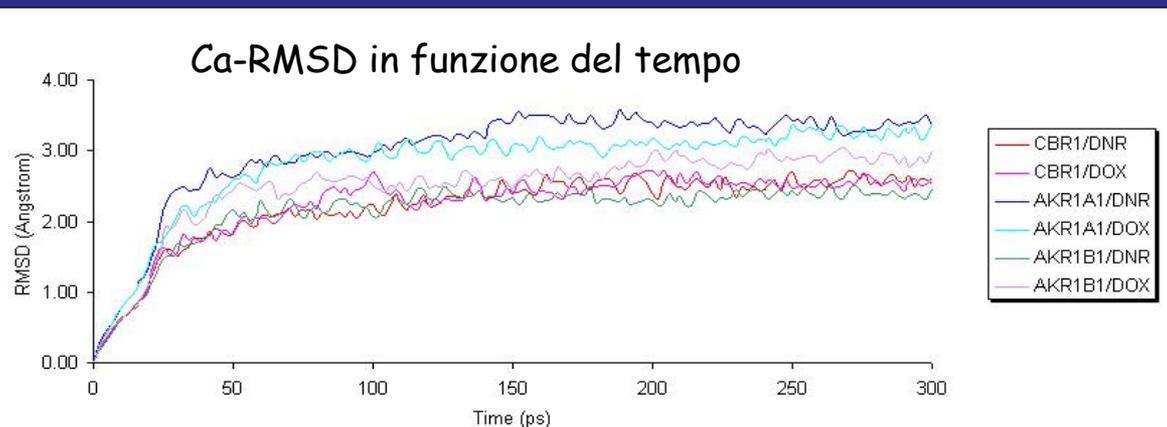
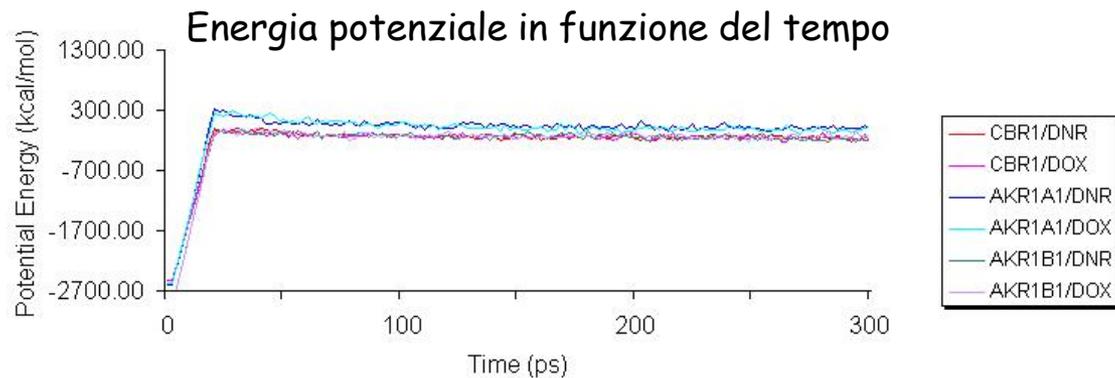
In accordo con i dati sperimentali la DNR viene ridotta con più efficienza rispetto alla DOX da ognuno dei tre enzimi.



CHARMM

Simulazioni di dinamica molecolare

*Valutazione della stabilità dei complessi ottenuti dal docking
Ottimizzazione strutturale dei complessi ottenuti dal docking
Flessibilità della proteina
Valutazione del "fit"-indotto*



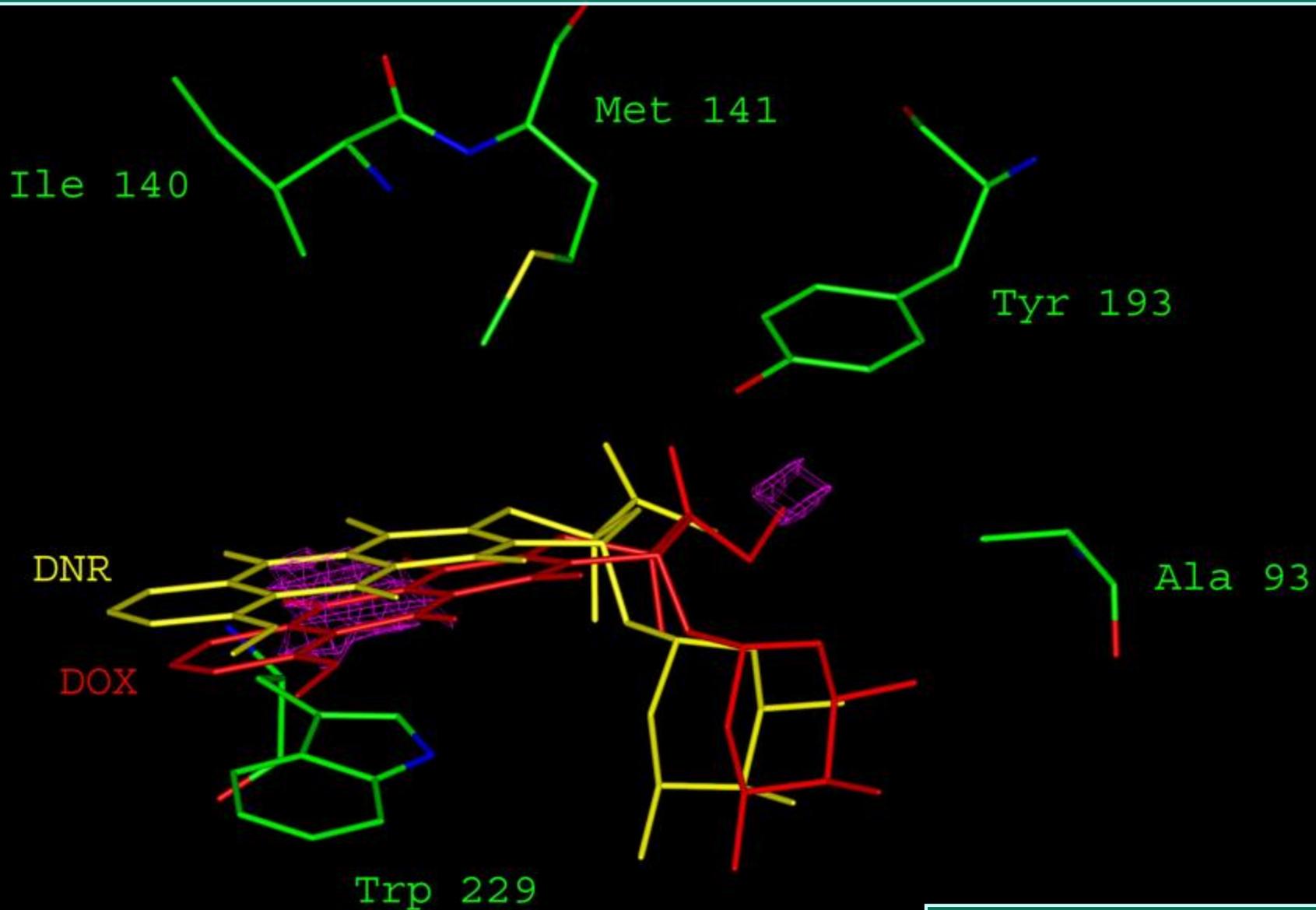
Risultati di dinamica molecolare

Le simulazioni di dinamica molecolare "unconstrained" confermano la stabilità dei complessi ottenuti dal docking molecolare.

L'analisi delle traiettorie di dinamica molecolare confermano che DNR e DOX sono migliori substrati per CBR1 che per AKR1A1 e AKR1B1.

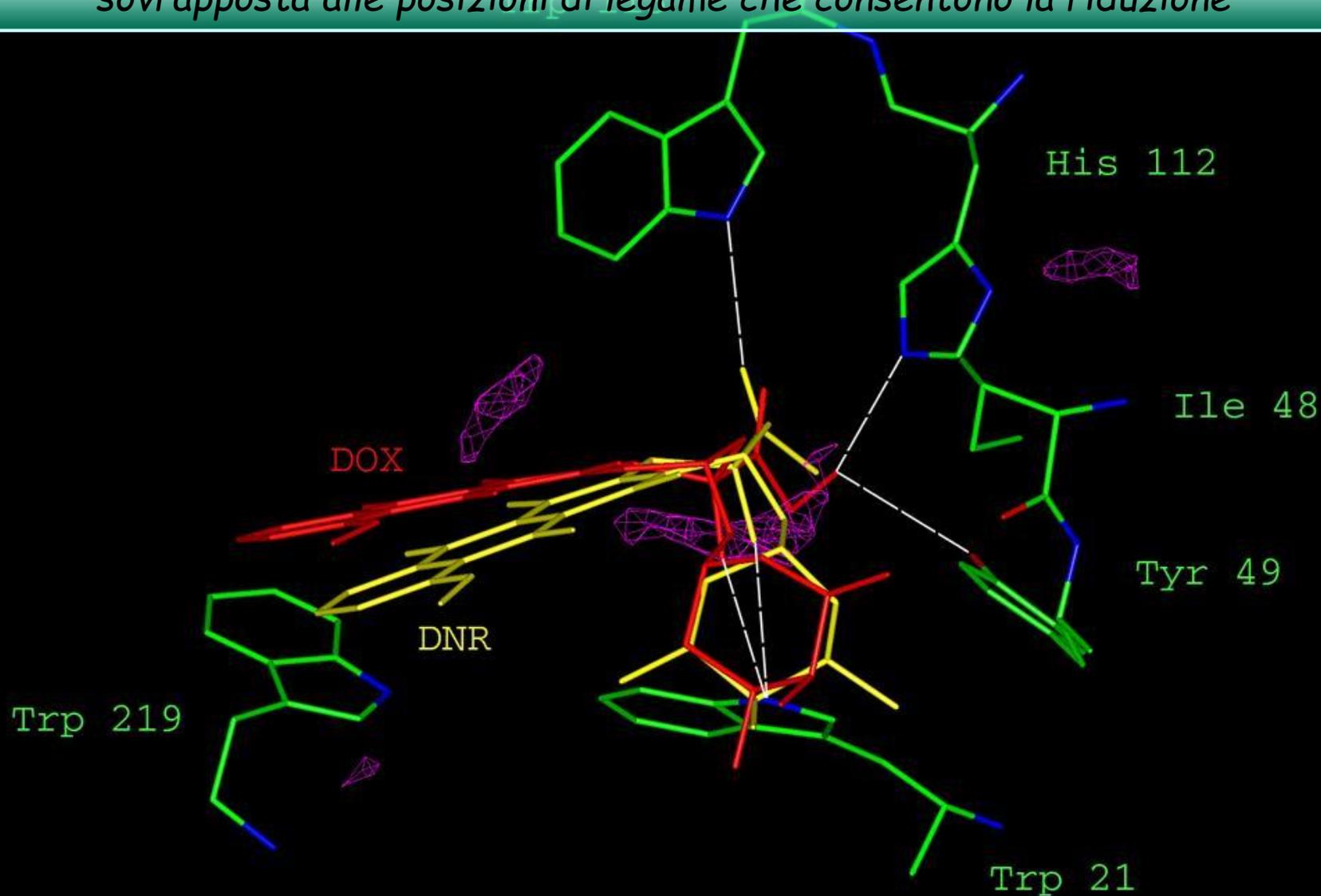


DRY "isocontour map" calcolata da GRID nel sito attivo della carbonil reduttasi



$E = -1.5 \text{ kcal/mol}$

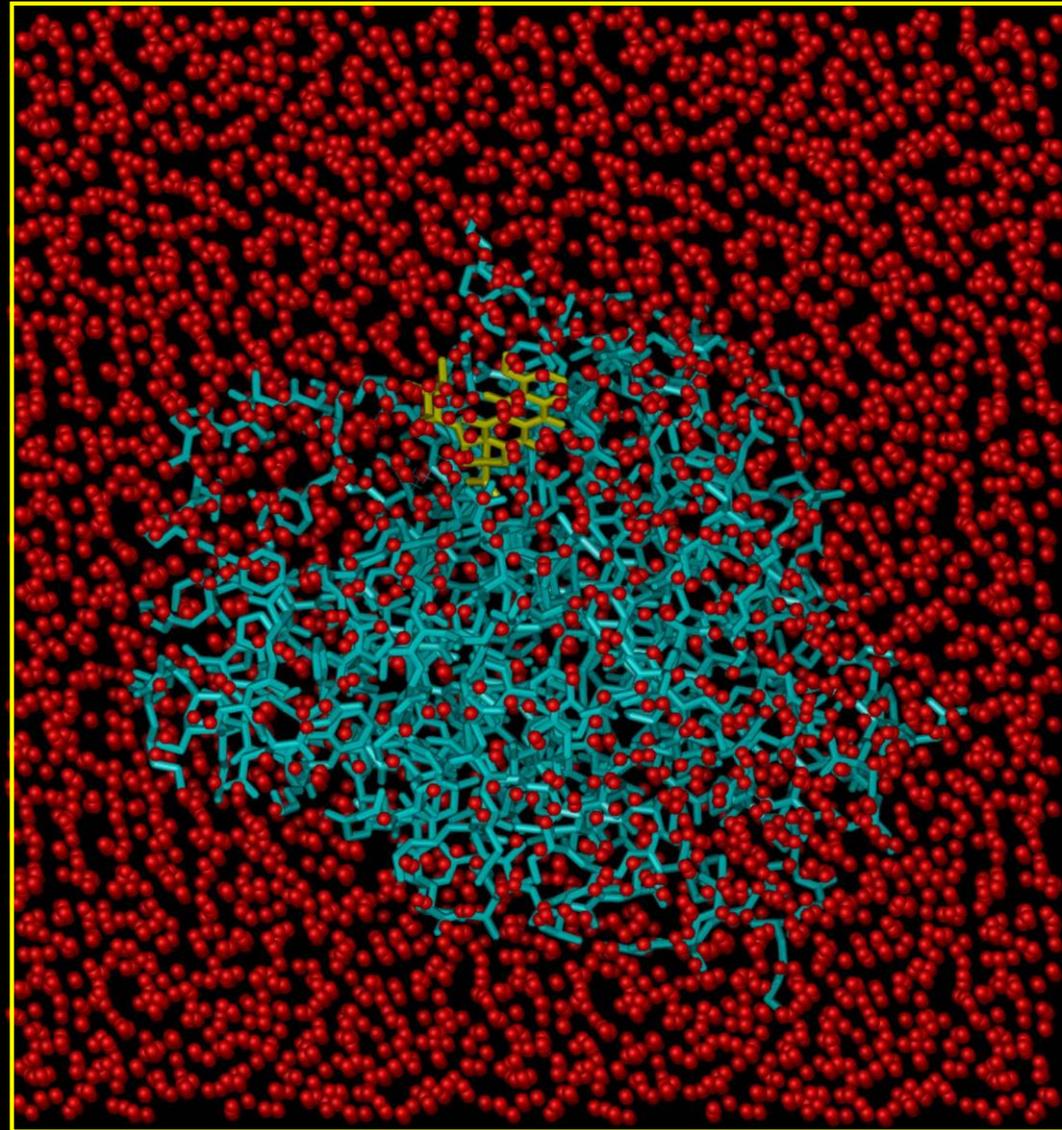
DRY "isocontour map" calcolata da GRID nel sito attivo di aldeide reduttasi sovrapposta alle posizioni di legame che consentono la riduzione



$E = -1.5 \text{ kcal/mol}$

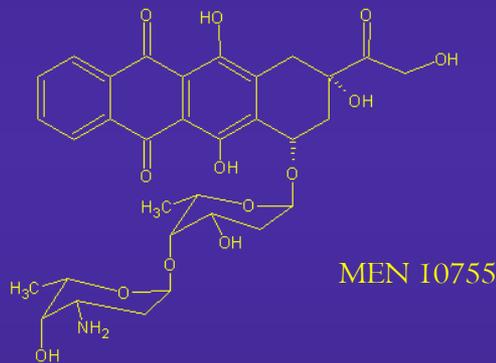
"Molecular dynamics" (MD) dei complessi della carbonil reduttasi

- 1 ns di MD
- PBC:
70x70x65 Å
~ 9000 molecole di acqua
- Time step: 2fs
(SHAKE constraints)



Risultati delle MD (1 ns) dei complessi della CBR1

- I residui di Trp del sito attivo di CBR1 hanno un ruolo cruciale nel dirigere DNR e DOX verso il sito attivo delle reduttasi.
- Il gruppo OH alcolico in C4' della daunosammina forma un legame idrogeno con l'N di backbone della Val 95 della CBR1 stabile per tutta la durata della MD.



- Il gruppo OH alcolico in C9 dell'anello tetraciclico forma un legame idrogeno con l'N dell'anello indolico del Trp 229 della carbonil reduttasi stabile per tutta la durata della MD.

Informazioni strutturali



disegno di antracicline meno cardiotoxiche

Costruzione del farmacoforo di un potenziale inibitore

Rational Drug Design

Docking di un set di strutture aromatiche e idrofobiche nelle reduttasi citosoliche

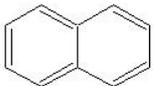
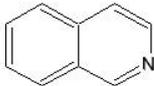
Calcolo dell'energia d'interazione tra tutti i probes di GRID e le reduttasi



FARMACOFORO:

*Struttura planare aromatica con energia più favorevole
+
Probes di minimo assoluto trovati da GRID*

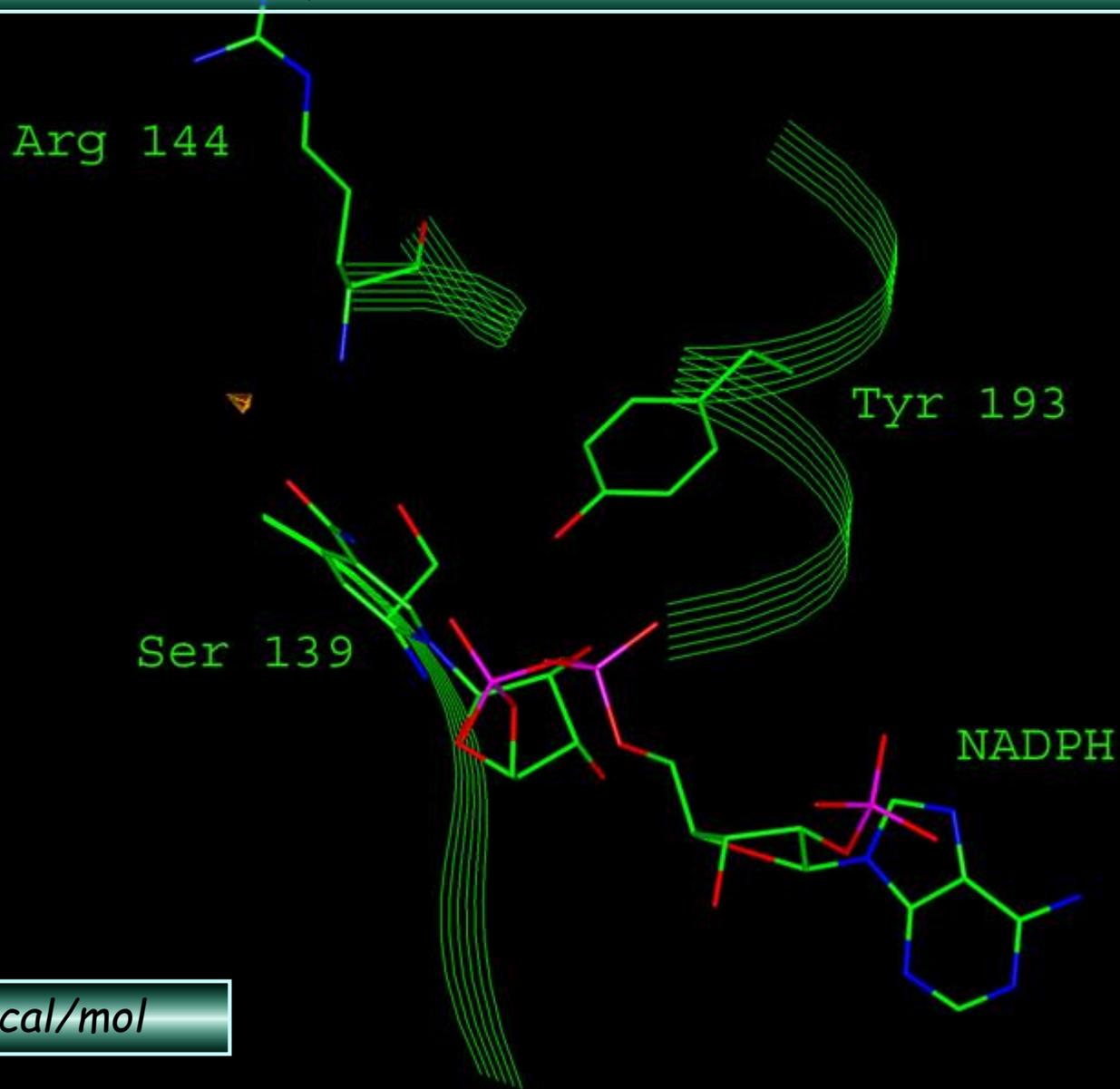
Strutture planari cicliche ed eterocicliche con energie di interazione (kcal/mol) più favorevoli

Frammento	CBR1	AKR1A1	AKR1B1
 Naftalene	-13.76	-12.19	-9.92
 Isochinolina	-12.14	-11.33	-8.60

Probes con le energie di interazione (kcal/mol) più favorevoli

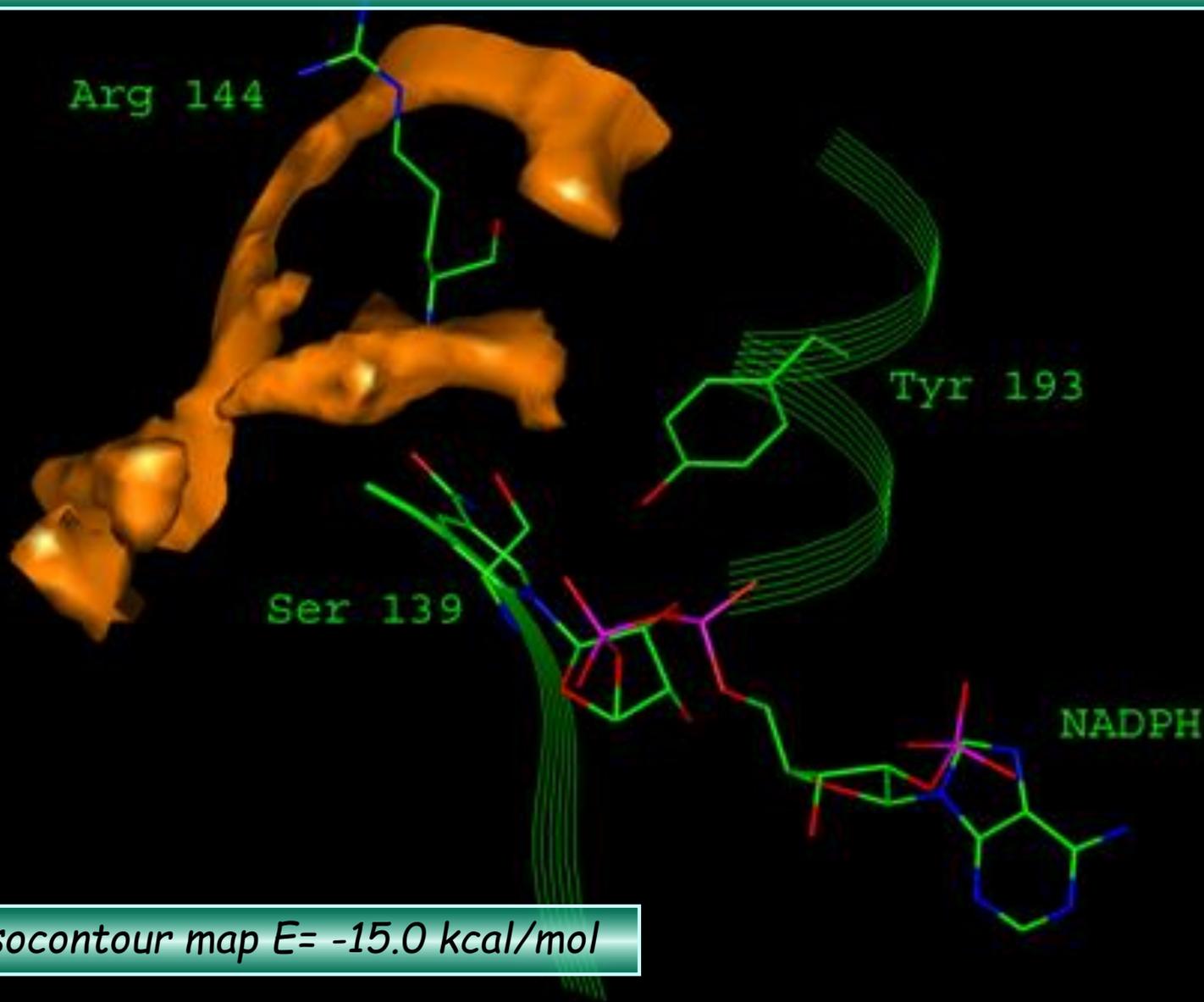
PROBE	CBR1	AKR1A1	AKR1B1
Fosfato	-25.3	-19.4	-13.4
Bromo organico	-8.3	-10.5	-5.4
Carbossilato	-16.4	-16.9	-13.8
OH alcolico	-15.6	-15.3	-14.6
Azoto NH ₂ planare neutro	-15.3	-14.8	-16.2

PO4 "isocontour map" calcolata da GRID nel sito attivo di CBR1



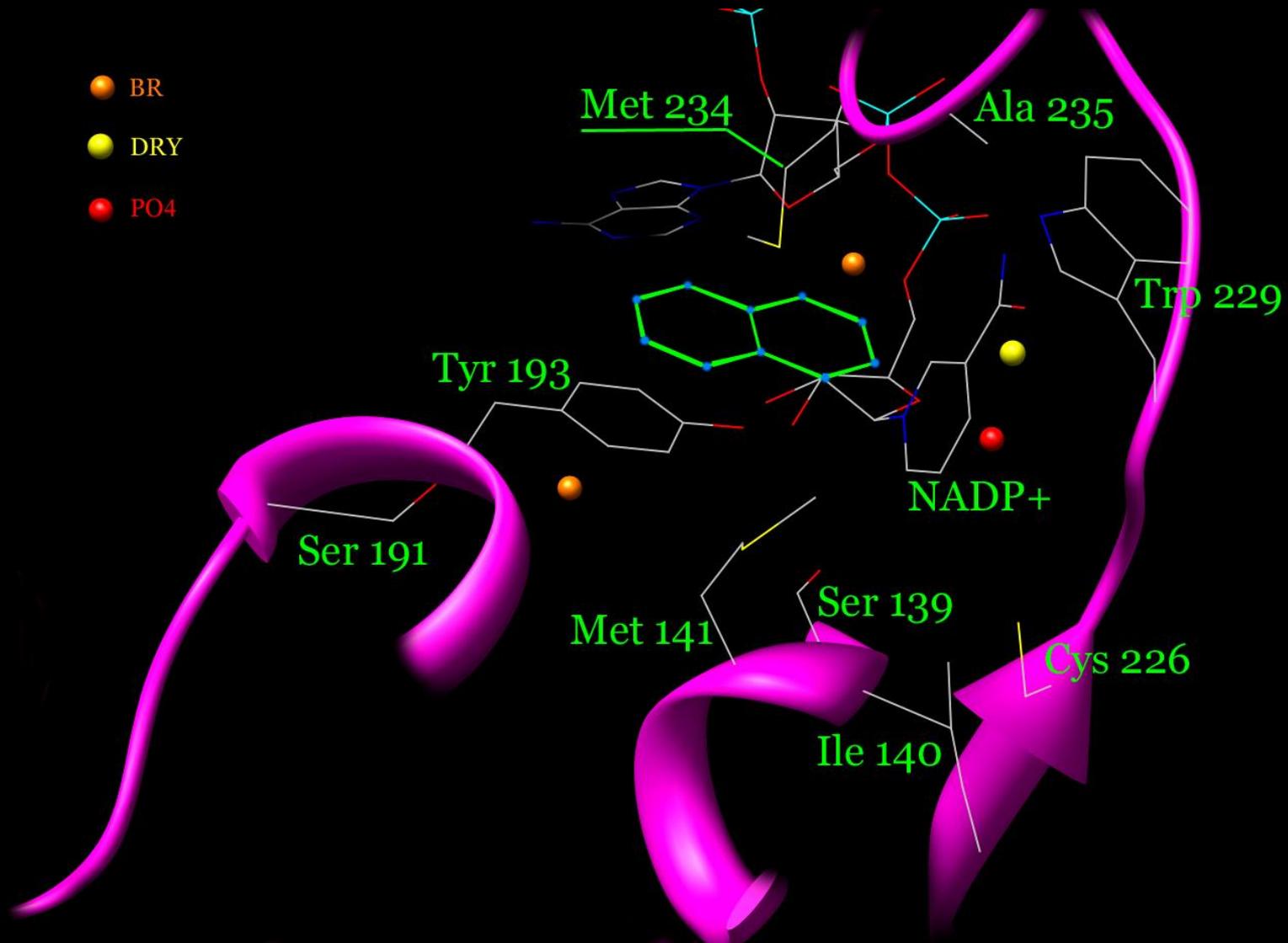
$E = -24.5 \text{ kcal/mol}$

PO4 "isocontour map" calcolata da GRID nel sito attivo di CBR1



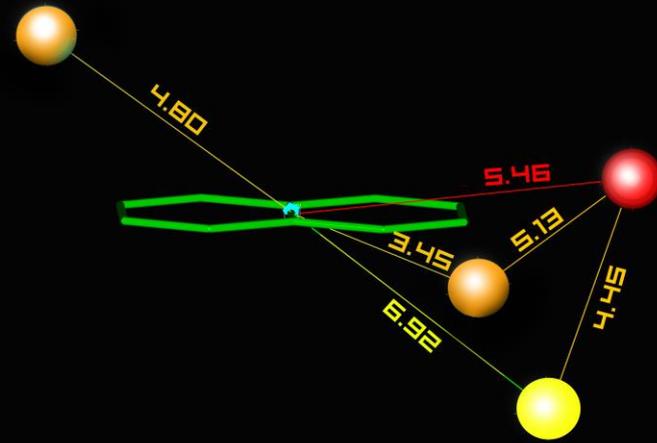
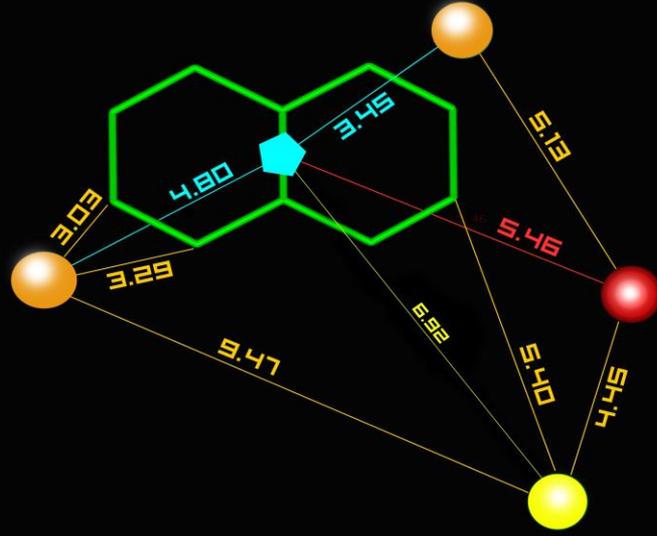
PO4 isocontour map $E = -15.0$ kcal/mol

Farmacoforo posizionato all'interno della tasca del sito attivo



Geometria del farmacoforo

- PO4
- DRY
- BR



CONCLUSIONI

- Questo lavoro di chimica computazionale rappresenta il primo tentativo di definire a livello tridimensionale le interazioni tra le antracicline e gli enzimi responsabili della loro riduzione
- Utilizzando il programma GRID e i metodi di simulazione di dinamica molecolare siamo stati in grado di identificare le regioni chiave del sito attivo che sono necessarie per il legame di DNR e DOX alle reduttasi.
- La stima delle energie d'interazione ha evidenziato come, in accordo con i dati biochimici riportati in letteratura, la CBR1 abbia una migliore efficienza catalitica per le antracicline rispetto alle aldo-cheto reduttasi e come la daunorubicina sia migliore substrato rispetto alla doxorubicina.

CONCLUSIONI

- Questo importante risultato computazionale ci ha portato ad individuare nella CBR1 il target principale delle nostre investigazioni.
- Le simulazioni di dinamica molecolare dei complessi formati dalla CBR1 hanno fornito una rappresentazione dettagliata delle interazioni antraciclina-reduttasi che può costituire la base strutturale per uno studio di “drug design” diretto al disegno di nuove antracicline con minore affinità per le reduttasi e quindi meno cardiotoxiche.
- La caratterizzazione del sito di legame dei due farmaci nelle reduttasi NADPH-dipendenti ci ha fornito le informazioni necessarie per progettare il farmacoforo di un inibitore specifico per la CBR1, la reduttasi citosolica più efficiente nei confronti di DOX e DNR .