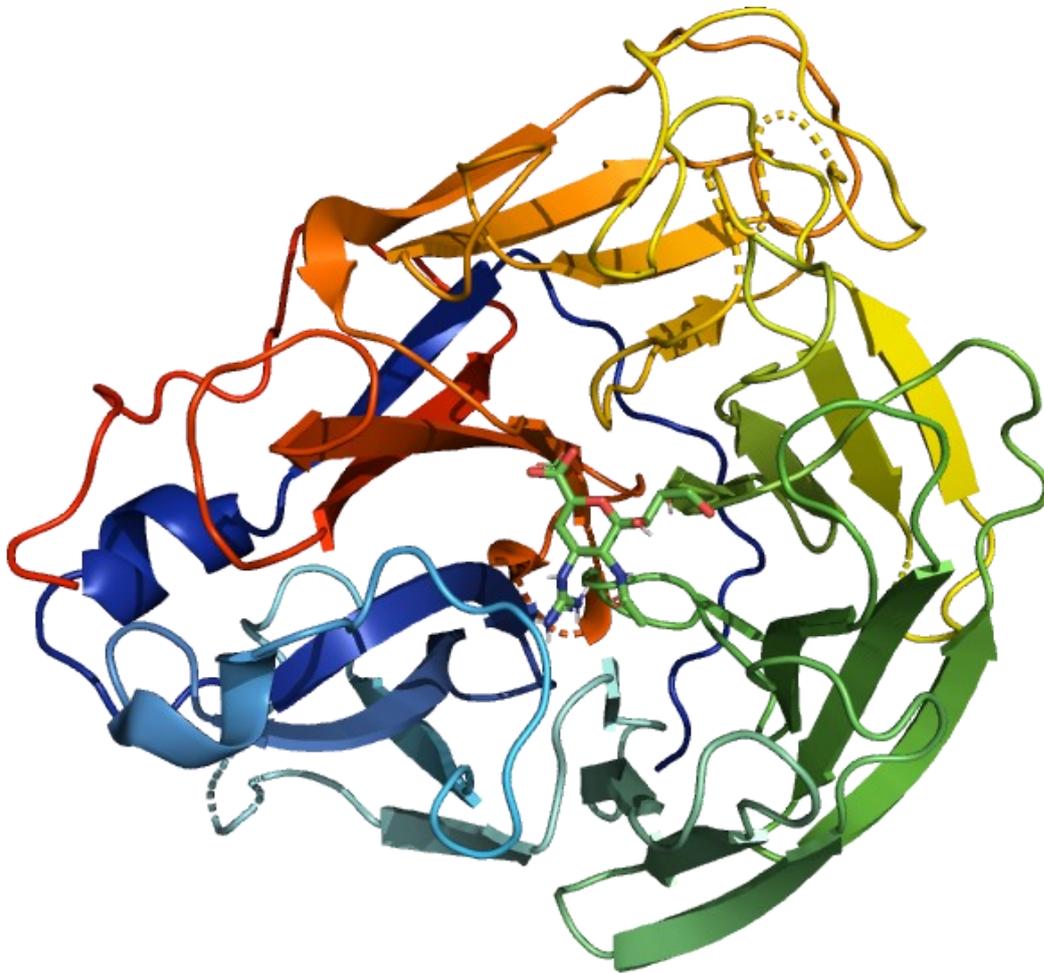


Basile Giuseppe Stefano

Approfondimento liberamente ispirato ai temi dell'elaborato per l'Esame di Stato

Sulle eso- α -sialidasi influenzali e sui loro principali inibitori



L'apporto del docking molecolare nella progettazione razionale di farmaci antivirali.

1. Introduzione

Nella progettazione razionale di un farmaco (Vedi sezione 6), si tende a lavorare ottimizzando gli sforzi dei ricercatori nell'ideare e individuare nuove molecole biologicamente attive mediante la comprensione dei meccanismi biochimici e fisiologici che sono alla base della patologia da trattare.

In questa ottica, le principali fasi di progettazione iniziale coinvolgono:

- a) lo studio approfondito delle vie biochimiche e delle basi molecolari della patologia sotto analisi (per lo più si tratta dell'individuazione di proteine da inibire o inattivare),
- b) l'ideazione di nuovi farmaci sulla base delle strutture molecolari con cui dovranno interagire,
- c) lo studio delle vie metaboliche che potrebbero essere modificate da eventuali farmaci funzionanti e le biotrasformazioni a cui gli xenobiotici in questione vanno incontro,
- d) lo studio delle vie di sintesi chimica o biotecnologica necessarie alla produzione materiale dei migliori candidati individuati mediante screening e docking molecolare.

Tenendo a mente che, successivamente alle fasi di progettazione, si deve fare testo alla sperimentazione *in vitro* e *in vivo*, un valido supporto nello studio di nuove molecole a scopo farmaceutico sono le simulazioni *in silico*, ovvero mediante l'utilizzo di simulazioni al computer.

L'applicazione dei dati di ricerca *in silico* alla sperimentazione laboratoriale e clinica è ormai diventato il presente della ricerca farmaceutica, e di certo rappresenterà anche una vasta porzione del suo futuro. Nel caso di questo elaborato, si propone una breve trattazione dell'applicazione dei programmi di docking molecolare proteina-ligando alla progettazione di farmaci antivirali.

Il docking molecolare non è altro che una simulazione dell'interazione proteina-ligando all'interno di un sito attivo o comunque di un sito di legame (Binding-Site, abbreviato in BS), nel quale, mediante l'uso di funzioni di scoring e dell'approssimazione delle interazioni polari e apolari data dai force-field (parametri che approssimano l'energia potenziale di un sistema di particelle), si riesce ad ottenere una serie di conformazioni del ligando (Binding modes) che abbiano la più forte interazione possibile con il BS dell'enzima.

In questa maniera si possono analizzare nello specifico le migliori "posizioni di legame" tra eventuali farmaci e proteine bersaglio, basando l'analisi del complesso recettore-ligando sulla conformazione tridimensionale e sulle proprietà polari e apolari del sito di legame. Per questi motivi, nell'ottica della progettazione di nuovi farmaci, assumono un'importanza fondamentale le caratteristiche strutturali dei complessi enzima-substrato ed enzima-inibitore, che possono essere ottenute mediante diffrazione a raggi X o microscopia elettronica.

2. I substrati delle sialidasi: derivati dell'acido neuraminico

Per comprendere meglio i meccanismi alla base dell'attività degli antivirali per influenza A e B, bisogna quindi scendere nei dettagli dei meccanismi di azione di uno dei due antigeni superficiali di questo virus: la glicoproteina neuraminidasi (NA), ovvero un'eso- α -sialidasi di origine virale.

Per poter parlare in maniera esaustiva della terapia farmacologica di influenza A e B, causate entrambe da degli Orthomyxoviridae, bisogna comprendere

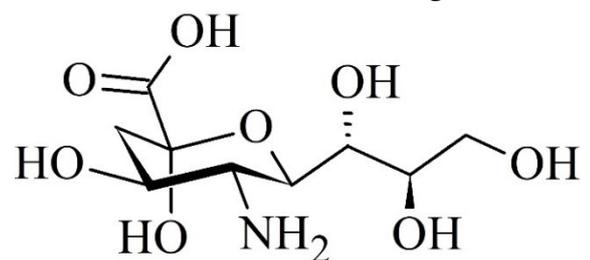


Figura 1, Acido neuraminico

innanzitutto come avvengono il processo di adsorbimento e il rilascio dei virioni a ciclo virale compiuto. Quest'ultima fase del ciclo di replicazione, cruciale perché i virus replicati possano infettare altri ospiti, è mediata dall'enzima neuraminidasi, che presenta un substrato molto particolare: i derivati dell'acido-N-acetilneuraminico (N-Acetyl-Neuraminic-Acid, abbreviato in NANA, Figura 2) in posizione terminale rispetto alle catene di oligo- e polisaccaridi legati alle proteine di membrana delle cellule ospiti.

Il NANA, più in genere, è il principale esponente di una famiglia piuttosto vasta di monosaccaridi, gli acidi sialici.

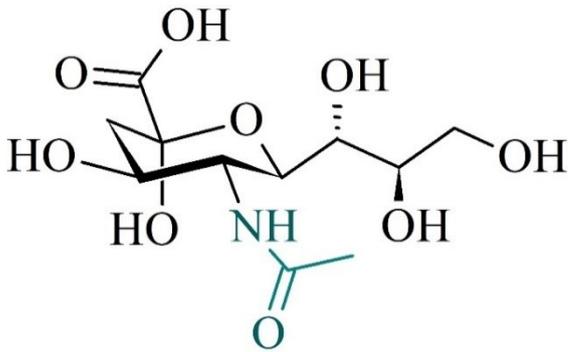


Figura 2, Acido N-acetilneuraminico

Nella terminologia comune, è ricorrente l'utilizzo del nome acido sialico per riferirsi espressamente al NANA, ma nella realtà, la famiglia di questi amminozuccheri è più complessa.

Strutturalmente, possiamo riassumerla come l'insieme di tutti i derivati N- ed O- sostituiti dell'acido α -neuraminico (Neu), un derivato carbossilico di amminozucchero che presenta la struttura in Figura 1 (la numerazione, non esplicitata, parte dall'eteroatomo O).

Essendo un derivato del Neu, il NANA è spesso riportato come Neu5Ac, per indicare come sia N-acetilato (evidenziato in blu nella Figura 2) in posizione 5.

A pH fisiologico umano ($\approx 7,4 \pm 0,5$), Neu5Ac è carico negativamente, in quanto il gruppo carbossilico è deprotonato.

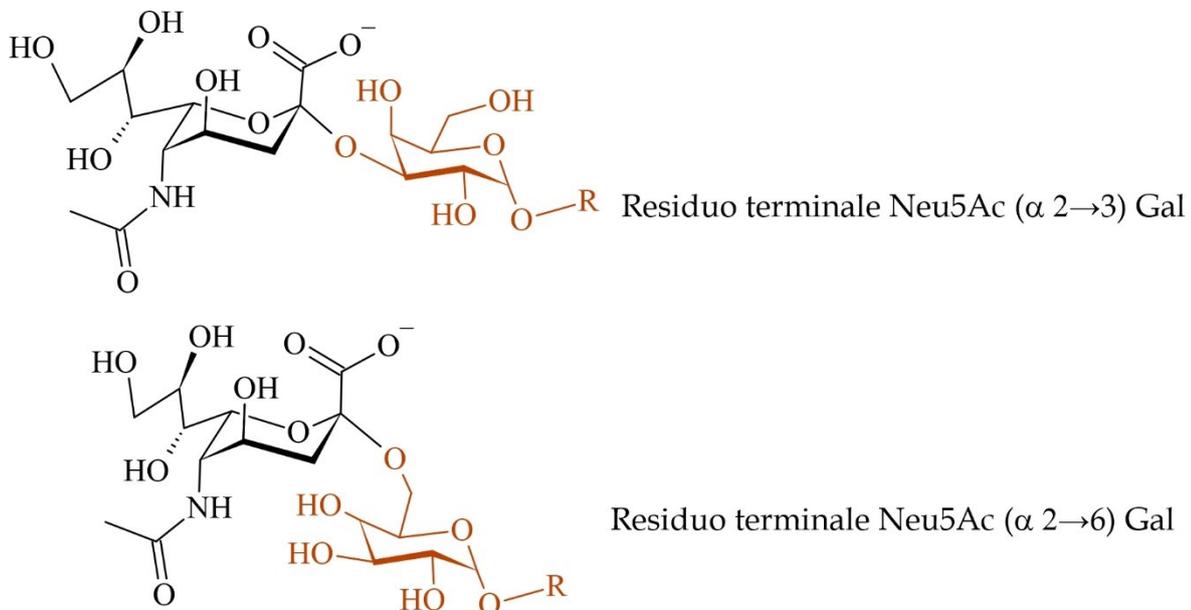


Figura 3, Differenti tipologie di legame glicosidico tra Neu5Ac terminale e galattosio. Entrambe le strutture sono espresse negli epitelii delle vie respiratorie, ma in zone tissutali diverse.

L'acido sialico più ricorrente nei mammiferi, e quindi anche nell'uomo, è proprio Neu5Ac, presente alle estremità delle proteine glicosilate secondo le strutture in Figura 3, dove R è il

proseguire di una catena oligo- o polisaccaridica che si lega ad una proteina di membrana o a un lipide. È facile notare come il legame glicosidico in cui Neu5Ac è coinvolto possa risultare diverso da cellula ospite a cellula ospite. Vi possono essere infatti NANA che si legano ad altri monomeri mediante formazione di un legame acetalico (glicosidico) α 2→6 e altri che lo fanno mediante legame α 2→3 (in riferimento ai recettori espressi negli epitelii delle vie respiratorie).

È più raro trovare residui terminali di Neu5Ac coinvolti in legami α 2→8, cosa invece piuttosto comune negli acidi oligo- e poli-sialici.

I virus influenzali A e B, si adsorbono al NANA mediante la glicoproteina HA (emoagglutinina), formando un complesso proteina-ligando molto stabile, il quale agevola successivamente la fusione del pericapside alla membrana.

Per poter portare a termine il ciclo di replicazione virale, vi è però la necessità che le estremità di NANA dei polisaccaridi espressi sulla membrana citoplasmatica (a cui altrimenti si legherebbe l'HA dei virioni in uscita), vengano idrolizzate per via enzimatica da una sialidasi, per permettere così il rilascio dei virus replicati.

3. L'idrolisi dei glicosidi di acidi sialici: la famiglia delle Sialidasi.

Le sialidasi, spesso citate come neuraminidasi, sono enzimi del tipo glicoside idrolasi, noti anche come glicosidasi (Enzyme Commission Number 3.2.1, abbreviato in E.C. 3.2.1) che in generale catalizzano l'idrolisi di legami O- ed N- glicosidici in substrati più o meno complessi.

Nello specifico, le sialidasi catalizzano la rottura del legame glicosidico tra residui di acidi sialici e altri monosaccaridi o tra diverse molecole di acidi sialici all'interno di acidi oligo- e poli-sialici.

Si tratta dunque di proteine ad azione catalitica, espresse per lo più sulla superficie di patogeni procariotici e virali (si veda l'NA dei sopracitati virus influenzali) ma che sono state isolate e studiate anche in cellule di mammifero (sottotipi da NEU1 a NEU4 nell'uomo).

Anche se agiscono tutte su legami di tipo α -glicosidico, esistono sialidasi di diversa natura, in base alla posizione del legame di cui catalizzano l'idrolisi all'interno della catena polimerica.

I legami glicosidici presenti in natura tra residui sialosidici e altri monosaccaridi possono essere idrolizzati sia a livello delle estremità non riducenti terminali, sia, negli acidi polisialici, a livello di un legame glicosidico casuale all'interno del substrato (non necessariamente terminale).

Nello specifico, in base a queste caratteristiche, si distingue rispettivamente tra eso- α sialidasi (E.C. 3.2.1.18) ed endo- α -sialidasi (E.C. 3.2.1.129).

Le endo- α -sialidasi, a volte riportate erroneamente come endo-N-acetylneuraminidasi, operano in maniera casuale sui legami α 2→8 all'interno di catene di acidi oligo- e poli-sialici. In questa trattazione, avendo rilievo marginale, non verranno ulteriormente approfondite.

Le α -sialidasi, invece, sono in grado di catalizzare solo l'idrolisi dei legami $\alpha 2 \rightarrow 3$ o $\alpha 2 \rightarrow 6$ e $\alpha 2 \rightarrow 8$ glicosidici dei residui terminali di Neu5Ac (e di altri acidi sialici, in base al substrato impiegato).

Con particolare riferimento alle sialidasi influenzali, ovvero alle glicoproteine di superficie neuraminidasi (NA) di Influenza Virus A e B, si può fare una accurata analisi di quali siano i geni associati alla loro espressione, le strutture e i siti di cui si compongono e il meccanismo di catalisi.

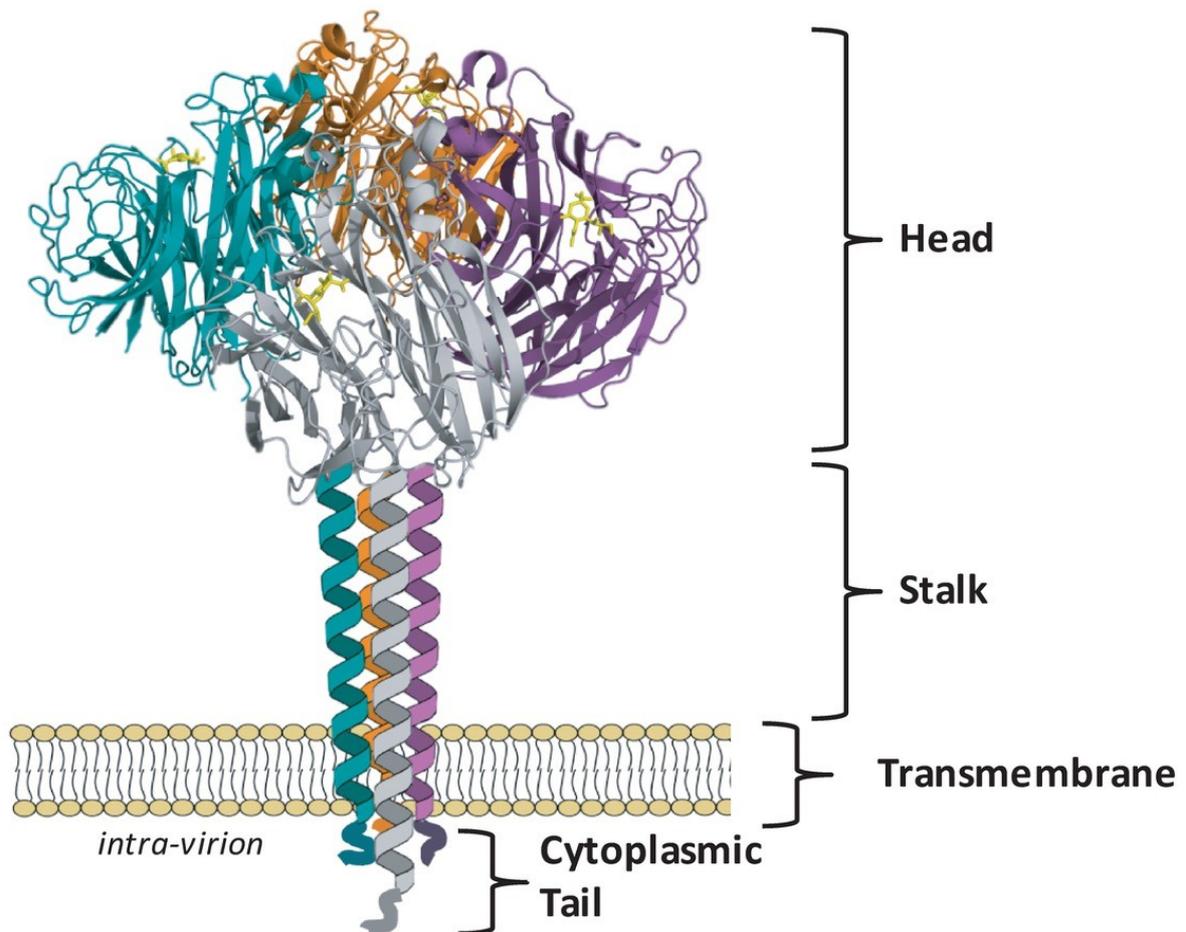


Figura 4, Rappresentazione della struttura dell'enzima, con evidenziati i 4 domini catalitici.

3.1 Localizzazione dell'enzima.

Innanzitutto, si può partire dalla localizzazione di questi enzimi nella architettura virale. Si tratta infatti di proteine di superficie, il cui dominio catalitico è esposto all'esterno del pericapside.

Per molti aspetti vi sono analogie tra le proteine di superficie virali e cellulari, in quanto le prime condividono quasi sempre la struttura fosfolipidica su cui sono espresse con le seconde (si ricorda a tal proposito che le membrane citoplasmatiche e dell'apparato di Golgi sono le strutture cellulari che danno origine agli envelope, o pericapsidi, per passaggio del virione nudo attraverso la struttura a doppio strato fosfolipidico).

3.2 Struttura delle eso- α -sialidasi virali

Le neuraminidasi virali hanno un peso molecolare di circa 240 kDa e posseggono un totale di 4 domini distinti.

In particolare: ancorato alla membrana si trova un dominio detto "coda citoplasmatica" (cytoplasmatic tail), che si lega alla struttura lipidica della porzione interna del pericapside. Tale struttura, prosegue nella "regione transmembrana" (transmembrane region), che come suggerisce il termine, corrisponde al dominio che attraversa da parte a parte il mosaico fluido dei fosfolipidi.

A questa struttura, si lega la prima porzione dell'ectodominio, dalla tipica forma di uno stelo allungato (stalk), che si protende verso l'esterno e culmina nelle quattro subunità del dominio catalitico (catalytic head).

Il dominio catalitico appena citato è formato da un omotetramero di 4 subunità identiche, che si associano al gambo in una tipica struttura fungiforme.

Sulla superficie di queste quattro subunità, sono localizzati i siti attivi (solitamente uno per catena polipeptidica). Si tratta di larghe cavità che ospitano i residui amminoacidici a funzione catalitica dell'enzima e sono presenti in maniera simile all'interno di tutti i sottotipi delle sialidasi correlate alla patogenesi dell'influenza.

Ogni subunità dell'ectodominio è composta da sei β -foglietti (ognuno formato da 4 β -filamenti antiparalleli) organizzati in strutture che ricordano le pale di un'elica. La struttura tridimensionale del monomero che ne deriva è determinata anche da ponti disolfuro in numero variabile, che agiscono stabilizzando e connettendo tra loro le strutture dei β -foglietti.

Il prodotto della reazione di idrolisi, il Neu5Ac, può essere isolato in un complesso enzima-prodotto all'interno del sito attivo, ma in condizioni normali se ne distacca, liberando il prodotto, e permettendo così l'inizio di una nuova reazione.

Il sito attivo precedentemente citato è posto sulla superficie esterna laterale delle subunità, e presenta un grande (e inusuale) numero di residui amminoacidici carichi. I residui che interagiscono direttamente con Neu5Ac sono conservati senza variazioni in quasi tutti i sottotipi di NA virale, spesso anche in caso di antigenic drift.

In natura l'attività dell'enzima avviene esclusivamente quando il dominio catalitico è presente in forma di omotetramero, seppure sia stata osservata attività catalitica delle singole subunità in forme mutanti dell'enzima,

Nel corso delle ricerche per comprendere il meccanismo di catalisi, si è scoperta la presenza all'interno di questi enzimi di ioni calcio come cofattori.

È possibile trovare tali cationi complessati in posizioni di legame diverse.

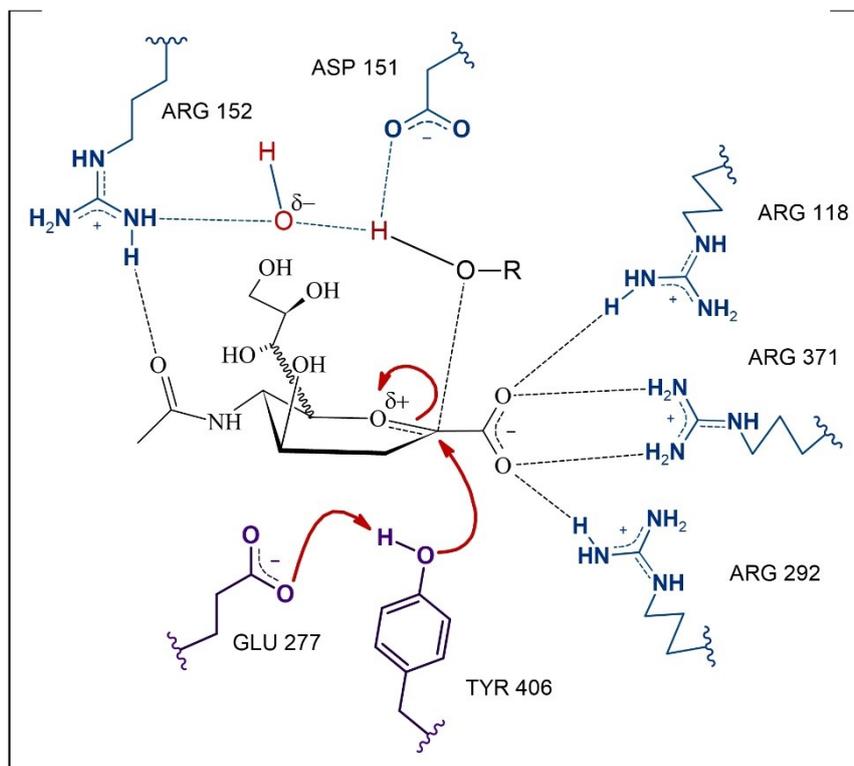
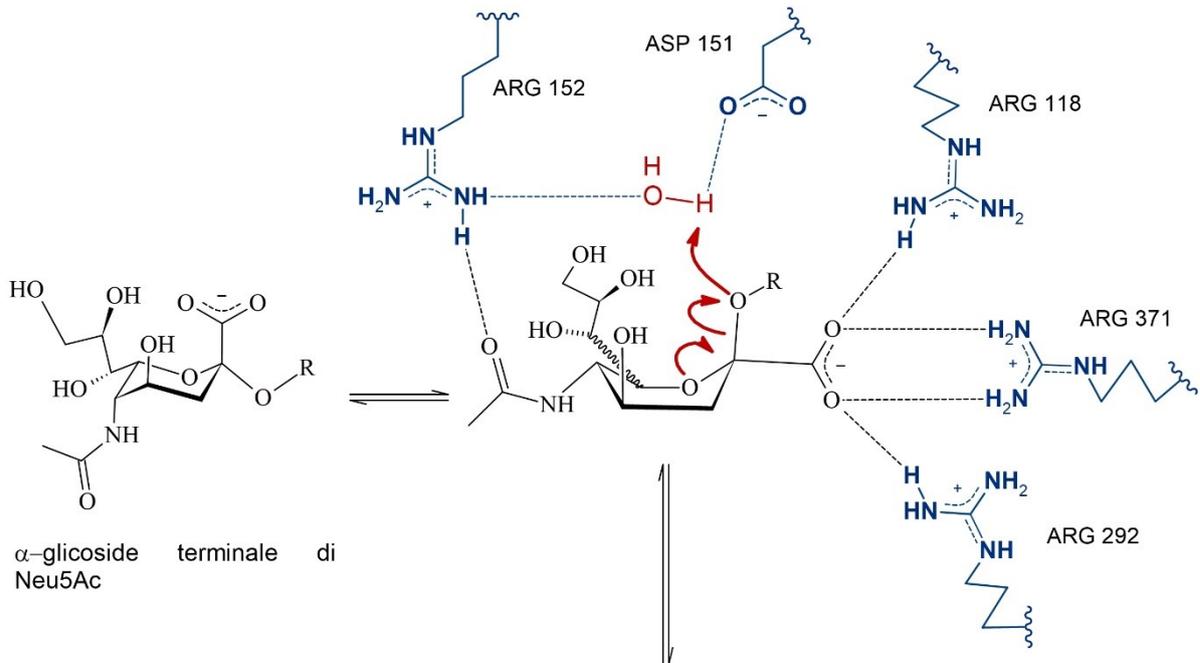
Nella prima posizione, si può trovare il Ca^{2+} coordinato da svariati residui amminoacidici, posti vicino al sito attivo in ogni subunità.

Una seconda posizione di legame per lo ione Ca^{2+} è presente all'intersezione tra gli assi di simmetria che individuano le quattro subunità dell'ectodominio.

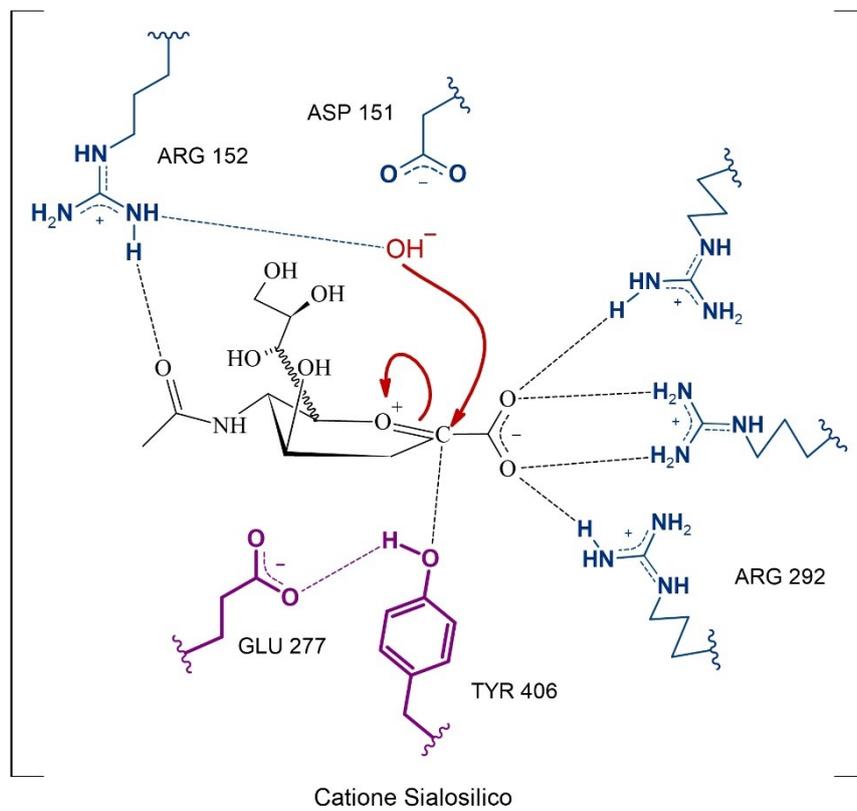
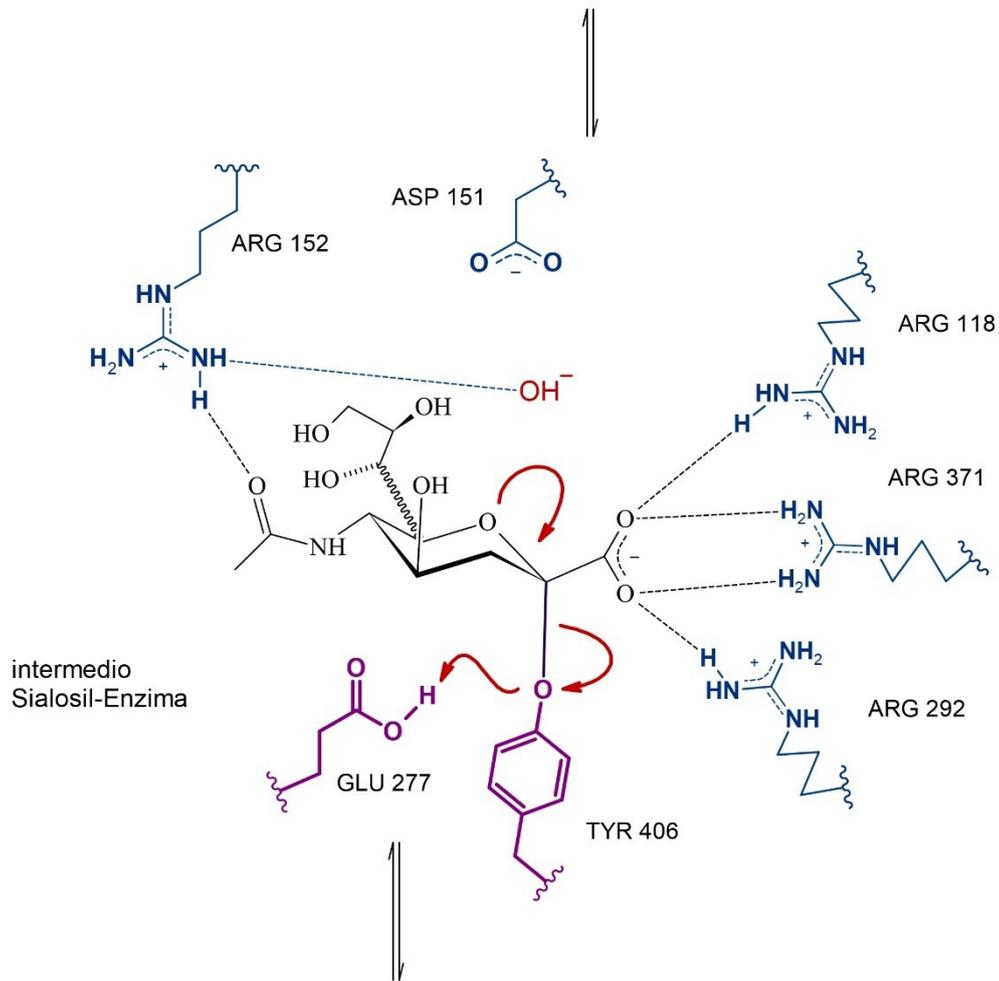
Il ruolo dello ione calcio nella attività enzimatica non è tuttora ben chiaro, ma l'ipotesi più probabile è che abbia implicazioni nella regolazione allosterica dell'enzima, modulandone

positivamente l'attività. Secondo altre ipotesi, potrebbe contribuire a rendere termostabile la struttura proteica e promuovere il mantenimento dell'attività del sito attivo, ricco di residui amminoacidici carichi.

4. Idrolisi di sialosidi terminali: proposte più accreditate di meccanismi di reazione



Transizione verso il catione sialosilico con distacco di -OR da Neu5Ac. Non si evidenzia l'intermedio cationico per semplicità di notazione. Si evidenzia l'attacco nucleofilo mediato da TYR 406 per la formazione dell'intermedio covalente.



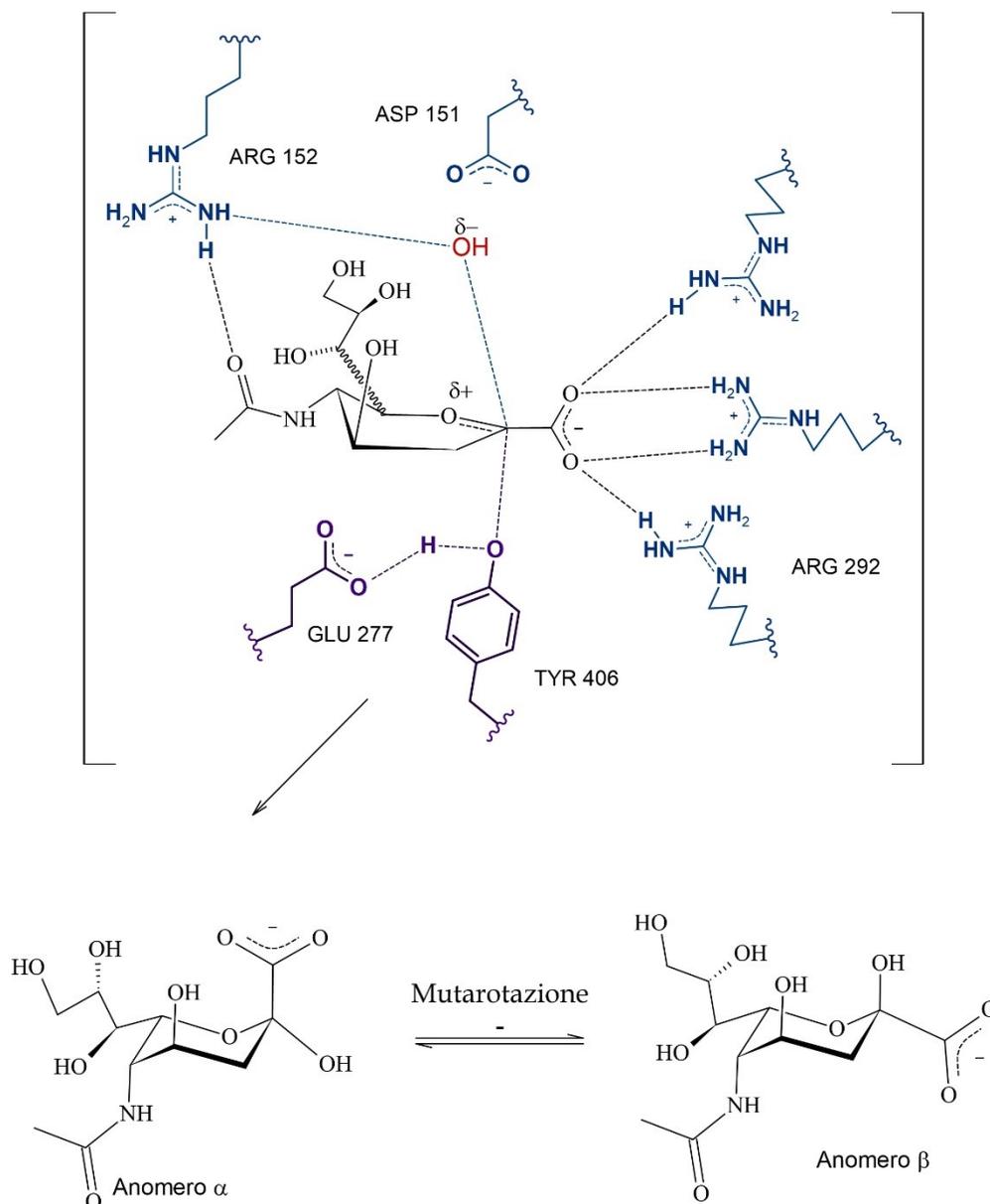


Figura 5, Modello proposto di reazione

Nota: Il modello qui riportato si avvale per la descrizione dello stereocentro del C6 di legame stereochimico indefinito, in quanto la rappresentazione dell'anomero α sarebbe complicata e confusionaria con i metodi grafici utilizzati.

È noto da studi condotti *in silico* e *in vitro*, con l'aiuto di diffrazione a raggi X, che la reazione di idrolisi di glicosidi terminali di Neu5Ac procede in diversi passaggi, i cui punti critici sono la formazione del catione sialosilico e di un intermedio covalente.

Quanto riportato è un meccanismo proposto in accordo con le attuali evidenze scientifiche, ulteriori studi sono richiesti per provarne la validità assoluta, in quanto vi sono diverse possibilità sul procedere della reazione al di fuori dei dati propriamente accertati.

- 1) Il processo inizia con la conversione della struttura a sedia (2C_5 chair conformation), tipica degli anelli acetalici dei piranososi, in una meno comune conformazione a pseudo-barca (distorted boat), che presenta maggiori ingombri sterici ed è energeticamente sfavorita in una normale soluzione acquosa.

Questo processo è mediato dall'azione dei residui amminoacidici del sito attivo, che agiscono distorcendo la struttura a sedia attraverso legami a idrogeno, interazioni idrofobiche, formazione di ponti salini e di legami a idrogeno tra ligando, acqua e residui amminoacidici (comunemente detti water bridges, letteralmente "ponti d'acqua").

In particolare, sia grazie alle evidenze del docking molecolare eseguito sull'acido sialico, sia grazie ai dati in letteratura, si sono individuate le principali interazioni che stabilizzano la conformazione a pseudo-barca:

Ricoprono un ruolo fondamentale:

- a. Il cluster formato da ARG 318, ARG 371 e ARG 292, i cui cationi guanidinio (protonati a pH fisiologico) interagiscono in maniera molto forte con lo ione carbossilato di Neu5Ac, formando ponti salini e legami a idrogeno. Tale interazione è fondamentale poiché permette il passaggio del gruppo carbossilato dalla tipica posizione assiale alla sfavorita posizione equatoriale.
- b. L'ARG 152 (la cui attività è implicata anche nei successivi passaggi del meccanismo) che interagisce con l'ossigeno carbonilico del gruppo N-acetile.
- c. GLU 276 che interagisce mediante legami a idrogeno con i due ossidrili di C8 e C9, stabilizzando la struttura e impedendo che si formino ingombri sterici.
- d. TRP 178 e ILE 222, che interagiscono con la porzione apolare del gruppo N-acetile (interazioni idrofobiche).

Il resto delle interazioni non covalenti che si formano tra proteina e ligando sarà trattato nell'apposita sezione sul docking molecolare. Nelle immagini relative al meccanismo di reazione, si riportano soltanto il cluster di arginine e i residui direttamente interessati in meccanismi catalitici.

2)

- a. Nella seconda fase intermedia della reazione, in accordo con gli esperimenti di Taylor et al. , si propone un meccanismo di reazione nel quale le interazioni dei legami a idrogeno di ASP 151 e ARG 152 risultano di fondamentale importanza, potendo questi interagire con una molecola d'acqua e favorendo l'attacco da parte di un doppietto dell'ossigeno glicosidico nei confronti di un protone dell'H₂O. L'avvenire di tale processo (ovvero la creazione di un catione sialosilico), sarebbe energeticamente sfavorevole, ma risulta possibile grazie alla formazione di una rete di legami a idrogeno tra intermedio cationico, acqua e residui amminoacidici.
- b. Si noti che la proposta (a) è formulata assumendo l'ambiente di reazione come a pH fisiologico, anche se sono noti casi di eso- α -sialidasi stabili a pH fortemente acidi (si veda il tratto intestinale degli uccelli, nel quale virus come l'H5N1 dell'aviazione proliferano). A tale proposito, sono state avanzate proposte di meccanismi che coinvolgono una catalisi acido-base classica al posto dell'impiego di una molecola d'acqua in queste prime fasi della reazione chimica.

- 3) La terza fase del meccanismo proposto si basa sulle evidenze scientifiche ottenute da praticamente tutte le ricerche attualmente in letteratura e dall'attività accertata dei più comuni inibitori delle sialidasi virali.

Si prevede quindi, in questo passaggio, il distacco della catena poli-/oligosaccaridica (R-OH nello schema di reazione) dal sito attivo e la formazione di un ossocarbocatione ciclico stabilizzato dalle interazioni polari e apolari del sito attivo, tale intermedio è meglio noto come **catione sialosilico** e presenta una tipica conformazione tridimensionale a semi-sedia, con una porzione dell'anello resa planare dal doppio legame creatosi tra C2 e ossigeno emiacetalico (oltre che dalla rete di interazioni polari/apolari con i residui, questa struttura è anche stabilizzata per risonanza). Lo stadio di transizione tra le varie fasi di questo passaggio è stabilizzato dai residui del sito attivo e dalle molecole d'acqua.

- 4) Il modello proposto da Taylor et. al. diverge da quanto segue, poiché all'epoca della pubblicazione, non vi erano prove della creazione di un intermedio sialosilenzimatico, e fu ipotizzato solo che TYR 406 agisse come stabilizzatore del catione mediante interazioni polari.

Recentemente, però, a seguito degli esperimenti di inibizione covalente delle neuraminidasi con fluoroderivati di Neu5Ac (ref. Bibliografica: Vravricka et al., Von Itzstein et al.), è stato dimostrato in maniera definitiva che la formazione di un intermedio covalentemente legato all'enzima è un passaggio fondamentale del meccanismo enzimatico e che il residuo coinvolto in questo processo è TYR 406, sempre conservato in ogni sottotipo e isoforma virale dell'enzima. Tale residuo può essere inibito covalentemente in maniera efficace da analoghi fluorurati dell'acido sialico.

In accordo con la struttura tridimensionale del complesso tra sito attivo e catione sialosilico, TYR 406 è il residuo posto nella posizione più adeguata a formare un legame covalente mediante attacco nucleofilo al carbonio anomero C2.

Il meccanismo proposto prevede che ad attivare l'ossigeno nucleofilo sia GLU 277, in grado di deprotonare l'ossidrile fenolico di TYR406 e renderlo quindi un buon nucleofilo.

Il processo dovrebbe decorrere quindi con un ritorno temporaneo alla conformazione a barca (2C_5) dell'intermedio legato all'enzima, con il mantenimento di una forma α anomerica.

In tale maniera dovrebbe verificarsi inoltre la possibilità per ROH di distaccarsi definitivamente dal sito attivo, non essendo più coinvolto nella rete di interazioni polari tra intermedio e residui amminoacidici.

In parallelo, l'ossidrile che successivamente si dovrebbe legare al C2 risulta stabilizzato da ARG 152, in accordo con Taylor et. al.

- 5) Nel passaggio successivo, dunque, si verifica esattamente il passaggio inverso dell'attacco nucleofilo di TYR406, infatti il doppietto dell'ossigeno che collega enzima e intermedio strappa il protone che aveva precedentemente ceduto a GLU 277 (secondo meccanismo classico acido-base), portando al rigenerarsi del catione sialosilico e del residuo catalitico di tirosina. Si noti che qui è proposto un approccio

del tipo S_N1 , nel quale si hanno, in due fasi diverse: la rottura dell'intermedio e, come esposto di seguito, l'attacco nucleofilo dell'ossidrile sul C2. È proponibile anche un meccanismo differente, per il quale si ha l'attacco dell'ossidrile con approccio S_N2 , ma ciò presupporrebbe un'inversione di configurazione dell'anomero e perciò non sarebbe in linea con le evidenze della formazione finale di α -Neu5Ac.

- 6) L'ossidrile derivato dalla molecola d'acqua iniziale, stabilizzato dall'ARG 152 è in grado di attaccare il C2, con formazione del prodotto finale Neu5Ac in configurazione α -anomeric. In realtà, a questo stadio del processo, si rigenera la conformazione a pseudo-barca con anomeria α , che però va incontro a ulteriori cambiamenti della conformazione e si distacca dal sito attivo assumendo conformazione a barca (questo passaggio è omissso nell'immagine).

Si ipotizza che quest'ultima, per mutarotazione, dia origine in soluzione all'anomero β , più stabile, giustificando la concentrazione al 90% in soluzione di questa configurazione della molecola (prove in vitro), seppur l'enzima dia come prodotto finale della catalisi la forma α .

Come già accennato, le due alternative a quanto proposto qui sopra sono quelle che prevedono:

- 1) Un dualismo tra meccanismi catalitici diversi (probabilmente pH dipendenti).
- 2) Modelli totalmente distinti basati su diverse interazioni tra i residui amminoacidici funzionali.

In particolare, molti paper, al posto del meccanismo proposto, riportano un residuo acido protonato (ASP 151) che potrebbe catalizzare le prime fasi del processo (al posto della molecola d'acqua sopra impiegata).

Analogamente, secondo questo modello, nelle fasi finali un residuo carico negativamente agirebbe da base di Brønsted-Lowry su una molecola d'acqua strappandovi un protone e inducendo l'ossigeno ad attaccare il C2 del catione sialosilico (ref. Bibliografica: "The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors", Mark von Itzstein, e "Enzymology of Influenza Virus Sialidase", Chan et al.).

Questo modello è attualmente quello più accreditato, seppur si basi su osservazioni per lo più indirette e sia ancora sotto studio. Risulta di fondamentale importanza, in tal senso, l'attività di ASP 151 come debole catalizzatore acido. Di certo, è accreditata e dimostrabile la formazione dell'intermedio covalente, come riportato in Fig 6 e 7. Si ipotizza che questo processo sia di fondamentale importanza perché il prodotto di reazione R-OH (ovvero il resto dell'oligo- o poli-saccaride da cui si distacca Neu5Ac), possa allontanarsi dal sito attivo in un tempo ragionevole (al contrario che in molte glicosidasi in cui l'intermedio covalente coinvolge spesso carbossilati amminoacidici, nelle neuraminidasi virali il legame tra TYR 406 e substrato è più duraturo, essendo la tirosina un peggior gruppo uscente rispetto al carbossilato di residui come GLU o ASP).

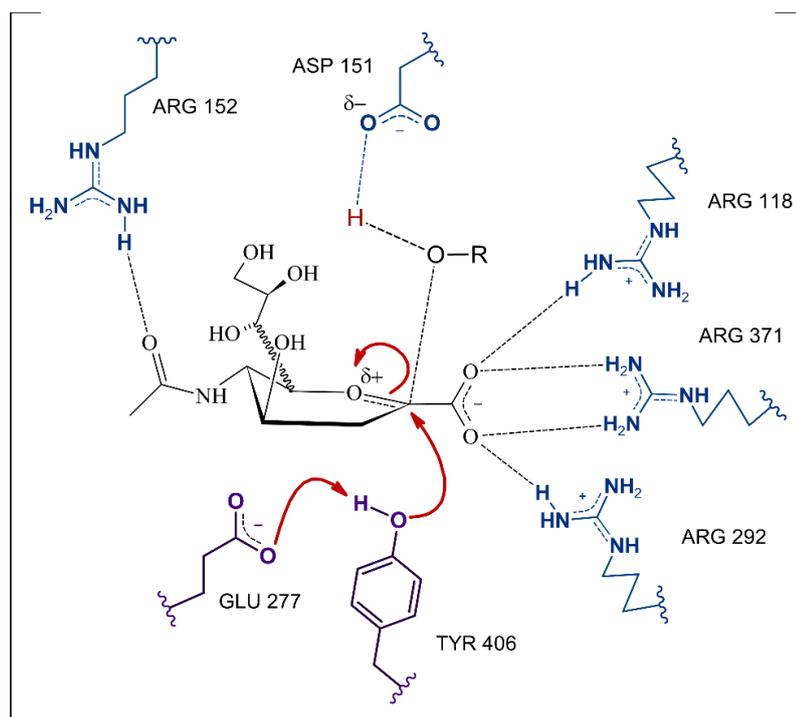
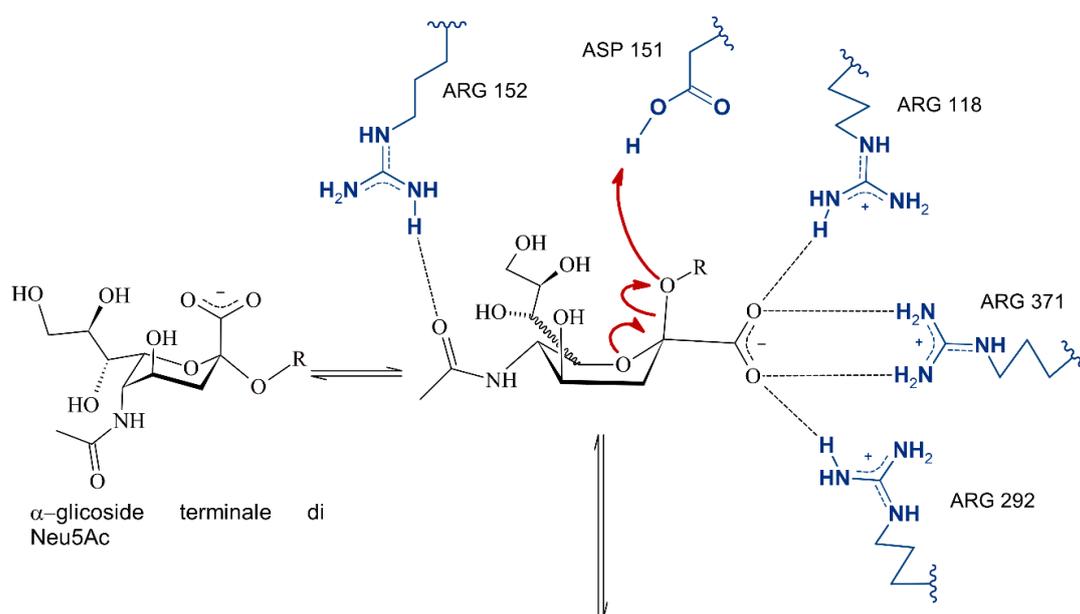
D'altra parte, però, Taylor et. al., come accennato prima, propongono la stabilizzazione dell'intermedio enzima-substrato esclusivamente mediante interazioni non covalenti e

senza l'intervento di residui funzionali che agiscano direttamente con meccanismo acido-base e/o nucleofilo.

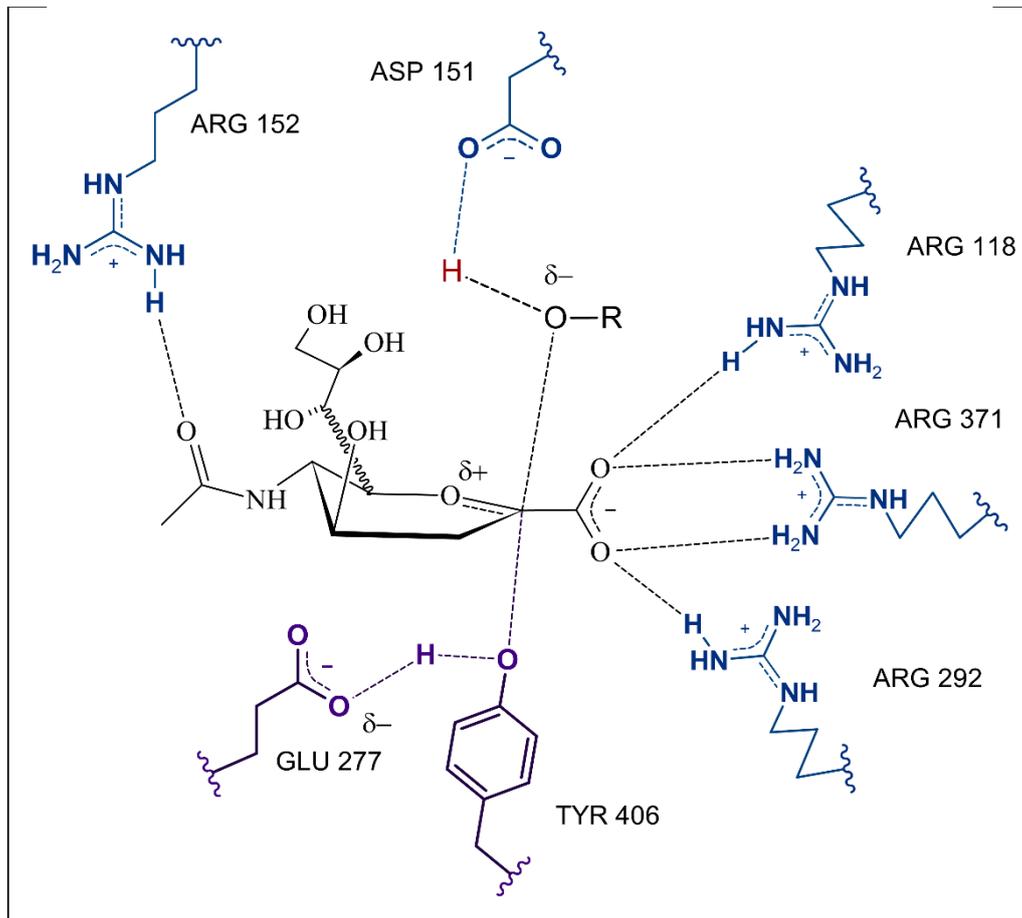
Sulla base delle evidenze sperimentali e dei modelli cristallografici a pH fisiologico umano, non sono stati individuati residui acidi in grado di agire da donatori di protoni per il modello proposto (come evidenziato anche in seguito, ASP 151 è deprotonato nell'ambiente fisiologico dell'apparato respiratorio umano, dunque non potrebbe soddisfare i requisiti richiesti dall'ipotesi di Mark von Itzstein).

In accordo con questa osservazione, è stato elaborato il meccanismo sopra riportato, sulla base delle ricerche consultate e dei dati in esse riportati. È certo che ulteriori sperimentazioni siano fondamentali per venire a capo di questo meccanismo catalitico.

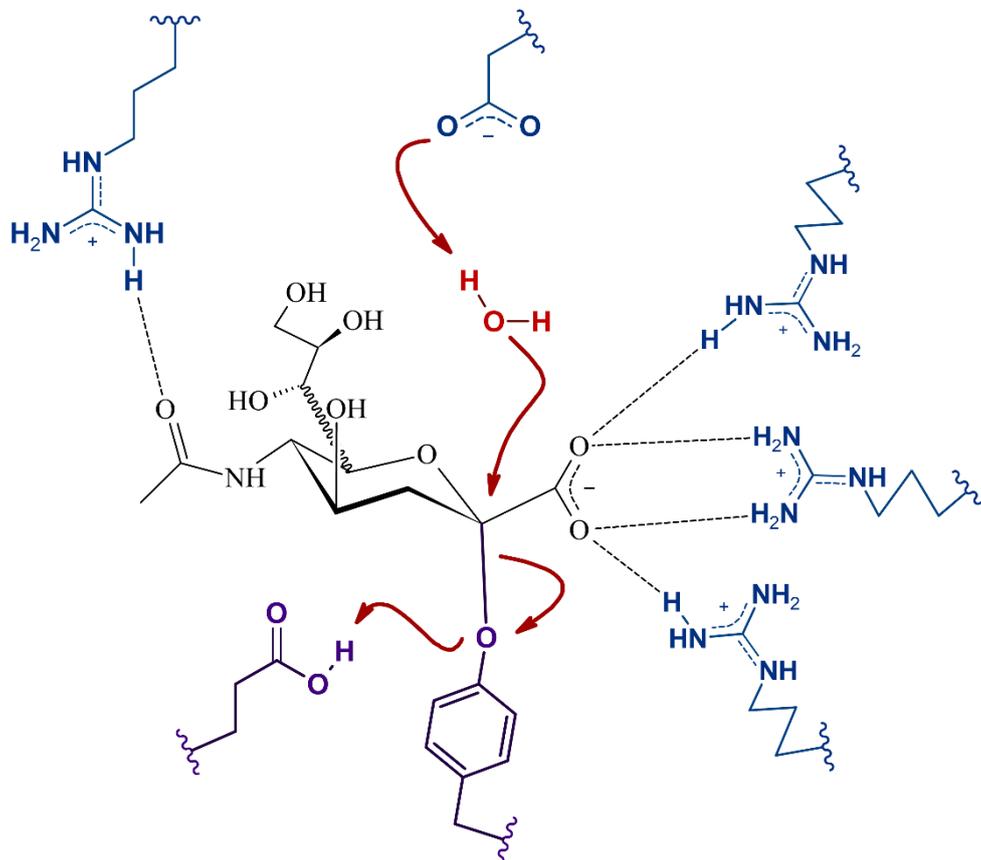
Di seguito, la proposta di meccanismo secondo Mark von Itzstein:



Transizione verso il catione sialosilico con distacco di -OR da Neu5Ac e attacco nucleofilo di TYR 406. Non si esplicita il catione sialosilico del passaggio successivo.



Stadio di transizione (con implicita formazione del catione sialosilico) verso l'intermedio sialosil-enzimatico.



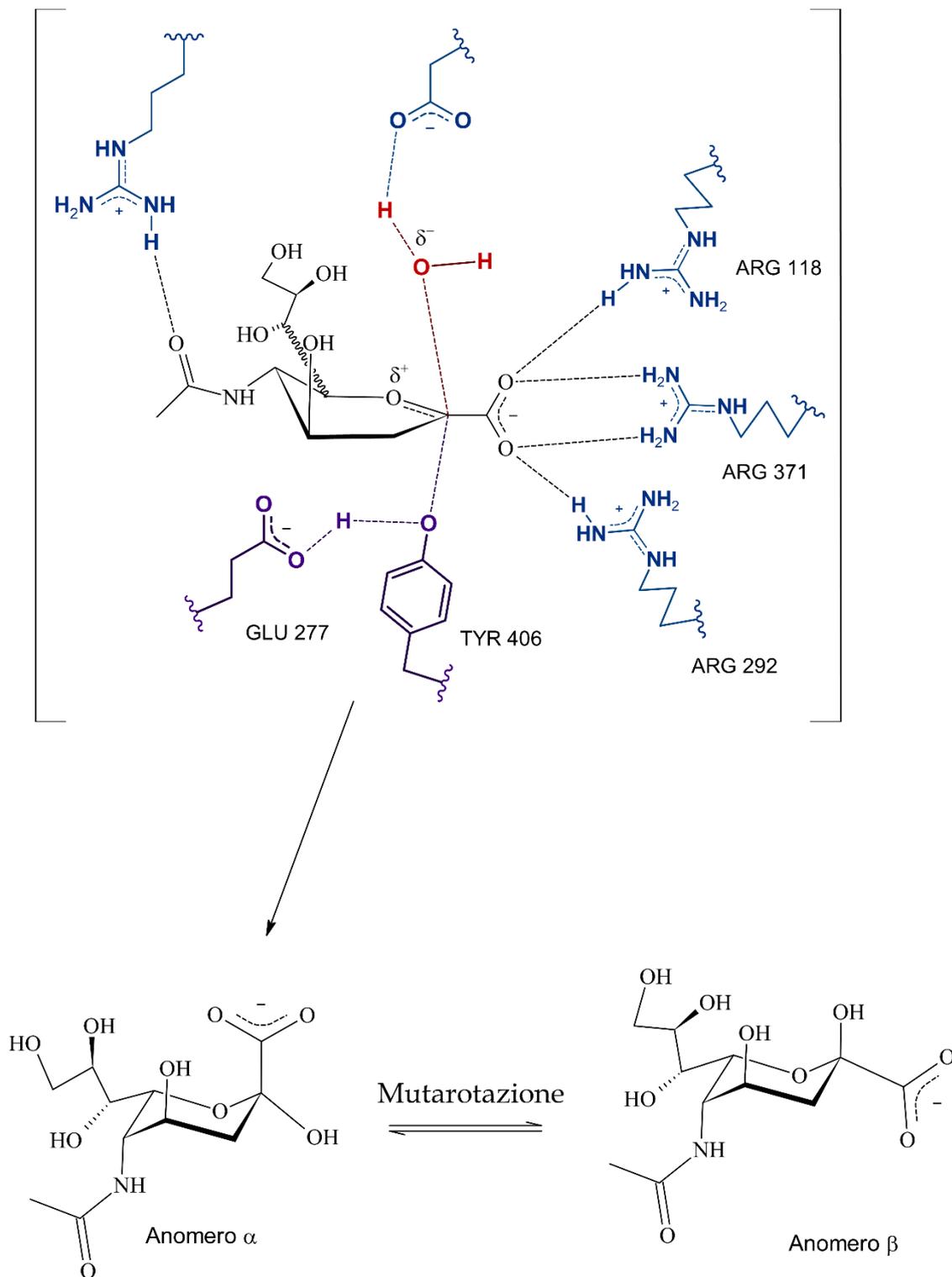


Figura 6, Modello di reazione proposto da Mark von Itzstein et al.

5. Inibitori enzimatici delle sialidasi: retrospettive e future applicazioni

Sulla base degli studi sopra riportati e di molti altri con simili tematiche, si è giunti alla progettazione di molecole a scopo farmaceutico attive contro le sialidasi virali di ogni sottotipo.

Ciò è possibile grazie alla particolare attività del sito attivo enzimatico, in grado di catalizzare la reazione mediante i due passaggi chiave della creazione dell'ossocarbocatione e di un intermedio covalente.

In base a queste osservazioni, sono state progettate due classi di molecole, nel corso degli ultimi decenni:

- a) Gli inibitori analoghi del catione sialosilico.
- b) Gli inibitori covalenti.

Per quanto riguarda la prima classe di farmaci, essi sono stati messi a punto a partire da studi su inibitori enzimatici per analogia di struttura con Neu5Ac. Partendo da quest'ultimo e introducendo modifiche nella sua struttura si è proseguito fino a giungere, con analisi razionali, test *in silico*, test *in vitro* e test *in vivo*, alla identificazione di molecole ad attività inibitoria migliore del composto progenitore, nonché dal profilo ADME ottimale per una adeguata somministrazione ai pazienti.

Gli inibitori covalenti, di più recente introduzione, sono ancora lontani dalle sperimentazioni cliniche, e si basano sulle scoperte recenti relative all'importanza del residuo TYR 406 nella catalisi nucleofila del processo di idrolisi dei residui di acidi sialici.

5.1. Inibitori per analogia di struttura: un esempio di progettazione razionale di farmaci.

In un primo momento la ricerca farmaceutica nei confronti delle neuraminidasi virali si è concentrata sullo studio delle interazioni proteina-ligando nei confronti del primo inibitore conosciuto per questi enzimi, ovvero il prodotto stesso della reazione.

Neu5Ac stesso, infatti, è un blando inibitore competitivo *in vitro* e *in vivo* delle sialidasi ($IC_{50} = 10 \text{ mM}$, ovvero $1 \cdot 10^{-2} M$), in grado di essere isolato come complesso enzima-substrato nelle corrette condizioni sperimentali.

A partire da questa struttura, nel corso dei decenni antecedenti al 1999 sono stati proposti un gran numero di inibitori funzionanti *in vitro*, molti dei quali senza fare testo alle procedure di progettazione razionale dei farmaci. La maggioranza di tali strutture non ha attività *in vivo*, per varie complicanze nei profili di assorbimento, biodisponibilità, metabolizzazione ed escrezione.

Nel corso della ricerca di inibitori su base strutturale, cioè tenendo in conto la conformazione tridimensionale del sito attivo dell'enzima, sono state formulate innumerevoli proposte derivanti dal modello originale del NANA, cercando di modificare i gruppi funzionali legati allo scheletro del carboidrato, al fine di ottenere strutture con maggiore affinità per l'enzima.

A tale proposito, è risultata fondamentale la scoperta del primo composto guida (lead compound) nella ricerca di inibitori adeguati e attivi *in vivo*: si tratta del DANA, anche noto come Neu5Ac2en, un analogo del Neu5Ac ottenuto per disidratazione e presentante quindi un doppio legame tra C2 e C3.

Questo composto presenta una capacità inibitoria notevolmente più grande di Neu5Ac ($IC_{50} = 10 \mu M$, ovvero $1 \cdot 10^{-5} M$).

A posteriori, analizzando la struttura di entrambe le molecole e conoscendo il meccanismo enzimatico di catalisi, risulta chiara la differenza di ben tre ordini di grandezza tra l'attività inibitoria dell'una e dell'altra proposta.

La struttura del DANA, difatti, possedendo il C2 ibridato sp^2 , presenta una geometria planare in questa porzione di molecola, che si riflette nella distorsione del ciclo a sei termini di cui fa parte da una tipica conformazione a sedia in una conformazione distorta molto simile alla mezza sedia del catione sialosilico.

Data la struttura del sito attivo, dunque, quest'ultimo ha una maggiore affinità strutturale per l'intermedio a mezza sedia rispetto che per il prodotto di reazione Neu5Ac, fattore che si rispecchia fedelmente nella maggiore affinità verso il DANA, analogo conformazionale dell'intermedio sopraccitato.

Il passaggio dallo studio di composti basati su carboidrati a quelli basati su strutture a mezza sedia, presentanti dunque doppi legami, ha segnato un punto di svolta nella ricerca di farmaci antinfluenzali.

Dato quindi il lead compound Neu5Ac2en, mediante tecniche di bioinformatica e chemoinformatica nei confronti del sito attivo delle eso- α -sialidasi sono state sondate nuove proposte farmaceutiche basate sull'alterazione dei sostituenti del template originale.

I due modelli presi più in esame sono il 4-amino-4-deossi-Neu5Ac2en (detto anche 4-amino-DANA) e il 4-deossi-4-guanidino-Neu5Ac2en (detto anche 4-guanidino-DANA).

Sulla base delle previsioni stimate, sostituire l'ossidrile sul C4 con un gruppo amminico (protonato a pH fisiologico), risulta nell'aver una maggiore affinità per il residuo GLU 119, in quanto si viene a formare un ponte salino tra il gruppo amminico protonato e il carbossilato del residuo. Il risultato maggiore di questo cambiamento strutturale è l'aumento dell'efficacia di inibizione di circa 100 volte rispetto al DANA ($IC_{50} = 0.3 \mu M$, ovvero $3 \cdot 10^{-7} M$ in riferimento a "*Neuraminidase (Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)))*"), e costante di inibizione $K_i = 0.04 \mu M$, ovvero $4 \cdot 10^{-8} M$, **dati forniti da PubChem**).

Ulteriori studi strutturali hanno poi evidenziato che la presenza di gruppi più basici e in grado di dare più interazioni ioniche (ponti salini), avrebbe permesso un ulteriore incremento dell'attività inibitoria. A tal proposito, dunque, si stimò la possibilità di sostituire il gruppo amminico con un gruppo guanidino.

Da questa modificazione chimica, si è ottenuto il sopraccitato 4-deossi-4-guanidino-Neu5Ac2en, noto come Zanamivir.

Dalle successive ricerche, sono emerse altre molecole target di interesse terapeutico, note come Oseltamivir e Peramivir. Saranno di seguito trattati separatamente tutti e tre i principi attivi appena nominati.

5.1.1 Zanamivir

Lo Zanamivir (4-deossi-4-guanidino-Neu5Ac2en) è ad oggi conosciuto come il primo principio attivo antinfluenzale commerciale che agisce contro le neuraminidasi nella formulazione sotto il marchio registrato di "Relenza®".

Relenza® è farmaco prodotto e distribuito dalla GlaxoSmithKline che ne detiene quindi i diritti commerciali.

Si tratta di una molecola dalle caratteristiche particolarmente interessanti in ambito farmacologico, biologico e biochimico.

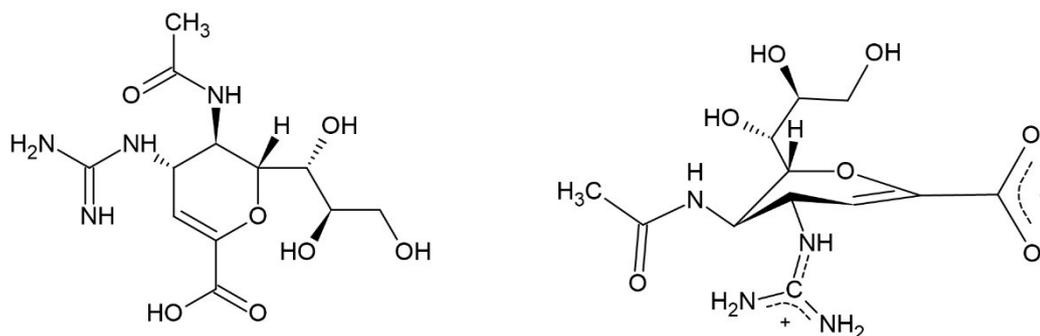


Figura 7, Rappresentazioni della struttura di 4-deossi-4-guanidino-Neu5Ac2en. A sinistra secondo la formula topologica, a destra con rappresentazione della conformazione a mezza-sedia. Si riportano la forma neutra a sinistra e quella zwitterionica a destra

Innanzitutto, come il lead compound da cui deriva, è un analogo dell'osso-carbocatione sialosilico, e corrisponde dunque ad un DANA con l'ossidrile in posizione C4 sostituito con un gruppo guanidino (mantenendo però la stereochimica del gruppo chimico che rimpiazza). In termini strutturali, quindi mantiene le stesse caratteristiche di Neu5Ac2en, con la particolarità di avere però un gruppo guanidino altamente basico in grado di interagire con i residui GLU 277 e GLU 119.

Con questi residui, Zanamivir instaura interazioni miste (legami a idrogeno e interazioni ioniche), con formazione di ponti salini tra i gruppi carbossilato delle catene laterali dei GLU sopracitati e il sostituente guanidino.

Ciò è reso possibile dal fatto che a pH fisiologico umano, il 4-guanidino-DANA è presente sotto forma zwitterionica, con carica netta pari a zero, ma con il carbossilato del C1 in forma anionica deprotonata e il gruppo guanidino sotto forma cationica protonata (catione guanidinio).

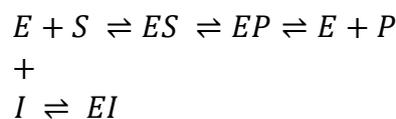
La presenza di tali legami intermolecolari spiega anche la maggiore affinità dell'enzima per questo inibitore, stimata circa come 10.000 volte più alta rispetto a quella del DANA ($IC_{50} = 0.00004 \mu M (\pm 0,00001 \mu M)$, ovvero $0,4 \cdot 10^{-10} M (\pm 1 \cdot 10^{-10} M)$ dal database di Pubchem e $K_i = 2 \cdot 10^{-10} M$ secondo Mark Von Itzstein et al.).

Si ricorda che la costante di dissociazione del complesso enzima-inibitore (K_i) determina, nella cinetica di reazione secondo Michaelis-Menten, un aumento del parametro K_m , detto

costante di Michaelis-Menten, che è indice dell'affinità dell'enzima per il substrato in reazioni che non presentano eccessivi passaggi intermedi. Si ricorda che K_m è pari alla concentrazione $[S]$ di substrato, per valori di V_0 pari a $\frac{1}{2} V_{max}$, anche se nel caso dell'inibizione enzimatica reversibile competitiva, di cui Zanamivir è la causa, il valore di K_m è notevolmente diverso da quello osservabile in condizioni normali. In questo caso, difatti, si parla più correttamente di K_m *apparente*, il cui vero valore è influenzato dalla K_i e da $[I]$, secondo la notazione:

$$K_{m(app)} = \alpha \cdot K_m = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot K_m$$

Che fa riferimento allo schema di reazioni di cui sotto:



Ne consegue che l'equazione di Michaelis-Menten rettificata per gli inibitori competitivi è la seguente:

$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{\alpha \cdot K_m + [S]}$$

La quale è paragonabile all'equazione originale in maniera indiretta, ricavando l'equazione di Lineweaver-Burk, con il relativo grafico dei doppi reciproci, nel quale si può evidenziare la differente pendenza delle rette

Chiusa la digressione teorica, si può spaziare un po' sulle caratteristiche peculiari di questo farmaco.

Innanzitutto, il profilo farmacologico di Zanamivir è piuttosto particolare, oltre che incredibilmente compatibile con i criteri fondamentali della lotta alle epidemie influenzali, in quanto:

- a) È estremamente selettivo nei confronti delle forme virali di neuraminidasi, quindi non interferisce con quelle di natura umana e non da interazioni rilevanti con processi biochimici diversi da quelli sopracitati.
- b) Non è soggetto a metabolismo epatico e non viene sequestrato per legame con proteine plasmatiche (affinità di legame <10%).
- c) È scarsamente bio-assorbito per via orale (circa 2% di assorbimento per via enterale), e per tale motivo, la sua formulazione farmaceutica prevede l'impiego di appositi apparecchi e la somministrazione è per via inalatoria orale, con la possibilità di raggiungere in tal modo picchi del 17% di assorbimento. È sotto trial clinico (terza fase) una formulazione intravenosa di Zanamivir, sempre ad opera di GlaxoSmithKline.
- d) Essendo altamente polare (non il migliore dei candidati secondo il modello della regola di Lipinski) e dunque difficilmente in grado di permeare attraverso le membrane biologiche, rimane in soluzione nel plasma ed è rapidamente escreto.

- e) La sua emivita è piuttosto breve (compresa tra le 2.5 e le 5.1 h) e la sua clearance renale varia tra i 2.5 e i 10.9 L/hr.
- f) Non subendo evidenti metabolizzazioni sia a livello epatico che sistemico, Zanamivir è escreto per via renale tal quale, a seguito dei comuni processi di filtraggio glomerulare.

Seguendo i comuni trattamenti terapeutici attuali, con doppia somministrazione giornaliera, Zanamivir raggiunge il picco del suo effetto 72 ore dopo la somministrazione. Ed è stato dimostrato che, se applicato due volte al giorno entro 48 ore dall'inizio della patologia, è in grado di ridurre significativamente la sintomatologia dell'influenza e di permettere un recupero dall'infezione più veloce di circa 1.5 giorni (valore di mediana) rispetto che in pazienti trattati con placebo.

L'ideazione di questo inibitore e gli studi che ne sono scaturiti, oltre che fare da base per la creazione di nuovi farmaci antivirali, sono un esempio lampante delle possibilità offerte alla ricerca dall'impiego delle procedure di chemo- e bio-informatica. La messa a punto di Zanamivir dal suo lead compound, difatti, è stata portata avanti sulla base della tecnica detta CADD, acronimo di Computer Aided Drug Design, ovvero il Design di Farmaci Supportato da Computer.

In particolare, mediante l'uso di database di frammenti chimici in grado di essere coniugati alla struttura del lead compound, i programmi impiegati dai gruppi di ricerca iniziali hanno elaborato le strutture la cui sintesi risultava più fattibile e le cui proprietà erano il più possibile in linea con le applicazioni del farmaco.

In particolare, per quanto riguarda sia Zanamivir che il suo analogo 4-ammino-4-deossi-Neu5Ac2en, si è proceduto mediante l'impiego di ampie e varie ricerche *in silico* sulle capacità inibitorie, per poi passare alla sintesi effettiva dei composti mediante l'impiego di un azoturo (azide) intermedio (gruppo azoturo -N₃ inserito in posizione 4 del DANA).

A seguito degli studi *in vitro* e *in vivo*, dunque, si è giunti alle fasi di sperimentazione clinica e, dopo queste ultime, alla immissione in commercio con la formulazione dell'odierno Relenza®.

5.1.2 Oseltamivir

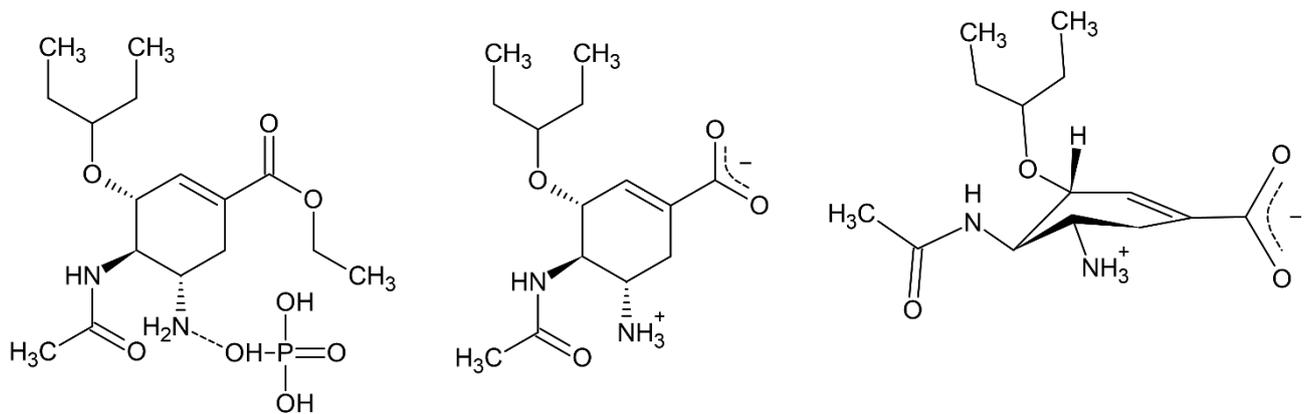
Come anticipato, a seguito di analisi razionali della struttura enzimatica, impiego di CADD e lavori di sintesi organica estremamente laboriosi, si è giunti alla scoperta del secondo inibitore delle sialidasi influenzali ad oggi in commercio.

Si tratta di oseltamivir fosfato, principio attivo della formulazione detta "Tamiflu®", prodotta e distribuita da Roche sotto autorizzazione di Gilead Sciences, ente privato di ricerca biofarmaceutica che ha per primo sviluppato la molecola.

L'efficienza di inibizione secondo i test *in vitro* è comparabile a quella di Zanamivir ($IC_{50} = 0.0002 \mu M$, ovvero $2 \cdot 10^{-10} M$ dal database di Pubchem e $K_i = 1 \cdot 10^{-10} M$).

Farmaceuticamente parlando, oseltamivir fosfato è il profarmaco del principio attivo vero e proprio, meglio noto come oseltamivir carbossilato. Si parla infatti di un estere etilico

biologicamente inattivo dell'acido carbossilico che funge da effettivo inibitore delle neuraminidasi.



Oseltamivir fosfato

Oseltamivir carbossilato

Figura 8, Da sinistra verso destra, formule di struttura del profarmaco oseltamivir fosfato, di oseltamivir carbossilato e formula di struttura di quest'ultimo con conformazione a mezza-sedia. Le due notazioni al centro e a destra sono entrambe in forma zwitterionica. NOTA: con il legame tratteggiato si sottintende che tra le molecole vi è interazione non covalente.

La trasformazione dalla forma inattiva a quella attiva avviene per idrolisi della funzione esterea al carbonio 1, catalizzata dalle esterasi epatiche. A seguito di ciò il principio attivo può espletare la sua funzione antinfluenzale.

Osservando la struttura chimica di oseltamivir, si può facilmente notare come questa presenti notevoli analogie conformazionali con 4-guanidino-Neu5Ac2en, ma risulta evidente anche quanto sia chimicamente differente da quest'ultima.

Innanzitutto, si parte da uno scheletro molecolare derivato dal cicloesene sostituito a livello del doppio legame con un gruppo carbossilico esterificato.

Si mantiene in tal modo una conformazione a mezza sedia, analoga a quella del catione sialosilico e di zanamivir, senza però l'inconveniente di dover sintetizzare il composto a partire dal DANA (e suo azoturo).

La disposizione tridimensionale dei gruppi funzionali di oseltamivir rispetta le caratteristiche stereochimiche presenti in zanamivir, mentre a cambiare è la natura stessa dei sostituenti.

In posizione 3, innanzitutto, si lega un gruppo 3-pentil-etere, che fornisce un elevato carattere idrofobico alla molecola, migliorandone il profilo ADME rispetto a 4-guanidino-Neu5Ac2en.

A tal proposito, questo residuo è stato scelto per sostituire la catena laterale di glicerolo presente in NANA, DANA e zanamivir, per studiare gli effetti dei sostituenti lipofili sul legame con l'enzima e per tentare di ottenere una farmacocinetica compatibile con la somministrazione orale.

Ne sono risultate delle evidenze scientifiche interessanti riguardo la flessibilità dei residui nel sito attivo.

Per allocare il ligando, difatti, l'enzima deve interagire con le catene alchiliche della porzione idrofobica e lipofila, modificando parzialmente la tasca del sito attivo. In particolare, è stato osservato che il residuo GLU 276, in ceppi non resistenti ad oseltamivir, si riarrangia mediante interazione ionica con ARG 224, esponendo così una vasta cavità con superficie idrofobica, in grado di interagire con il sostituito 3-pentil etere del farmaco.

In posizione 4 si presenta invece un sostituito N-acetile, che permette di mantenere adeguatamente le interazioni molecolari con l'enzima già riscontrate sia nell'acido sialico che negli inibitori.

In posizione 5, nella struttura di oseltamivir fosfato, è presente un sostituito amminico legato da interazioni ioniche ad un gruppo fosfato, che nella forma attiva del farmaco diverrà un gruppo amminico protonato, in grado di interagire con residui GLU e molecole d'acqua.

Come zanamivir, anche oseltamivir carbossilato è uno zwitterione a pH fisiologico umano.

Come anticipato, il profilo farmacocinetico di questo principio è migliore di quello del suo predecessore ideologico.

1. Presenta somministrazione orale, in quanto i suoi tassi di assorbimento, specialmente sotto forma di profarmaco sono compatibili con un l'uso terapeutico.

Si riesce a raggiungere il 75 % di assorbimento rispetto alla dose assunta, mediante passaggio per il tratto gastrointestinale, mediante cui il principio attivo passa facilmente all'interno della circolazione sanguigna. Le concentrazioni plasmatiche sia della forma attiva che del profarmaco sono proporzionali al dosaggio.

È selettivamente attivo nei confronti delle neuraminidasi influenzali (i virus parainfluenzali non sono soggetti alla stessa inibizione).

2. Oseltamivir carbossilato presenta una affinità trascurabile per le proteine plasmatiche (pari al 5% del totale), mentre il profarmaco vi si lega per il 42%.

3. Oseltamivir è rapidamente e largamente convertito nel metabolita attivo attraverso le esterasi epatiche, una volta giunti dal circolo sanguigno. Questa è l'unica reazione chimica rilevante a cui la molecola va incontro nel corpo umano, dato che non risulta essere un substrato né dei citocromi P450 della fase I né degli enzimi di coniugazione della fase II. In breve, dunque, il metabolita attivo non viene biotrasformato.

4. L'emivita della forma biologicamente inattiva varia da 1 a 3 ore nella maggior parte dei soggetti, mentre oseltamivir carbossilato presenta emivita variabile da 6 fino a 10 ore dopo assunzione per via orale del profarmaco.

5. La via di eliminazione prediletta è quella renale, mediante la quale il farmaco attivo, già responsabile dell'eliminazione del profarmaco grazie alla bioconversione, viene eliminato dall'organismo. La clearance renale è di 18,8 l/h, un valore che eccede la soglia della filtrazione glomerulare (7,5 l/h), ciò vuol dire che per l'eliminazione del principio attivo la secrezione tubulare sopperisce a tale limitazione.

5.1.3 Peramivir

Gli sforzi della ricerca farmaceutica, in concomitanza con l'approccio per analogia di struttura, si sono dedicati anche a tentativi di decostruzione dell'elemento farmacoforo costituito dall'anello a sei termini con conformazione a mezza sedia, ponendosi l'obiettivo di utilizzare come base di partenza strutture meno complicate da gestire rispetto a quelle del 4-azoturo-DANA e dell'acido shikimico. Ovviamente tali sforzi sono mirati anche a raggiungere profili farmacocinetici migliori e capacità inibitorie sempre migliori.

In questo contesto, è stata condotta l'analisi strutturale del sito attivo senza tener conto dell'analogo a mezza sedia ma solo dei restanti elementi farmacofori in grado di garantire un buon legame al substrato.

È stato individuato così da BioCryst Pharmaceuticals, il candidato BCX-1812, che prese poi il nome generico di Peramivir.

Peramivir è un composto che ha come scheletro base un ciclopentano, a cui sono legati diversi sostituenti chiave, tra cui figurano parte dei gruppi funzionali presenti in Neu5Ac, 4-deossi-4-guanidino-Neu5Ac2en e oseltamivir.

Innanzitutto, è mantenuto il gruppo carbossilico, dunque si può descrivere la molecola come un derivato dell'acido 1-ciclopentancarbossilico.

Sul C1 si trova dunque legato tale sostituente carbossilato con configurazione S, necessario a dare interazioni ioniche e legami a idrogeno con il cluster di arginine più volte citato.

In posizione C2 è legato un gruppo ossidrilico con configurazione S, in grado di dare interazioni polari col sito attivo (approfondite nella sezione relativa al docking di Peramivir).

In posizione C3, invece, si trova una catena laterale alifatica a 6 atomi di carbonio non lineare, in grado di fornire il carattere lipofilo necessario all'interazione con la tasca idrofobica del sito attivo (come già accennato riguardo al sostituente 3-pentil-etero di oseltamivir).

Una particolarità di peramivir è che in questa catena laterale (secondo la nomenclatura IUPAC, un sostituente -2-etilbutile) è presente nel primo carbonio un gruppo N-acetile, in grado dunque di posizionarsi nel sito di legame con la stessa conformazione tridimensionale del sostituente N-Ac presente in zanamivir e oseltamivir, si può descrivere quindi la catena laterale del C3 come un sostituente 1-N-acetil-2-etilbutile (dati reperiti da Pubchem).

In posizione C4, è presente un gruppo guanidino con configurazione R, già osservato in 4-guanidino-DANA, che svolge le medesime funzioni e lo stesso tipo di interazione con i residui del sito attivo di quanto già asserito.

Sul C5 non sono presenti altri sostituenti chimici.

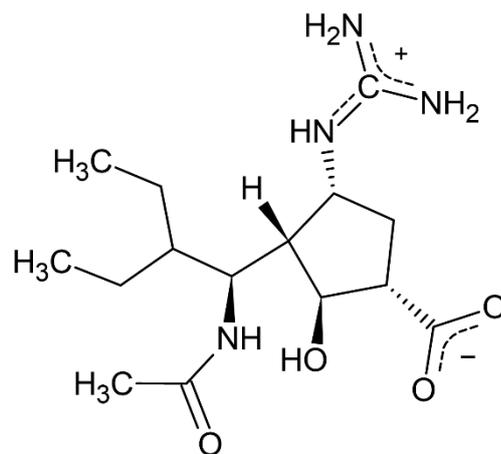


Figura 9, Rappresentazione della formula di struttura zwitterionica di Peramivir

Peramivir si presenta in forma zwitterionica con il gruppo guanidino protonato e il gruppo carbossilico deprotonato.

L'efficacia inibitoria nei confronti delle eso- α -sialidasi è stata dimostrata mediante analisi *in vitro* ed è paragonabile a quella dei farmaci di cui sopra ($IC_{50} = 0.0001 \mu M$, ovvero $1 \cdot 10^{-10} M$ dal database di Pubchem, e dati non disponibili sulla K_i)

Riguardo al profilo farmacocinetico, si riportano le informazioni reperite dall'FDA e dal database di drugBank:

- a) La via di somministrazione è parenterale, in particolare nella formulazione commerciale Rapivab, si prevede l'iniezione intravenosa di una soluzione fisiologica con dosaggio di 200 mg in principio attivo su 20 ml.
Dagli studi clinici condotti in fase I, è stata dimostrata una proporzionalità diretta tra dosaggio somministrato e quantità di farmaco in circolo nei 30 minuti successivi.
- b) La distribuzione del farmaco è subordinata al circolo sanguigno, come del resto quella di quasi tutti i farmaci. Il legame di peramivir con proteine plasmatiche, secondo ricerche *in vitro*, è inferiore al 30%.
- c) Peramivir è scarsamente metabolizzato dall'uomo, in quanto non è substrato né per i CYP450 e gli altri enzimi della fase I di biotrasformazione, né per gli enzimi di coniugazione della fase II. Non è inoltre substrato o inibitore della glicoproteina-P, responsabile del trasporto e dell'alterazione della farmacocinetica di molti xenobiotici, soprattutto in distretti quali il Sistema Nervoso Centrale.
- d) L'escrezione, così come per i due farmaci precedenti, è prevalentemente a carico dei reni, che sono responsabili per il 90% della clearance del principio attivo, mentre l'emivita del composto si attesta attorno alle 20h.
- e) A seguito di studi con somministrazione una o due volte al giorno di Rapivab 600mg per dieci giorni sono emersi tassi di accumulo del farmaco trascurabili.

Risulta evidente dunque che peramivir, qualora passasse i clinical trial nei paesi in cui è già alla terza fase diventerebbe un valido strumento terapeutico anche in casi di emergenza, data la sua somministrazione diretta e veloce per via intravenosa.

5.2 Inibitori covalenti del meccanismo nucleofilo: fluoroderivati di Neu5Ac e nuove prospettive.

Nell'ambito della ricerca per la comprensione del meccanismo di reazione delle eso- α -sialidasi, si è dovuto ricorrere a diversi espedienti tecnici per riuscire nella dimostrazione dell'importanza di TYR 406 come residuo catalitico nucleofilo. In un normale complesso ES associato alla reazione catalizzata dalle neuraminidasi, difatti, il passaggio in cui avviene la formazione di questo intermedio non è individuabile e osservabile con le tecnologie contemporanee.

Lo studio di riferimento per queste scoperte sui residui catalitici è Vravrka et. al, "Influenza neuraminidase operates via a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors".

Si è dunque fatto ricorso ai derivati fluorurati di Neu5Ac (in particolare 2-deidro-2 α ,3 α -difluoro-Neu5Ac), che danno la possibilità di legarsi covalentemente con TYR 406 e di accumularsi sotto forma di un complesso enzima-inibitore secondo il meccanismo seguente:

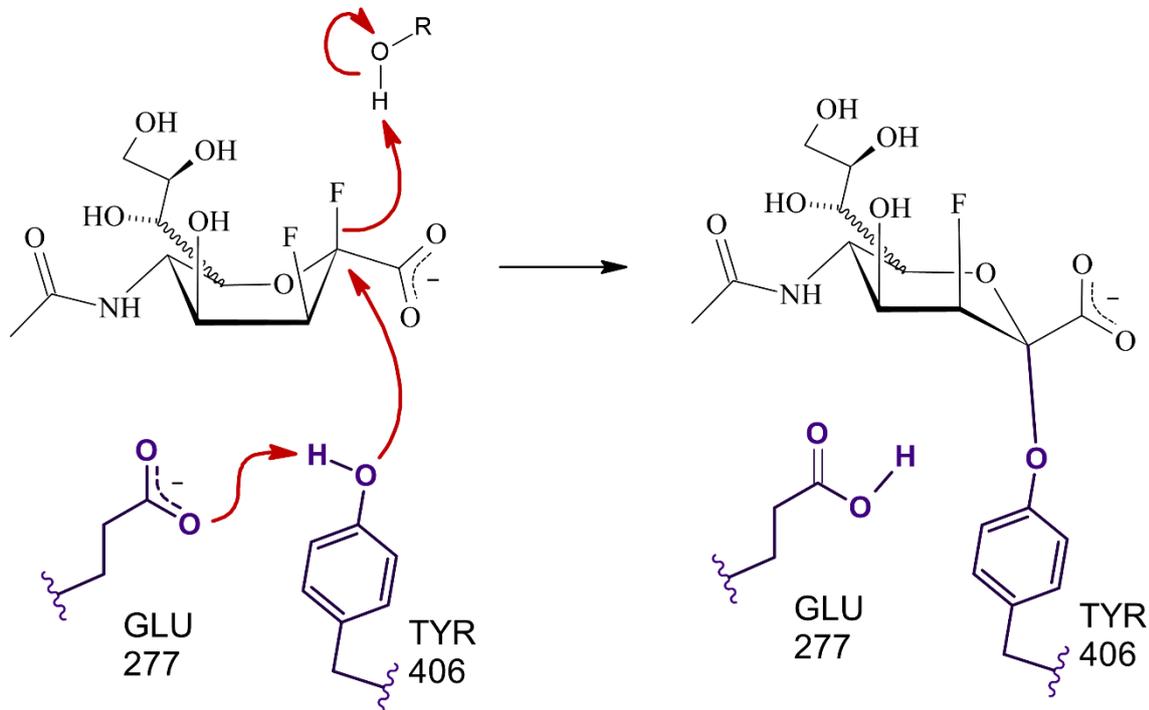


Figura 10, Meccanismo non dettagliato dell'inibizione covalente di TYR 406 ad opera di 2-deidro-2 α ,3 α -difluoro-Neu5Ac

Dove R è un gruppo chimico variabile, dipendente dall'ambiente del sito attivo e dal modello di meccanismo di reazione che si adotta.

A tale proposito, la formazione di un complesso enzima-inibitore (isolato in forma cristallina e dunque sottoposto ad analisi per diffrazione con raggi X) con l'anello in conformazione a sedia con il C2 legato alla tirosina, e dunque orientato in maniera opposta alla conformazione a barca assunta nel sito attivo, presuppone che nei passaggi intermedi di questa sostituzione nucleofila si sia ottenuto un intermedio semi-planare (a mezza sedia).

Questo va in accordo con i modelli computazionali previsti anche da Taylor et al., che prevedeva già il catione sialosilico come intermedio.

Per quanto concerne le capacità inibitorie di questo composto i dati relativi ad IC₅₀ raccolti da Vravrika et al. variano approssimativamente tra gli ordini di grandezza di 10⁻⁶ M e 10⁻¹⁰ M per diversi ceppi di sialidasi provenienti da Influenza Virus A e B.

L'approccio innovativo degli inibitori covalenti *in vitro* sta nella scoperta di come TYR 406 sia un residuo fondamentale per la catalisi. Difatti se in sua sostituzione, mediante mutazione sito-specifica, si inseriscono residui differenti, si può ottenere una proteina stabile ma con una ridotta attività catalitica e sostanziali cambiamenti nel meccanismo enzimatico.

In particolare, Vravrika et al. hanno eseguito le loro sperimentazioni su una N2 ricombinante derivata da un Influenza virus A, in particolare il ceppo A/RI/5p/1957(H2N2), isolato nel corso della pandemia da influenza asiatica.

Tale sialidasi ricombinante, definita come rN2-Tyr406Asp, presenta appunto la tirosina sopracitata sostituita con un residuo di aspartato e, seppur presentante parametri cinetici (K_{cat} e K_m) ridotti, è una proteina stabile.

La conferma sull'importanza catalitica di TYR 406 viene dalle analisi dell'anomeria delle molecole di Neu5Ac prodotte da rN2 ed N2 non ricombinante, difatti laddove la proteina del fenotipo selvatico (wild type N2) presenta meccanismo di glicoside idrolasi con mantenimento di conformazione α , mentre rN2 presenta attività di idrolisi con inversione conformazionale, producendo l'anomero β -Neu5Ac.

Il punto chiave della ricerca di questi antivirali di seconda generazione, ad oggi, è trovare inibitori che siano potenti quanto il Neu5Ac difluorurato ma che presentino anche rischi tossicologici irrisori.

6. Docking Molecolare: un approccio informatico alla progettazione razionale di farmaci (rational drug design).

Nello studio di composti biologicamente rilevanti e più in generale nello studio di interazione tra molecole complementari, risulta fondamentale comprendere come le (macro)molecole in esame interagiscano tra loro e con i ligandi. In tale contesto, si utilizza il docking molecolare per predire il comportamento di molecole reali mediante simulazioni *in silico*.

Come accennato nell'introduzione, dunque, per Docking si intende la predizione dell'interazione tra due oggetti orbitanti e le loro posizioni reciproche, normalmente tratta di una macromolecola (recettore) e un ligando (o in alcuni casi altre macromolecole).

Una definizione più letterale del termine to dock (da cui deriva docking) è: "attraccare", inteso in senso portuale, ovvero far arrivare in porto una imbarcazione.

Questa descrizione è decisamente la più in linea con il primo approccio al docking molecolare adottato nei decenni passati, in quanto appunto si utilizzavano programmi informatici per far "attraccare" il ligando nel sito di legame di una macromolecola non flessibile, intendibile, appunto, come fosse un "porto".

Per eseguire una simulazione di docking, dunque, è necessario avere due file contenenti le informazioni relative alla struttura tridimensionale di recettore (normalmente una proteina) e ligando.

Le strutture delle macromolecole possono essere acquisite con diffrazione a raggi X, spettroscopia NMR o per modellazione a partire da strutture già note.

La fonte principale di strutture proteiche (complessi enzima-ligando, principalmente) è il Protein Data Bank, ovvero il database delle strutture biologiche ottenute nell'ambito di ricerche accademiche e depositate dai gruppi di ricerca a sostegno dei dati nei loro paper.

Dunque, è stata impiegata questa fonte per il reperimento della struttura tridimensionale del dominio catalitico di una eso- α -sialidasi N1 (l'immagine in copertina è un rendering 3D eseguito con l'ausilio di PyMOL della struttura 3CKZ).

I fattori che influenzano l'interazione ligando-recettore comprendono: fenomeni elettrostatici e polari (inclusi i legami idrogeno), le forze di Van der Waals e l'interazione idrofobica. In particolare, quest'ultima costituisce la "forza motrice" in grado di promuovere la formazione del legame, mentre i legami idrogeno e le interazioni elettrostatiche sono responsabili della specificità di legame.

La formazione del legame intermolecolare richiede la desolvatazione (rimozione di molecole d'acqua) del ligando e della macromolecola con contemporanea rottura dei legami idrogeno acqua-recettore e acqua-ligando. Poiché molti di questi legami che si spezzano vengono poi riformati fra il ligando e il recettore, la differenza netta di energia libera è spesso prossima a zero.

Il calcolo della piccola variazione di energia libera tra enzima solvatato e complesso enzima ligando è dunque molto complicato, tanto più se nell'assegnazione di tale valore si utilizzino funzioni di scoring (funzioni di assegnazione del punteggio alle diverse conformazioni individuate per il ligando complessato nel sito attivo) totalmente teoriche e non empiriche o semi-empiriche.

Nella pratica laboratoriale e accademica attuale, si preferisce usare modelli semi-empirici o empirici, basati sul confronto con i dati reperiti da analisi in laboratorio e con l'apporto di modelli matematici basati su meccanica classica (meno accurata) o meccanica quantistica.

Nel caso di questo lavoro, si è impiegata la funzione di scoring Vina attraverso il programma Chimera 1.14, che usa un algoritmo ibrido, empirico e knowledge based (basato sulla conoscenza di tipi simili di interazione recettore-ligando da apposite banche dati).

Vina fornisce una predizione anche dell'energia libera di legame, seppur approssimativa e dunque non in grado di essere un metodo valido di confronto tra ligandi eccessivamente diversi.

L'uso di Chimera 1.14 per la preparazione di macromolecole e ligando si è reso necessario per sopperire a una mancanza fondamentale dell'interfaccia di Autodock Tools (il programma a cui è normalmente subordinato l'utilizzo di Vina e della sua scoring function), ovvero la difficoltà nel gestire l'idratazione esplicita della macromolecola.

Vina permette di eseguire simulazioni di docking sia su macromolecole a conformazione bloccata che su macromolecole flessibili (indicando dunque quali regioni della molecola assumere come flessibili).

Per gli scopi di questo lavoro, si è prediletto l'approccio non flessibile, per facilitare le operazioni da far compiere alla macchina (un comune PC portatile da 8 GB di RAM) e perché le strutture dei ligandi analizzati dalla maggior parte derivanti da quelle dei complessi enzima-substrato, dunque si presuppone che non vi siano differenze sostanziali con il tipo di variazioni conformazionali che interessano il sito di legame.

Anche nel caso, comunque, di strutture differenti da quelle di riferimento (si veda il docking eseguito su peramivir), è stata mantenuta una conformazione bloccata per la macromolecola, in quanto dai dati in letteratura, l'interazione proteina-ligando non genera variazioni conformazionali notevolmente diverse da quelle di oseltamivir.

Chiusa tale digressione, si ricorda che il docking fa uso di strutture molecolari, la cui geometria tridimensionale deve essere accuratamente descritta. A tale scopo, si adoperano i metodi della dinamica molecolare per ottimizzare la geometria di legame, basandosi su quelle caratteristiche che permettono di ottenere il più piccolo quantitativo di energia possibile contenuta all'interno della molecola (conformazione a minore energia).

Per descrivere tale energia potenziale contenuta nei legami di una molecola, si impiega il **campo di forza**, detto anche *force-field*, che corrisponde alla somma delle energie di legame e di non legame di un sistema di atomi secondo la semplificazione (derivata normalmente da leggi della meccanica classica):

$$E_{Tot} = E_{Stretching} + E_{Bending} + E_{Torsion} + E_{Non\ bonding}$$

Dove i primi tre termini sono i descrittori dell'energia di legame, con i seguenti significati:

- e. L' $E_{Stretching}$, letteralmente traducibile in "energia di stiramento" corrisponde alla somma delle energie associate alla vibrazione degli atomi lungo gli assi di legame che li separano.
- f. L' $E_{Bending}$, letteralmente traducibile in "energia di curvatura", corrisponde alla sommatoria delle energie associate alle vibrazioni degli atomi che determinano un cambiamento degli angoli di legame tra tre atomi diversi (e dunque in riferimento a due legami distinti).
- g. L' $E_{Torsion}$, letteralmente traducibile in "energia torsionale", corrisponde all'energia necessaria alla torsione dei legami tra gli atomi centrali in un quartetto di atomi, in modo che si generi un nuovo angolo diedro tra questi.

L'ultimo termine, $E_{Non\ Bonding}$, è invece relativo alle energie di non legame intramolecolari, quindi alle forze attrattive o repulsive di Van der Waals e alle interazioni ioniche (oltre che ad eventuali legami a idrogeno intramolecolari).

L'uso dei *force-field* è fondamentale perché si determini la conformazione a minore energia del ligando o del recettore che si vogliono far interagire.

In particolare, ci si riferisce a questo processo con minimizzazione energetica, ovvero una ottimizzazione della geometria molecolare che tiene conto delle energie di cui sopra al fine di far convergere l'energia della molecola ad un minimo assoluto per una specifica conformazione tridimensionale a bassa energia e dunque stabile.

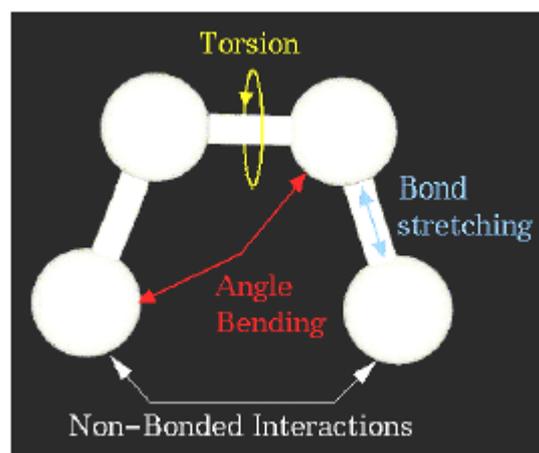


Figura 11, rappresentazione schematica delle tre possibili tipologie di alterazioni strutturali descritte da stretching, bending e torsione.

Ciò può essere fatto con un determinato grado di tolleranza nella affidabilità dei valori, dipendente dal numero di passaggi computabili e dalle proprietà minime impostate perché tale energia converga ad un valore finito.

Individuata la conformazione a minore energia, questa viene utilizzata come punto di partenza per il calcolo delle posizioni di legame, normalmente secondo *procedure sistematiche*, le quali variano la posizione dei legami del ligando in funzione del sito di interazione alterando in maniera sistematica e gradualmente maggiore gli angoli, la torsione e la lunghezza dei legami tra gli atomi di un ligando, oppure secondo *algoritmi genetici* (randomici) che inseriscono perturbazioni casuali nella geometria del ligando, come fossero mutazioni all'interno di una sequenza nucleotidica, e valutando "mutazione" per "mutazione" l'affinità della conformazione di ligando modificata nei confronti del sito di legame.

I protocolli per l'analisi di un sito attivo e per effettuare un docking molecolare prevedono innanzitutto di iniziare con la scelta di un modello tridimensionale accurato dal PDB, per poi procedere a individuare il sito di legame, e alla preparazione dei file del recettore e del ligando. Queste metodiche differiscono da programma a programma, dunque saranno riportati in sezioni apposite tutti i passaggi eseguiti.

6.1. La scelta delle strutture cristallografiche dal PDB: 3CKZ e 3CLO

Nel corso della messa a punto di questo elaborato, ci si è concentrati con notevole sforzo nella scelta accurata del recettore in funzione della attività dei suoi principali inibitori. Dunque, sono stati considerati come più interessanti, i modelli depositati dal gruppo di ricerca di Collins et al. nell'ambito del paper "Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants".

La scelta è ricaduta dunque su 3CKZ e 3CLO, due strutture riportate nel PDB e depositate nel contesto della ricerca e comprensione della farmacoresistenza delle neuraminidasi ad oseltamivir.

La ricerca, pubblicata su NATURE, Vol. 453, è stata condotta da Collins et al. mediante mutagenesi sito-specifica nei confronti delle triplette che codificano per alcuni aminoacidi del sito di legame.

Dal PDB stesso, si possono osservare i dati della struttura cristallografica che si sta per scaricare, per accertarsi dunque che la risoluzione dell'acquisizione si adegua, che la struttura non presenti caratteristiche anomale o particolari.

In questo caso è riportato dal sito che vi sono un ligando, lo ione Ca^{2+} , e che alcuni aminoacidi sono stati sostituiti con ausilio di mutazioni sito-specifiche.

Le pagine di riepilogo del database riporta anche la letteratura scientifica che fa uso o ha prodotto le strutture tridimensionali (in questo caso acquisite con diffrazione a raggi X).

Come nota finale, si ricorda che le cristallografie mantengono intatte tutte le molecole d'acqua di cristallizzazione, con particolare riferimento a quelle presenti nel sito attivo.

6.1.1. 3CKZ

Si riporta di seguito parte della pagina web di 3CKZ dal PDB, con annesse informazioni fondamentali:

Biological Assembly 1

3CKZ

N1 Neuraminidase H274Y + Zanamivir

DOI: 10.2210/pdb3CKZ/pdb

Classification: VIRAL PROTEIN, HYDROLASE
Organism(s): Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
Expression System: Influenza A virus
Mutation(s): Yes

Deposited: 2008-03-18 **Released:** 2008-05-20
Deposition Author(s): Collins, P., Haire, L.F., Lin, Y.P., Liu, J., Russell, R.J., Walker, P.A., Skehel, J.J., Martin, S.R., Hay, A.J., Gamblin, S.J.

Experimental Data Snapshot

Method: X-RAY DIFFRACTION
Resolution: 1.90 Å
R-Value Free: 0.228
R-Value Work: 0.201
R-Value Observed: 0.202

wwPDB Validation

Metric	Percentile Ranks	Value
Rfree		0.233
Clashescore		11
Ramachandran outliers		0.3%
Sidechain outliers		5.8%
RSRZ outliers		2.6%

3D View: Structure | Electron Density | Ligand Interaction

Global Symmetry: Cyclic - C4 (3D View)
Global Stoichiometry: Homo 4-mer - A4

Find Similar Assemblies

Biological assembly 1 assigned by authors and csb.org/structure/3CKZ#carousel-structuregallery

This is version 1.2 of the entry. See complete history.

Figura 12.1, Acquisizione di una schermata dal PC contenente la pagina del Protein Data Bank da cui è stato reperito il primo modello cristallografico

Da questa immagine, si possono reperire alcune informazioni rilevanti sull'affidabilità dei successivi approcci di docking. Innanzitutto, la risoluzione dello strumento con cui è stata eseguita la diffrazione è di 1.90 Å, quindi ragionevolmente piccola da poter ottenere informazioni adeguate sulla struttura del complesso proteina-ligando.

Si ricorda che la risoluzione di uno strumento è la variazione minima apprezzabile della grandezza in esame con uno strumento, dunque la minima variazione nella distanza tra gli atomi sottoposti a diffrazione è $1.90 \cdot 10^{-10} m$.

Un'altra informazione rilevante è il ceppo di provenienza della struttura, ovvero Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)).

Si noti inoltre che non si sta osservando la struttura tridimensionale di tutti e quattro i domini della neuraminidasi, ma solo dell'omotetramero della regione catalitica.

La struttura effettivamente scaricata dal PDB, però, è un file nel formato .pdb (standard per le acquisizioni mediante diffrazione a raggi X) della singola subunità monomerica asimmetrica.

Nelle schermate successive si reperiscono ulteriori informazioni sulla letteratura scientifica e sulle caratteristiche molecolari del complesso (peso molecolare, numero di atomi, numero di residui).

Sotto, si hanno invece gli schemi riassuntivi della macromolecola (si noti la presenza di una singola mutazione rispetto al wild type), e di cofattore e ligando:

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB

generated by PISA (software)

Macromolecule Content

- Total Structure Weight: 42.58 kDa
- Atom Count: 3175
- Residue Count: 385
- Unique protein chains: 1

Literature Download Primary Citation

Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants.

[Collins, P.J.](#), [Haire, L.F.](#), [Lin, Y.P.](#), [Liu, J.](#), [Russell, R.J.](#), [Walker, P.A.](#), [Skehel, J.J.](#), [Martin, S.R.](#), [Hay, A.J.](#), [Gamblin, S.J.](#)

(2008) Nature **453**: 1258-1261

PubMed: [18480754](#) Search on PubMed

DOI: [10.1038/nature06956](#)

[Structures With Same Primary Citation](#)

PubMed Abstract:
 The potential impact of pandemic influenza makes effective measures to limit the spread and morbidity of virus infection a public health priority. Antiviral drugs are seen as essential requirements for control of initial influenza outbreaks caused by ...

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB

Macromolecules

Find similar proteins by: Sequence | Structure

Entity ID: 1

Molecule	Chains	Sequence Length	Organism	Details
Neuraminidase	A	385	Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))	Mutation(s): 1 Gene Names: NA EC: 3.2.1.18

Find proteins for [Q6DPL2](#) (Influenza A virus) Go to UniProtKB: [Q6DPL2](#)

Protein Feature View Full Protein Feature View for [Q6DPL2](#)

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB

Small Molecules

Ligands 2 Unique

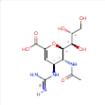
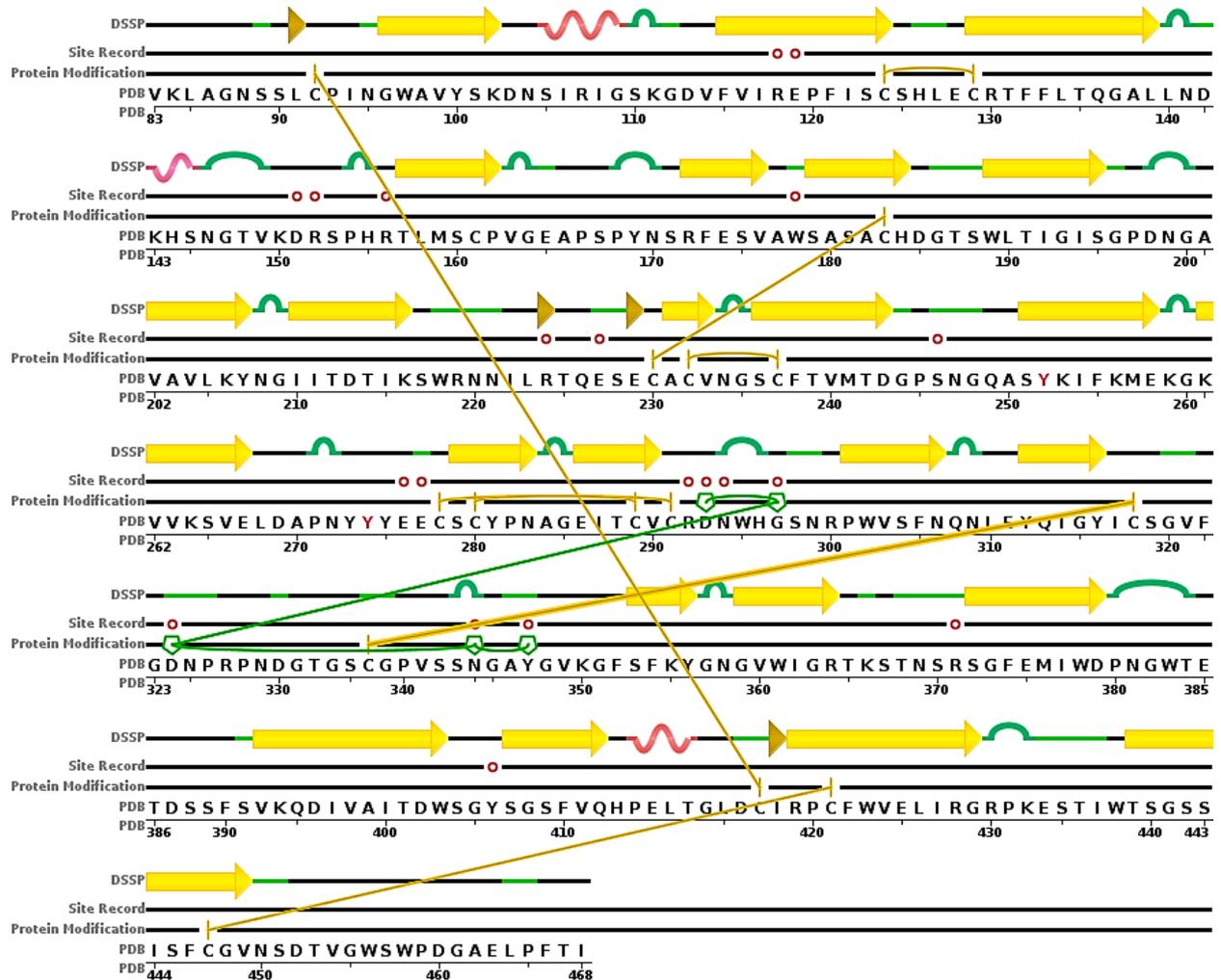
ID	Chains	Name / Formula / InChI Key	2D Diagram	3D Interactions
ZMR Query on ZMR Download CCD File	A	ZANAMIVIR C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₇ ARAIBEBZBOPLMB-UFQHTTSETSA-N		Ligand Interaction
CA Query on CA Download CCD File	A	CALCIUM ION Ca BHPQYMZQTOCNFJ-UHFFFAOYSA-N	Ca ²⁺	Ligand Interaction

Figure 12.2, 12.3 e 12.4

Per completezza, si riporta la sequenza polipeptidica della singola subunità proteica ricavata dal file .fasta (un'estensione tipica dei file relativi a sequenze nucleotidiche o polipeptidiche associate a un gene). In rosso il residuo della mutazione.

```
>3CKZ_1|Chain A|Neuraminidase|Influenza A virus (284218)
VKLAGNSSLCPINGWAVYSKDNSIRIGSKGDVVFVIREPFI SC SHLE CRTFFLTQ GALLNDKHSNGTVKDRSPHRTLM
SCPVGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGT SWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESE CACVNG
SCFTVMTDGP SNGQASYKIFKMEKGVVKSVELDAPNY YYEECS CYPNAGEITCVCRDNWHG SNRPWV SFNQ NLEYQ
IGYICSGVFGDNPRPNDGTGSCGPVSSNGAYGVKGF SFKYGN GVWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNGWTE DSSFSVK
QDIVAITDWSGYSGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKESTIWTSGSSISFCGVNSDTV GWSWPDGAELPFTI
```

Dalla letteratura, si sa che la proteina impiegata è del tipo rN1 His274Tyr, presentante sostituzione della istidina 274 con una tirosina. E di seguito, l'immagine riassuntiva della sequenza con tutte le annotazioni strutturali presenti sul PDB:



- Protein Modification Legend**
-  calcium ion
 -  L-cysteine
- Site Record Legend**
-  BINDING SITE FOR RESIDUE ZMR A 469 (Software)
 -  BINDING SITE FOR RESIDUE CA A 1 (Software)
- DSSP Legend**
-  empty: no secondary structure assigned
 -  B: beta bridge
 -  S: bend
 -  T: turn
 -  E: beta strand
 -  G: 3/10-helix
 -  H: alpha helix

6.1.2. 3CL0

Di questa struttura non c'è molto da aggiungere: si tratta del complesso enzima-inibitore relativo ad oseltamivir carbossilato e la stessa eso- α -sialidasi di cui sopra.

Una differenza tecnica tra le due strutture qui presentate sta nella risoluzione dell'acquisizione della cristallografia di 3CL0, che è pari a 2.20 Å, che in notazione scientifica è uguale a $2,20 \cdot 10^{-10} m$.

Si riportano dunque le informazioni fondamentali sulla struttura tridimensionale attraverso una serie di immagini tratte dal PDB.

3CL0
N1 Neuraminidase H274Y + oseltamivir

DOI: 10.2210/pdb3CL0/pdb

Classification: VIRAL PROTEIN, HYDROLASE
Organism(s): Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))
Expression System: Influenza A virus
Mutation(s): Yes

Deposited: 2008-03-18 **Released:** 2008-05-20
Deposition Author(s): Collins, P., Haire, L.F., Lin, Y.P., Liu, J., Russell, R.J., Walker, P.A., Skehel, J.J., Martin, S.R., Hay, A.J., Gamblin, S.J.

Experimental Data Snapshot
Method: X-RAY DIFFRACTION
Resolution: 2.20 Å
R-Value Free: 0.240
R-Value Work: 0.193
R-Value Observed: 0.196

wwPDB Validation

Metric	Percentile Ranks	Value
Rfree		0.242
Clashscore		10
Ramachandran outliers		0.5%
Sidechain outliers		6.7%
RSRZ outliers		0.8%

Macromolecule Content

- Total Structure Weight: 42.53 kDa
- Atom Count: 3160
- Residue Count: 385
- Unique protein chains: 1

Literature

Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants.
[Collins, P.J., Haire, L.F., Lin, Y.P., Liu, J., Russell, R.J., Walker, P.A., Skehel, J.J., Martin, S.R., Hay, A.J., Gamblin, S.J.](#)
(2008) Nature **453**: 1258-1261
PubMed: [18480754](#) [Search on PubMed](#)
DOI: 10.1038/nature06956
[Structures With Same Primary Citation](#)

PubMed Abstract:
The potential impact of pandemic influenza makes effective measures to limit the spread and morbidity of virus infection a public health priority. Antiviral drugs are seen as essential requirements for control of initial influenza outbreaks caused by ...

Figure 13.1, 13.2

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB

Macromolecules

Find similar proteins by: Sequence | Structure

Entity ID: 1

Molecule	Chains	Sequence Length	Organism	Details
Neuraminidase	A	385	Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1))	Mutation(s): 1 Gene Names: NA EC: 3.2.1.18

Find proteins for [Q6DPL2](#) (Influenza A virus) Go to UniProtKB: [Q6DPL2](#)

Protein Feature View Full Protein Feature View for [Q6DPL2](#)

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB

Small Molecules

Ligands 2 Unique

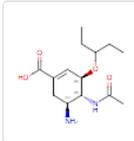
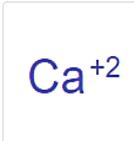
ID	Chains	Name / Formula / InChI Key	2D Diagram	3D Interactions
G39 Query on G39 Download CCD File	A	(3R,4R,5S)-4-(acetylamino)-5-amino-3-(pentan-3-yloxy)cyclohex-1-ene-1-carboxylic acid C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₄ NENPYTRHICXVCS-YNEHKIRRSA-N		Ligand Interaction
CA Query on CA Download CCD File	A	CALCIUM ION Ca BHPQYMZQTCNFJ-UHFFFAOYSA-N		Ligand Interaction

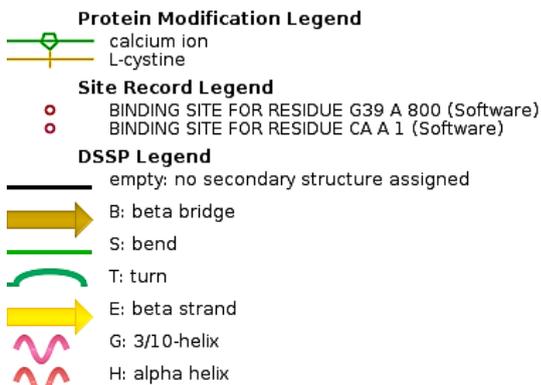
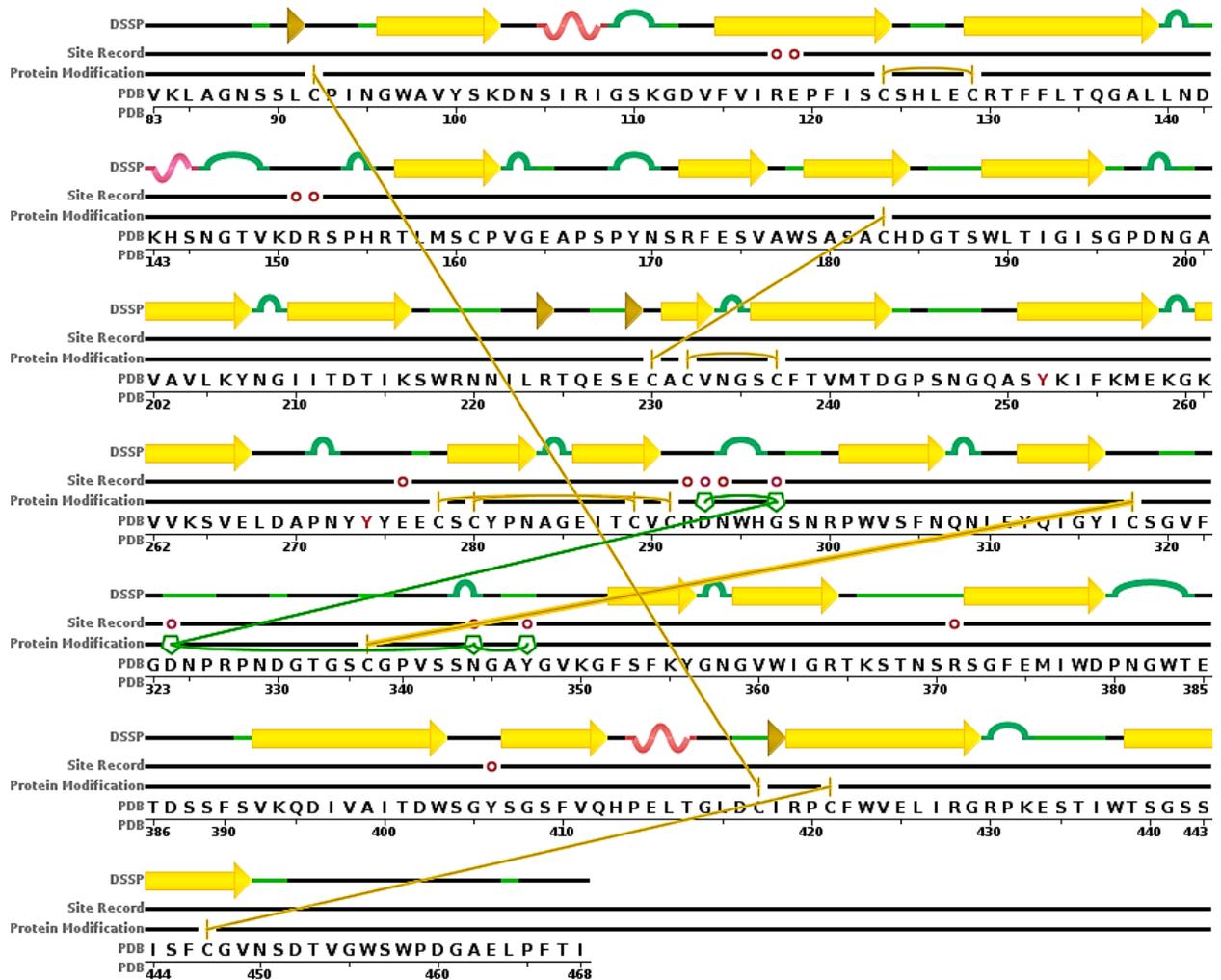
Figure 13.3 e 13.4

Anche in questo caso si riporta la sequenza polipeptidica della singola subunità proteica ricavata dal file .fasta (in rosso la mutazione).

```
>3CL0_1|Chain A|Neuraminidase|Influenza A virus (284218)
VKLAGNSSLCPINGWAVYSKDNSIRIGSKGDVVFVIREPFVISC SHLECRTFFLTQGALLNDKHSNGTVKDRSPHRTLMSCP
VGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGTSWLTIGISGPDNGAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVM
TDGPSNGQASYKIFKMEKGVVKSVELDAPNYYEEECSCYPNAGEITCVCRDNWHGNSRNPWVSFNQNLEYQIGYICSGVF
GDNPRPNDGTGSCGPVSSNGAYGVKGFSFKYGNVWIGRTKSTNSRSGFEMIWDPNGWTTETDSSFSVKQDIVAITDWSGY
SGSFVQHPELTGLDCIRPCFWVELIRGRPKESTIWTSGSSISFCGVNSDTVGVSWPDGAELPFTI
```

Di seguito (pagina successiva) si riporta la visualizzazione bidimensionale della sequenza amminoacidica.

NOTA: si ricorda che qualunque struttura sia scaricata dal PDB si presenta come totalmente priva degli atomi di idrogeno, quindi per eseguire i protocolli di docking, si deve tenere in conto questa caratteristica strutturale.



6.2 Protocolli di docking standard per Autodock Vina.

Si riportano in ordine le operazioni da eseguire mediante qualunque programma di editing molecolare necessarie a preparare i modelli tridimensionali di recettore e ligando.

6.2.1 Preparazione della macromolecola.

Le procedure iniziali necessarie a preparare il recettore per il docking molecolare sono anche necessarie a individuare il sito attivo e a separare il ligando originale (il quale verrà a sua volta manipolato in seguito).

Si utilizza la seguente procedura, indipendentemente dal programma con cui la si attua:

- a. Si apre la struttura scaricata dal Protein Data Bank in un apposito programma di rendering e editing molecolare 3D.
- b. Se presente più di una subunità, si eliminano le frazioni proteiche non rilevanti ai fini della simulazione computazionale.
- c. Si accede alla sezione in cui sono elencati i residui amminoacidici, le molecole d'acqua e i ligandi (in Autodock Tools si utilizza la Dashboard, in Chimera 1.14, lo strumento "Selection").
- d. Si seleziona il ligando (in questo caso ZMR per 3CKZ o G39 per 3CL0) e lo si salva a parte come un modello tridimensionale in formato .pdb
- e. Si elimina il ligando dal modello 3D.

Si procede alla effettiva preparazione della macromolecola:

- a) Se non necessarie, si eliminano le molecole d'acqua.
- b) Si aggiungono i protoni mancanti alla struttura dell'enzima.
- c) Si ottimizza l'energia degli idrogeni aggiunti
- d) Si aggiungono le cariche elettriche parziali (per le parziali si usano le cariche di Gasteiger, basate sull'equilibrio di elettronegatività, o quelle di Kollman, basate su calcoli quantomeccanici per ogni amminoacido).
- e) Si rimuovono tutti gli idrogeni non polari.
- f) Si salva la struttura come un file .pdbqt a parte.

Questo file .pdbqt sarà dunque utilizzabile in ogni simulazione a venire.

Utilizzando Chimera 1.14, si può omettere l'eliminazione delle molecole d'acqua.

6.2.2 Preparazione standard dei ligandi

Si tratta della fase più delicata del processo di preparazione al docking molecolare, nonché del momento in cui si lavora sull'ideazione di nuovi ligandi partendo da strutture già note.

Si distinguono due metodiche da applicare in casi diversi:

1. Ligandi ottenuti dal modello cristallografico.
2. Modelli cristallografici ottimizzati con Avogadro o ArgusLab.
3. Modelli disegnati completamente da zero e ottimizzati con Avogadro o ArgusLab.

Nel primo caso ci si limita ad eseguire la procedura standard di Vina:

- a. Si protona la struttura.
- b. Si aggiungono le cariche parziali (Gasteiger o Kollman).
- c. Si rimuovono gli idrogeni non polari.
- d. Si lancia il comando di analisi dei ligandi, che imposta i parametri necessari a Vina per la torsione dei legami e per eventualmii bending e stretching.
- e. Si salva il file di output di questo comando in formato .pdbqt.

Nel secondo e nel terzo caso si eseguono alcune operazioni in più:

- a. Si apre Avogadro e si disegna la struttura molecolare interessata.
Oppure si apre il file della struttura cristallografica da ottimizzare.

- b. Si protona per il valore di pH fisiologico (qui assunto come 7,4).
- c. Si ottimizza la geometria impiegando un algoritmo “Steepest Descend” che approssima con una serie di passaggi successivi il minimo energetico del *force-field* della molecola.
Si è adottato per tutte le molecole in esame, tranne in rarissimi casi, il *force field* MMFF94, sviluppato dalla Merck.
- d. Conclusa questa fase, si trasferisce il file da Avogadro ad Autodock tools o Chimera e si riprende la procedura sopraesposta dal punto **b.** fino all’ottenimento del file .pdbqt.

Nota: nel caso in cui si modificano strutture di origine cristallografica, una volta salvato il file come .pdb in Avogadro, si deve procedere a controllare con Notepad++ che non vi siano errori nei parametri che descrivono la molecola. In particolare, ogni notazione diversa da LIG 1 (standard di Avogadro), va modificata, per ottenere un file simile a quanto segue:

1	COMPND	UNNAMED									
2	AUTHOR	GENERATED BY OPEN BABEL 2.3.2									
3	HETATM	1	C	LIG	1	-7.070	-1.240	0.423	1.00	0.00	C
4	HETATM	2	C	LIG	1	-6.778	0.267	0.278	1.00	0.00	C
5	HETATM	3	C	LIG	1	-5.272	0.236	-0.071	1.00	0.00	C
6	HETATM	4	H	LIG	1	-6.925	0.806	1.221	1.00	0.00	H
7	HETATM	5	N	LIG	1	-7.582	0.957	-0.745	1.00	0.00	N
8	HETATM	6	N	LIG	1	-5.849	-1.768	1.039	1.00	0.00	N
9	HETATM	7	H	LIG	1	-7.037	-1.663	-0.594	1.00	0.00	H
10	HETATM	8	C	LIG	1	-8.435	-1.696	1.029	1.00	0.00	C
11	HETATM	9	C	LIG	1	-4.762	-1.041	0.541	1.00	0.00	C
12	HETATM	10	N	LIG	1	-4.597	1.491	0.315	1.00	0.00	N
13	HETATM	11	H	LIG	1	-5.132	0.129	-1.155	1.00	0.00	H
14	HETATM	12	C	LIG	1	-7.331	2.248	-1.160	1.00	0.00	C
15	HETATM	13	H	LIG	1	-8.524	0.620	-0.890	1.00	0.00	H
16	HETATM	14	C	LIG	1	-8.401	2.833	-2.044	1.00	0.00	C
17	HETATM	15	H	LIG	1	-9.321	2.244	-2.015	1.00	0.00	H
18	HETATM	16	H	LIG	1	-8.034	2.866	-3.074	1.00	0.00	H
19	HETATM	17	H	LIG	1	-8.632	3.845	-1.702	1.00	0.00	H
20	HETATM	18	O	LIG	1	-6.304	2.867	-0.889	1.00	0.00	O
21	HETATM	19	C	LIG	1	-3.844	1.772	1.378	1.00	0.00	C
22	HETATM	20	H	LIG	1	-4.872	2.282	-0.266	1.00	0.00	H
23	HETATM	21	N	LIG	1	-3.703	1.004	2.444	1.00	0.00	N1+
24	HETATM	22	H	LIG	1	-4.314	0.180	2.617	1.00	0.00	H
25	HETATM	23	H	LIG	1	-3.091	1.197	3.215	1.00	0.00	H
26	HETATM	24	N	LIG	1	-3.193	2.948	1.384	1.00	0.00	N
27	HETATM	25	H	LIG	1	-3.254	3.574	0.595	1.00	0.00	H
28	HETATM	26	H	LIG	1	-2.620	3.208	2.172	1.00	0.00	H
29	HETATM	27	C	LIG	1	-5.815	-1.817	2.370	1.00	0.00	C
30	HETATM	28	O	LIG	1	-5.301	-0.806	2.941	1.00	0.00	O
31	HETATM	29	O	LIG	1	-6.414	-2.779	2.908	1.00	0.00	O1-
32	HETATM	30	C	LIG	1	-8.919	-0.885	2.254	1.00	0.00	C
33	HETATM	31	C	LIG	1	-9.886	0.261	1.976	1.00	0.00	C
34	HETATM	32	O	LIG	1	-10.061	1.056	3.142	1.00	0.00	O
35	HETATM	33	H	LIG	1	-10.869	-0.114	1.676	1.00	0.00	H
36	HETATM	34	H	LIG	1	-9.517	0.923	1.191	1.00	0.00	H
37	HETATM	35	O	LIG	1	-3.573	-1.328	0.603	1.00	0.00	O
38	HETATM	36	H	LIG	1	-8.283	-2.725	1.382	1.00	0.00	H

Figura 14, Esempio di un file .pdb aperto in Notepad ++, i tre valori dopo la notazione LIG 1 indicano le coordinate di ogni atomo.

6.2.3 Allestimento del file di griglia

Per poter eseguire correttamente la propria funzione, il programma Vina necessita di conoscere lo spazio geometrico all'interno del quale dovrà ricercare le interazioni proteina-ligando.

Risulta dunque fondamentale conoscere le dimensioni della "grid box" (Vina Search Volume, su Chimera 1.14) ovvero un parallelepipedo di dimensioni variabili i cui vertici e spigoli delimitano l'area in cui Vina eseguirà il docking.

Normalmente, la notazione impiegata è la seguente;

```
center_x = xx.xxx  
center_y = yy.yyyy  
center_z = zz.zzzz  
size_x = A  
size_y = B  
size_z = C
```

Dove i primi tre valori sono relativi alle coordinate spaziali del centro della grid box, mentre A, B, e C sono i valori di lunghezza in Armstrong degli spigoli del box nelle tre dimensioni. Per individuare efficacemente i valori di coordinate e dimensioni della grid box e dunque per comprendere come eseguire al meglio il docking senza tralasciare possibili zone di interazione tra recettore e ligando, si ricorre a un programma integrato ad Autodock Tools, chiamato AutoGrid.

AutoGrid richiede semplicemente che siano caricati contemporaneamente su Autodock tools sia la macromolecola che il ligando originariamente presente nel sito di legame.

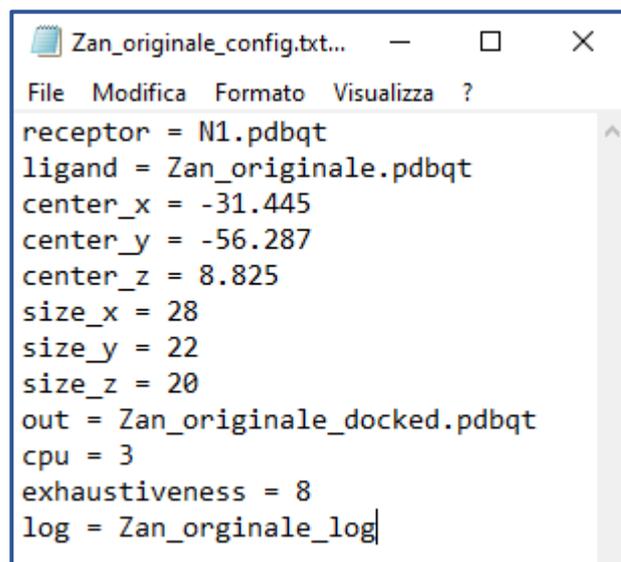
Quindi, impostando dall'apposito menù il ligando come centro per il calcolo della grid box, si può manipolare a piacimento le dimensioni di quest'ultima.

È importante, in questa fase, impostare l'unità di misura dei lati di questo parallelepipedo a 1Å.

Poiché inoltre si deve essere certi che all'interno di quest'area tridimensionale ricadano tutti i residui del sito di legame è bene fare una stima per eccesso delle dimensioni degli spigoli.

I valori ottenuti grazie ad AutoGrid vanno inseriti nel file di configurazione di Vina, nel quale sono specificati tutti i parametri regolabili dall'utente relativi alle caratteristiche e ai "protagonisti" del docking (recettore, ligando e output file).

Qui di lato, un esempio di file di configurazione.



```
Zan_originale_config.txt... - □ ×  
File Modifica Formato Visualizza ?  
receptor = N1.pdbqt  
ligand = Zan_originale.pdbqt  
center_x = -31.445  
center_y = -56.287  
center_z = 8.825  
size_x = 28  
size_y = 22  
size_z = 20  
out = Zan_originale_docked.pdbqt  
cpu = 3  
exhaustiveness = 8  
log = Zan_originale_log|
```

Figura 15

6.3 Protocolli modificati per l'impiego di Chimera.

L'uso di Chimera 1.14 è dovuto alla possibilità di quest'ultimo di gestire il Docking senza ignorare le molecole d'acqua.

Seppure questa caratteristica renda il risultato più affidabile, ha allo stesso determinato alcuni cambiamenti nella procedura di docking.

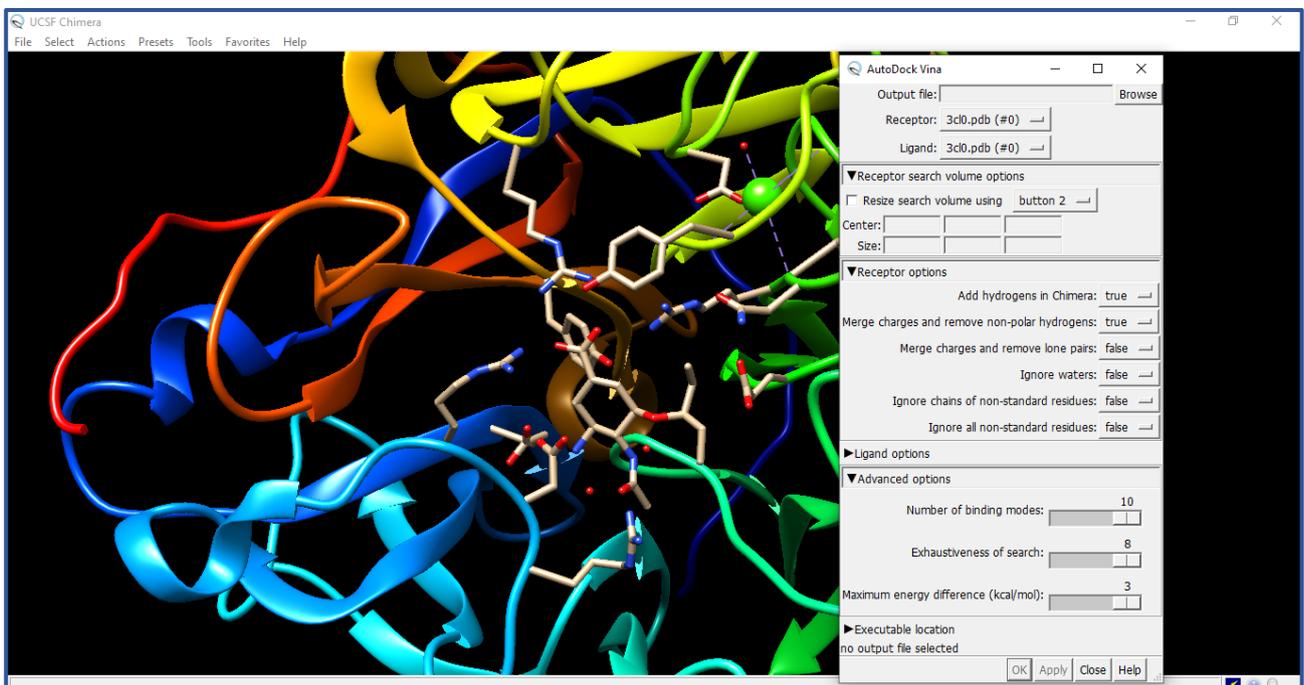
Grossomodo, le operazioni descritte sopra, sono equivalenti a quelle effettivamente eseguite, solo che per quanto riguarda il modo in cui ciò è avvenuto, si deve fare riferimento all'interfaccia grafica di Chimera.

In pratica, dopo l'ottenimento della macromolecola e del ligando non ancora preparato ma già ottimizzato, Chimera permette di eseguire il Docking sopprimendo a tutti i passaggi descritti sopra mediante una serie di comandi preimpostati.

In particolare, l'interfaccia del programma per Vina non prevede la specificazione di un file .config, ma richiede l'inserimento manuale dei valori della grid box, la specifica della cartella in cui andrà depositato il file di output e la directory alla cartella contenente l'eseguibile di Vina.

Nelle varie impostazioni, Chimera permette anche di tenere conto delle molecole d'acqua, e genera nuovi file per recettore e ligando, con un suo metodo di preparazione automatico.

L'interfaccia grafica si presenta come segue:



E da come risultato un file unico delle "Binding Pose", ovvero delle conformazioni di ligando generate dalla funzione di scoring, con una stima approssimativa dell'energia libera di legame tra recettore e ligando per ogni conformazione.

Mediante chimera, inoltre, per eseguire successivamente una analisi delle interazioni con altri strumenti, si prepara un file .pdb di combinazione tra la Binding Pose più rilevante

(sulla base dei criteri di validazione del docking) e la macromolecola preparata dal programma nel file "receptor.pdbqt".

6.4 Proposta di validazione: re-docking e comparazione tra output e cristallografia.

Al fine di verificare l'affidabilità del docking, ovvero di validarne i risultati, si è proceduto su due fronti con la stessa metodica:

1. Estrazione del ligando originale e suo docking senza ottimizzazione geometrica.
2. Ottimizzazione del ligando cristallografico e suo docking.

Si riporta dunque il lavoro di validazione eseguito su ZMR (zanamivir complessato) sulla N1 di 3CKZ, con relativa immagine mostrante la sovrapposizione tra le due strutture e l'RMSD in relazione al modello del ligando originale.

In bioinformatica e chemoinformatica, per RMSD, ovvero Root Mean Square Deviation, si intende un descrittore della omologia tra due strutture conformazionalmente distinte ma che sono superimposte tra loro, ovvero sovrapposte atomo per atomo a partire da una coordinata spaziale di riferimento.

In particolare, l'RMSD quantifica la deviazione dalle posizioni tra gli atomi di due sistemi molecolari rappresentati dai ligandi ed è caratterizzato dall'essere un valore sempre positivo. Tanto più l'RMSD è vicino allo 0, maggiore sarà l'omologia tra le strutture analizzate.

Dati due insiemi di atomi (v e w) facenti parte di due ligandi da analizzare, si definisce l'RSMD con l'equazione:

$$RMSD(v, w) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |v_i - w_i|^2} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [(v_{ix} - w_{ix})^2 + (v_{iy} - w_{iy})^2 + (v_{iz} - w_{iz})^2]}$$

Dove $v_i - w_i$ è la distanza tra due dati atomi dell'insieme v e w , definiti da tre diverse coordinate spaziali.

6.4.1 Risultati della validazione di zanamivir in 3CKZ

Eseguendo il re-docking dello zanamivir (ZMR) cristallografico mediante Chimera 1.14 e impiegando la Binding Pose a valore più alto, si è ottenuta l'immagine di seguito:

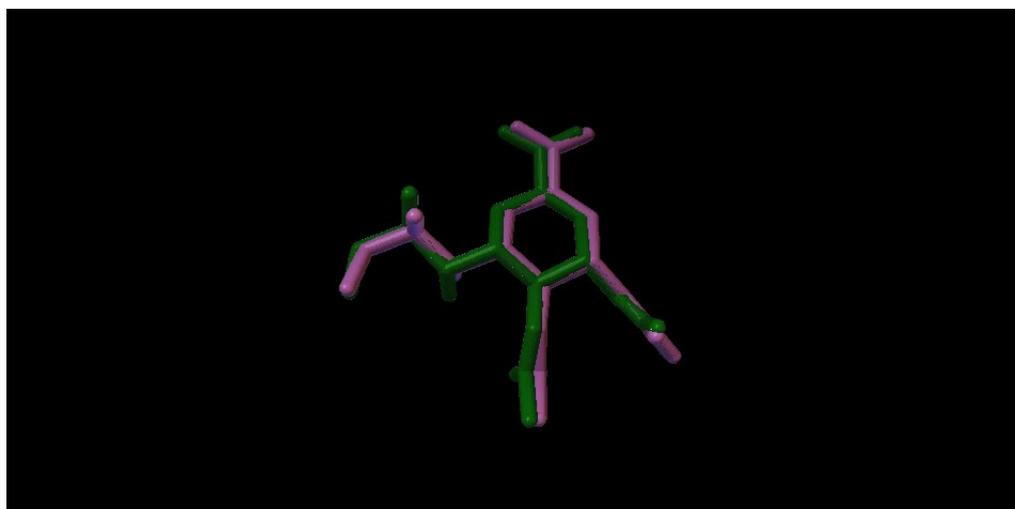
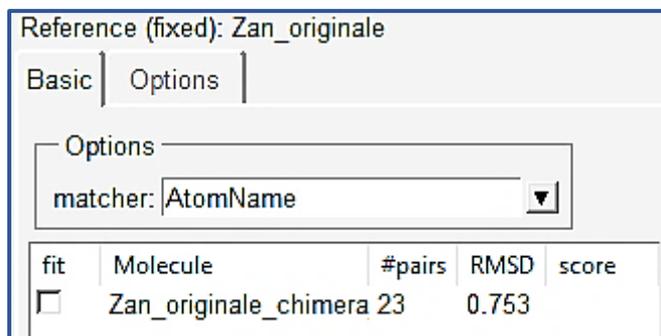


Figura 16, Rendering tridimensionale di ZMR cristallografico, in rosa, e ZMR sottoposto a re-docking, in verde.

Da questa immagine già si intuisce che la conformazione delle strutture è simile, e che il programma ha individuato almeno una delle pose di legame più aderenti alla sperimentazione *in vitro*.

Ciò è confermato dall'analisi dell'RMSD tra ZMR cristallografico e output del docking, tenendo conto solo di atomi di carbonio ed eteroatomi:



Reference (fixed): Zan_originale

Basic | Options

Options

matcher: AtomName

fit	Molecule	#pairs	RMSD	score
<input type="checkbox"/>	Zan_originale_chimera	23	0.753	

Figura 17, valore di RMSD calcolato da Autodock

L'accuratezza del docking quindi, nel migliore dei casi, presenta una tolleranza di circa 0,753 Å rispetto alle reali strutture tridimensionali.

L'accuratezza del docking a seguito di ottimizzazione del ligando, si ottiene con metodi analoghi, di seguito sono riportate le immagini esplicative dei risultati.

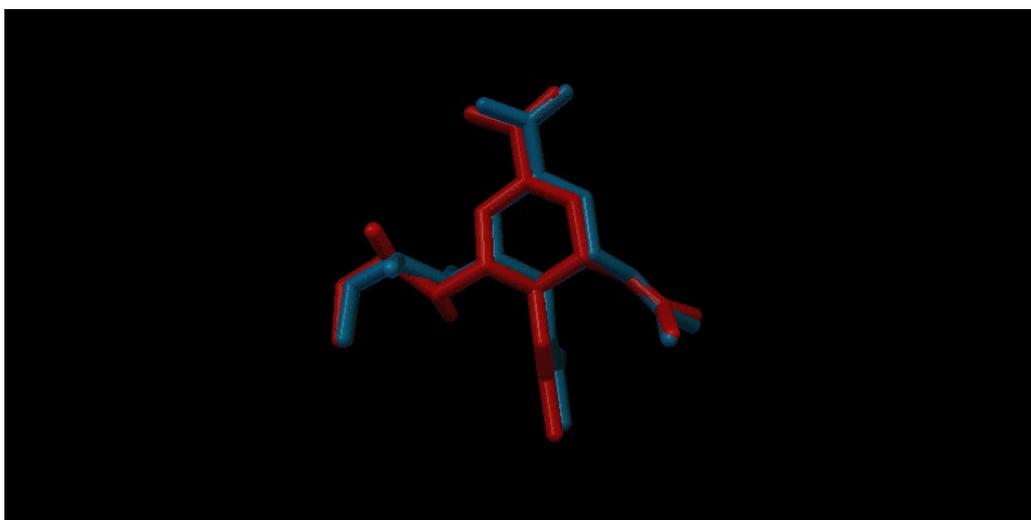
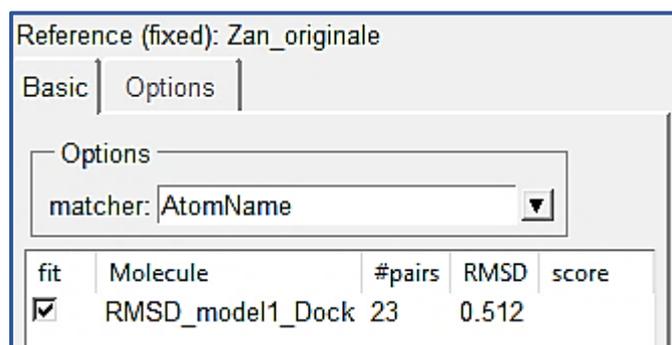


Figura 18, Struttura di ZMR ottimizzata (in rosso) e struttura di ZMR da cristallografia (in blu) sovrapposte tra loro



Reference (fixed): Zan_originale

Basic | Options

Options

matcher: AtomName

fit	Molecule	#pairs	RMSD	score
<input checked="" type="checkbox"/>	RMSD_model1_Dock	23	0.512	

Figura 19: RMSD tra le due strutture qui sopra calcolato da Autodock tools

In maniera sorprendente, l'accoppiata di minimizzazione energetica e docking restituisce una struttura ancora più fedele all'originale cristallografico, visto l'RMSD inferiore anche a quello del re-docking senza ottimizzazione.

7. Risultati di Docking e valutazione delle interazioni recettore-ligando

Nell'ambito di questo lavoro sono state svolte simulazioni di docking con due fini diversi:

1. Comprendere le proprietà dei farmacofori presenti negli inibitori delle sialidasi citati sopra (vedi Sezione 5.1).
2. Ricercare, mediante progettazione razionale, nuovi candidati di inibitori per le sialidasi e studiarne l'interazione con le strutture proteiche di 3CKZ e 3CLO.

Nell'ambito del primo punto, dunque, si è eseguito il docking di Neu5Ac, zanamivir, oseltamivir carbossilato e peramivir.

Riguardo il secondo punto, invece, si è proceduto all'analisi dei farmacofori con lo scopo di individuare strutture dal profilo ADME adeguato (secondo previsioni date sui parametri della regola del cinque di Lipinski) e con attività, quantomeno in vitro, potenzialmente uguale o migliore dei principi attivi già studiati.

Non si è approfondita la componente di sintesi organica relativa alle proposte.

Per studiare adeguatamente le interazioni proteina-ligando, si è impiegato il sito PLIP, ovvero, Protein Ligand Interaction Profiler (<https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>).

Tale servizio online è in grado di fornire sia un output analizzabile mediante il programma di modellistica molecolare PyMOL sia una serie di dati relativi all'entità, alla lunghezza e ai gruppi chimici coinvolti nelle interazioni di non-legame tra ligando e recettore.

Si procede di seguito con l'analisi di ogni singolo candidato al docking.

7.1 Acido Sialico (Neu5Ac)

Dal docking dell'acido sialico nel sito attivo della N1 di 3CKZ è stato prodotto il seguente rendering 3D, che mette in luce le interazioni polari (in blu), apolari (grigio tratteggiato) e a ponte salino (giallo tratteggiato, mix di interazioni elettrostatiche e legami H).

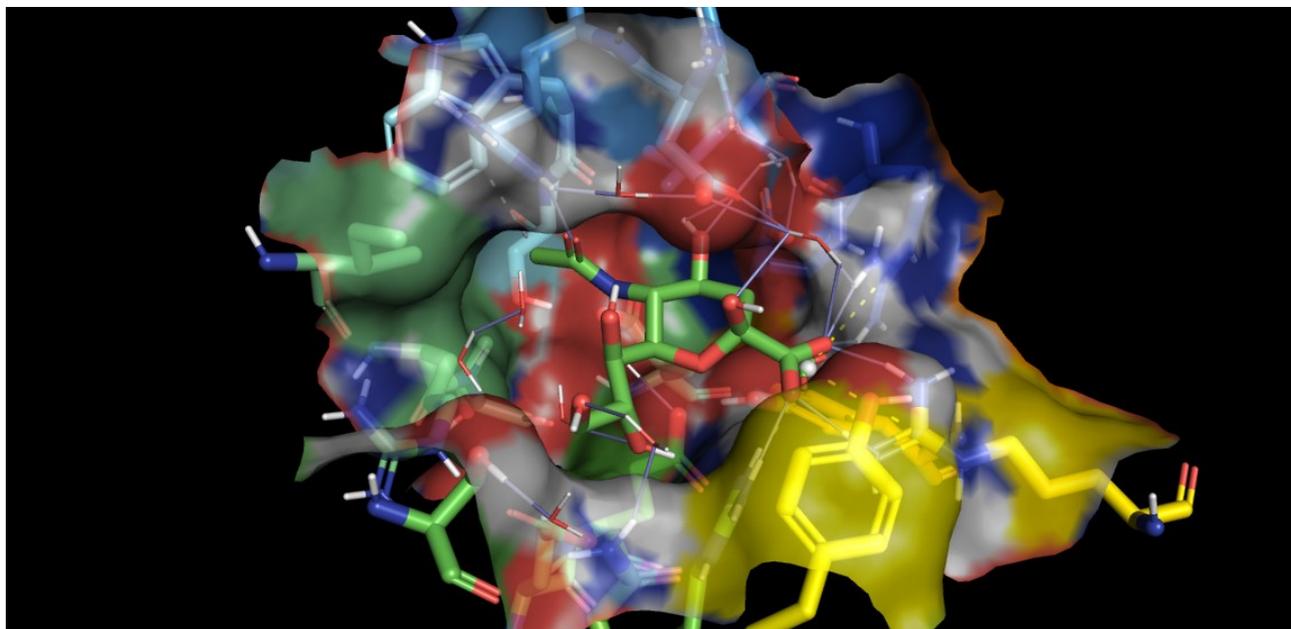


Figura 20, Elaborazione 3D del complesso Enzima-Prodotto con Neu5Ac

Tale immagine trova una migliore descrizione nelle tabelle di seguito, elaborate da PLIP. NOTA: il profiler non ha rilevato le interazioni normalmente presenti tra Neu5Ac, ARG224 e ILE222, che si devono assumere comunque come presenti.

Download visualization [in PyMol \(.pse\) format](#) | [as \(.png\) image](#)

[Hydrophobic Interactions](#)

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	178A	TRP	3.55	4214	923

[Hydrogen Bonds](#) —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Sidechain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	151A	ASP	3.51	4.09	121.23	✘	✓	4209 [O3]	655 [O2]
2	151A	ASP	2.31	2.75	107.96	✓	✓	654 [O3]	4216 [O3]
3	151A	ASP	2.25	2.75	111.95	✘	✓	4216 [O3]	654 [O3]
4	152A	ARG	2.03	2.89	141.16	✓	✓	667 [Ng+]	4213 [O2]
5	246A	SER	2.90	3.65	136.16	✘	✓	4207 [O3]	1535 [O3]
6	292A	ARG	2.90	3.53	121.01	✓	✓	1975 [Ng+]	4201 [O3]
7	292A	ARG	3.51	4.05	115.37	✓	✓	1974 [Ng+]	4201 [O3]
8	294A	ASN	3.47	3.85	104.43	✓	✓	1998 [Nam]	4207 [O3]

Water Bridges —

Index	Residue	AA	Dist. A-W	Dist. D-W	Donor Angle	Water Angle	Protein donor?	Donor Atom	Acceptor Atom	Water Atom
1	118A	ARG	3.35	3.86	109.10	82.40	✓	334 [Ng+]	4216 [O3]	3665
2	118A	ARG	2.86	3.36	112.62	85.75	✓	334 [Ng+]	4221 [O3]	4010
3	151A	ASP	3.32	2.86	102.57	112.10	✗	4221 [O3]	655 [O2]	4010
4	224A	ARG	3.55	4.02	100.36	90.44	✓	1344 [Ng+]	4204 [O3]	3938
5	227A	GLU	2.64	2.80	157.28	77.28	✗	4211 [Nam]	1383 [O2]	3914
6	277A	GLU	3.42	4.07	111.28	115.07	✗	4211 [Nam]	1848 [O2]	3938

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	118A	ARG	4.79	✓	Carboxylate	4219, 4220
2	292A	ARG	4.37	✓	Carboxylate	4219, 4220
3	371A	ARG	3.44	✓	Carboxylate	4219, 4220

Figura 21, Tabelle riassuntive sulle interazioni di non-legame nel complesso enzima-prodotto.

Come si può facilmente notare, ricoprono un ruolo importante nella stabilizzazione del complesso i legami a ponte d'acqua tra residui amminoacidici e gruppi accettori e donatori di legami a idrogeno in Neu5Ac.

Le interazioni sono meglio schematizzate di seguito:

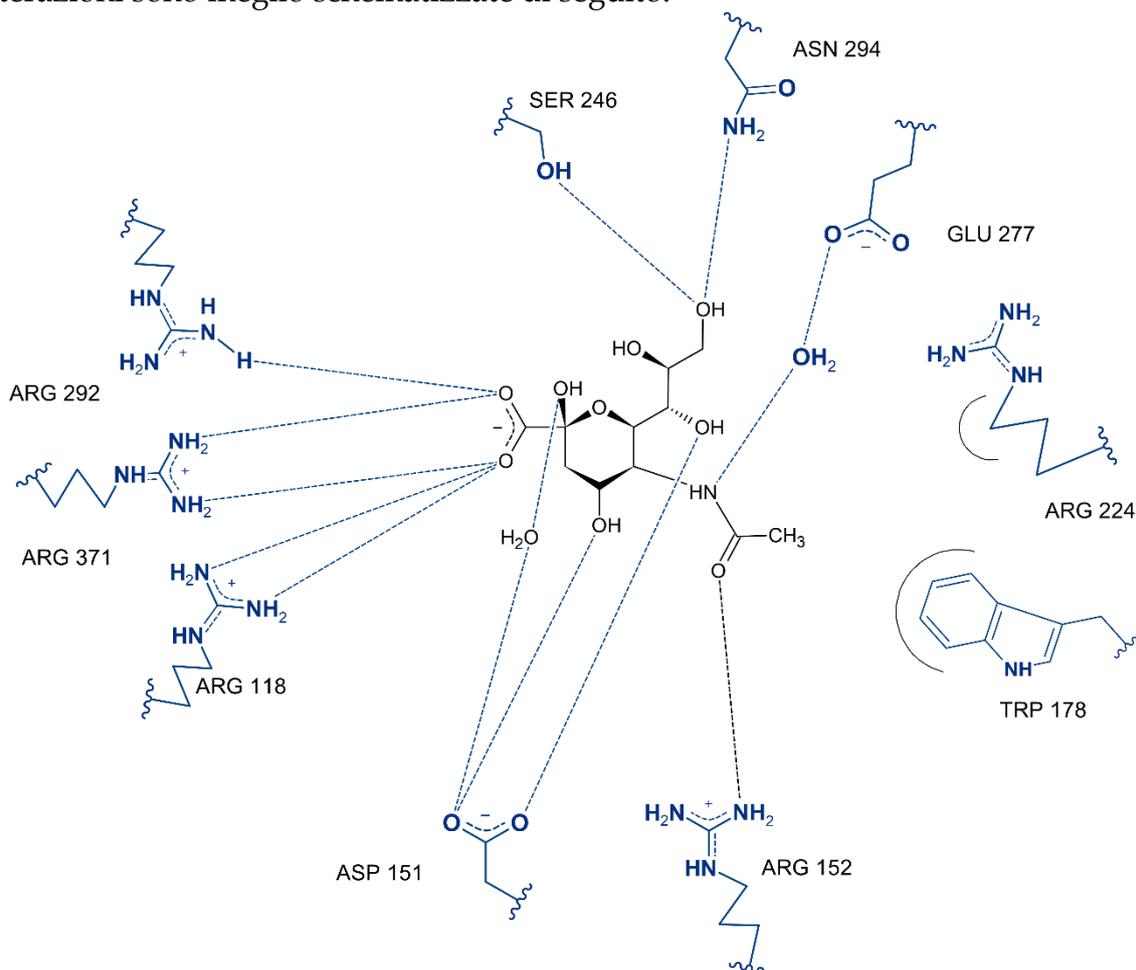


Figura 22, Mappa delle interazioni polari tra Acido sialico e sito di legame derivata dal profiling di PLIP

Sono state individuate da Vina 4 conformazioni possibili, di cui la più plausibile sembra la prima, presente nel rendering di cui sopra. Si deve tenere conto, però, che il docking non fornisce informazioni totalmente accurate sul complesso di legame, in quanto pecca nel considerare statico il sistema chimico contenente enzima e ligando (non è calcolata dunque l'entropia).

7.2 Zanamivir

Si riportano i risultati di docking relativi alla versione ottimizzata di zanamivir con N1 da 3CKZ, con relative tabelle sulle interazioni del complesso. Il punteggio della binding pose migliore è pari a -9.4 Kcal/mol.

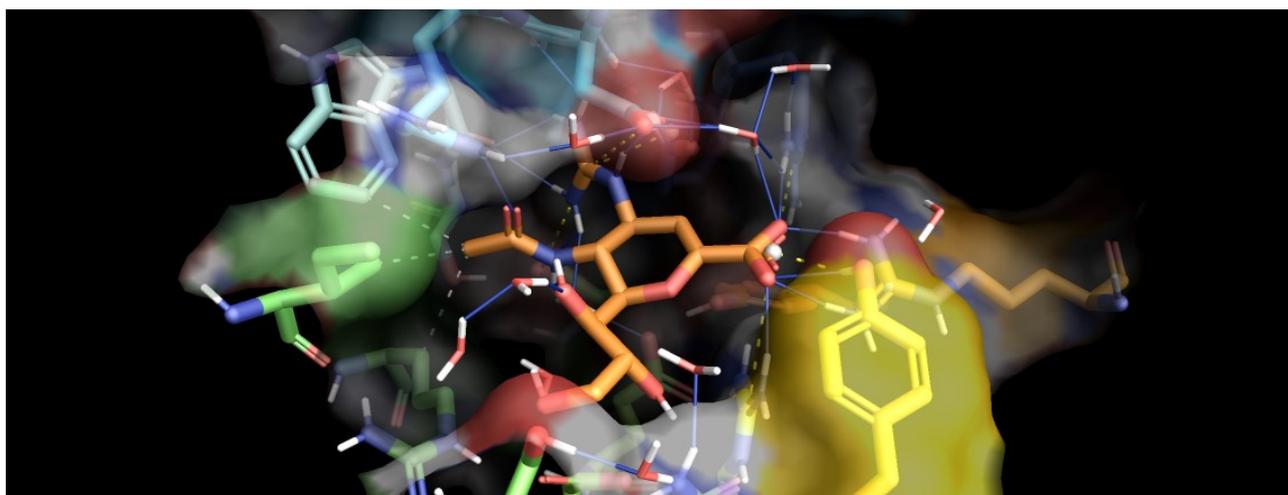


Figura 23, Rendering del complesso enzima-inibitore tra N1 e zanamivir, si noti la presenza delle interazioni a ponte salino tra il catione guanidinio e i carbossilati di alcuni residui (vedi tabella in Figura 24), e le interazioni idrofobiche dell'N-acetile con i residui di TRP, ILE e ARG.

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	178A	TRP	3.61	6336	1475
2	222A	ILE	3.71	6336	2114
3	224A	ARG	3.67	6336	2150

Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Sidechain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	152A	ARG	2.09	2.93	139.38	✓	✓	1068 [Ng+]	6335 [O2]
2	156A	ARG	3.75	4.08	101.90	✓	✓	1134 [Ng+]	6327 [Ng+]
3	156A	ARG	2.35	2.85	109.46	✓	✓	1133 [Ng+]	6327 [Ng+]
4	178A	TRP	2.33	3.12	130.96	✗	✗	6326 [Ng+]	1466 [O2]
5	178A	TRP	2.37	3.14	129.87	✗	✗	6327 [Ng+]	1466 [O2]
6	274A	TYR	3.22	3.83	123.50	✓	✓	2898 [O3]	6348 [O3]
7	292A	ARG	3.38	3.90	113.90	✓	✓	3149 [Ng+]	6323 [O2]
8	292A	ARG	3.06	3.62	116.40	✓	✓	3150 [Ng+]	6323 [O2]
9	294A	ASN	2.67	3.70	169.97	✗	✓	6345 [O3]	3182 [O2]
10	347A	TYR	3.21	4.08	150.80	✓	✓	3880 [O3]	6339 [O.co2]

Water Bridges

Index	Residue	AA	Dist. A-W	Dist. D-W	Donor Angle	Water Angle	Protein donor?	Donor Atom	Acceptor Atom	Water Atom
1	118A	ARG	3.79	3.86	109.10	80.72	✓	539 [Ng+]	6324 [Ng+]	5787
2	118A	ARG	3.98	3.36	112.62	104.49	✓	539 [Ng+]	6340 [O.co2]	6132
3	118A	ARG	2.98	3.36	112.62	138.91	✓	539 [Ng+]	6339 [O.co2]	6132
4	119A	GLU	2.77	3.79	113.26	104.80	✗	6324 [Ng+]	561 [O2]	5787
5	277A	GLU	3.42	3.55	123.52	110.91	✗	6333 [Nam]	2952 [O2]	6060

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	118A	ARG	4.97	✓	Carboxylate	6339, 6340
2	119A	GLU	3.50	✗	Guanidine	6324, 6326, 6327
3	151A	ASP	4.53	✗	Guanidine	6324, 6326, 6327
4	227A	GLU	4.94	✗	Guanidine	6324, 6326, 6327
5	292A	ARG	4.51	✓	Carboxylate	6339, 6340
6	371A	ARG	3.60	✓	Carboxylate	6339, 6340

Figura 24, Tabelle riassuntive delle interazioni proteina-ligando di ZMR.

E di seguito lo schema strutturale riassuntivo di parte delle interazioni polari e ioniche:

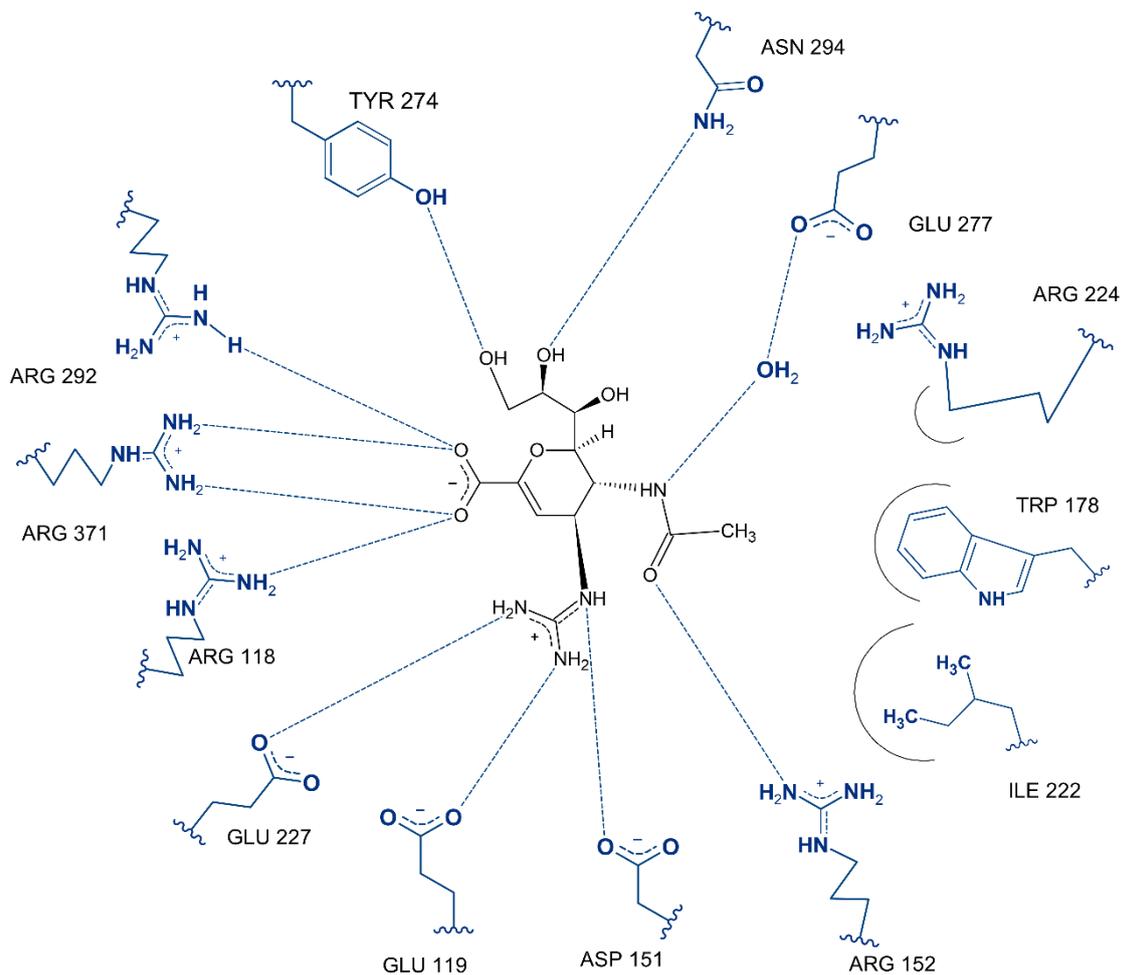


Figura 25, Mappa delle interazioni polari (e ioniche) tra ZMR e i residui del sito di legame.

Si noti come TYR 274, derivato dalla mutagenesi sito specifica, interagisca con l'ossidrile sul C9, senza quindi avere ripercussioni sull'affinità del ligando col sito attivo.

7.3 Oseltamivir carbossilato

Si riportano di seguito i risultati del docking eseguito su oseltamivir con la struttura proteica N1 estratta da 3CL0.

Sono state individuate 10 binding pose distinte, di cui quella più vicina alla struttura cristallografica presentava un punteggio di -8,00 Kcal/mol, contro il -9,4 Kcal/mol di zanamivir.

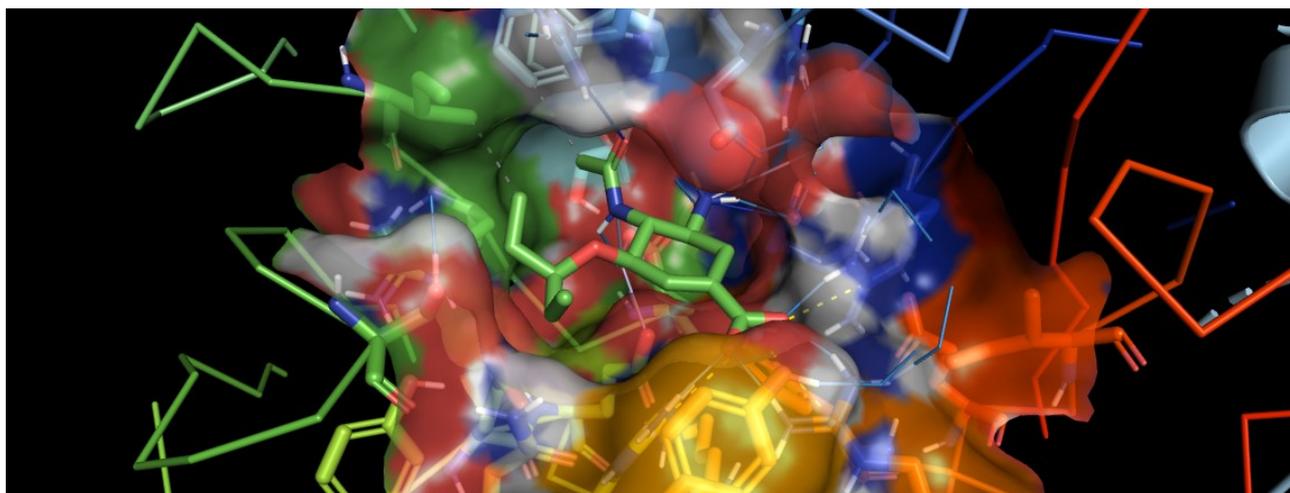


Figura 26, Render 3D del complesso enzima-inibitore di oseltamivir ed N1, si noti come non figurano molte interazioni idrofobiche.

Hydrophobic Interactions ****

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	178A	TRP	3.72	4174	925
2	222A	ILE	3.70	4169	1325

Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Sidechain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	119A	GLU	2.37	3.20	138.90	✗	✓	4177 [N3]	349 [O2]
2	152A	ARG	1.93	2.86	151.77	✓	✓	667 [Ng+]	4175 [O2]

Water Bridges —

Index	Residue	AA	Dist. A-W	Dist. D-W	Donor Angle	Water Angle	Protein donor?	Donor Atom	Acceptor Atom	Water Atom
1	156A	ARG	4.09	3.31	147.57	81.55	✓	711 [Ng+]	4177 [N3]	3953
2	277A	GLU	2.66	3.11	124.25	81.01	✗	4172 [Nam]	1848 [O2]	3815

Salt Bridges ****

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	118A	ARG	5.07	✓	Carboxylate	4182, 4183
2	292A	ARG	4.33	✓	Carboxylate	4182, 4183
3	371A	ARG	3.49	✓	Carboxylate	4182, 4183

Figura 27, Tabelle dell'interazione tra sito attivo e oseltamivir

In accordo con i dati forniti sull'articolo di cui sopra, la mutazione di HYS 274 con una tirosina risulta nell'impossibilità per i residui del sito di legame di riorganizzarsi, impedendo dunque l'esposizione della tasca idrofobica in grado di interagire con la catena laterale alchilica del principio attivo. In questa simulazione computazionale, si è osservato che la catena laterale di oseltamivir, interagisce in ogni caso con la porzione idrofobica e apolare della isoleucina 222.

Di seguito, lo schema riassuntivo delle interazioni polari e ioniche:

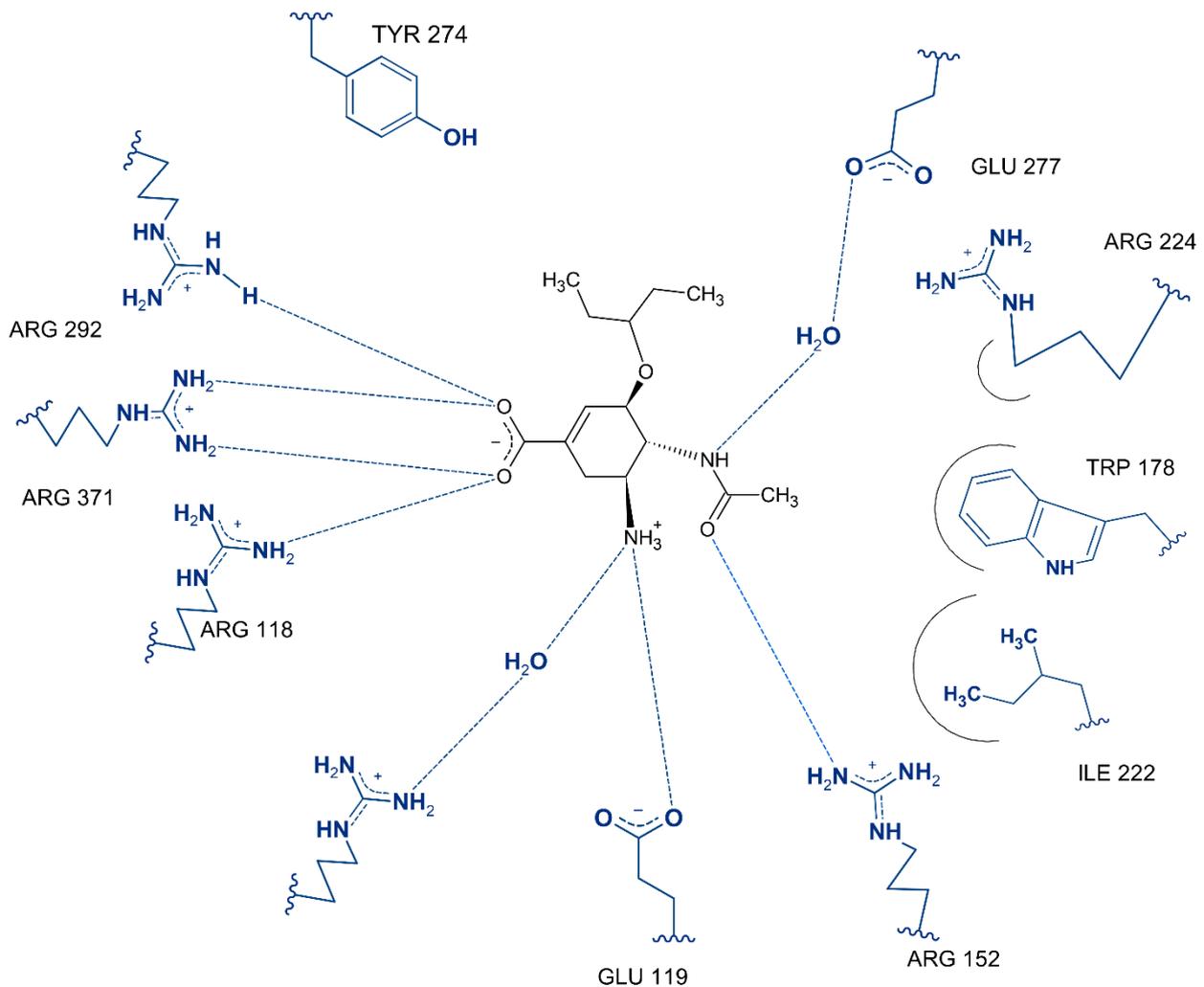


Figura 28, Mappa riassuntiva delle interazioni proteina-ligando tra oseltamivir carbossilato e N1 estratta da 3CLO

7.4 Peramivir

Di seguito, i risultati del docking di peramivir, modellato mediante il programma Avogadro e quindi ottimizzato con UFF (Universal Force Field), in quanto l'MMFF94 non ha dato risultati attendibili.

Il set di risultati è stato particolarmente scarso in confronto a zanamivir e in parte anche a Neu5Ac stesso, con un punteggio di -7,7 Kcal/mol per il docking con 3CLO e -7,6 Kcal/mol con 3CKZ, seppure in due pose di legame abbastanza diverse.

Ai fini di questo lavoro, si riporta solo il risultato del docking con 3CKZ:

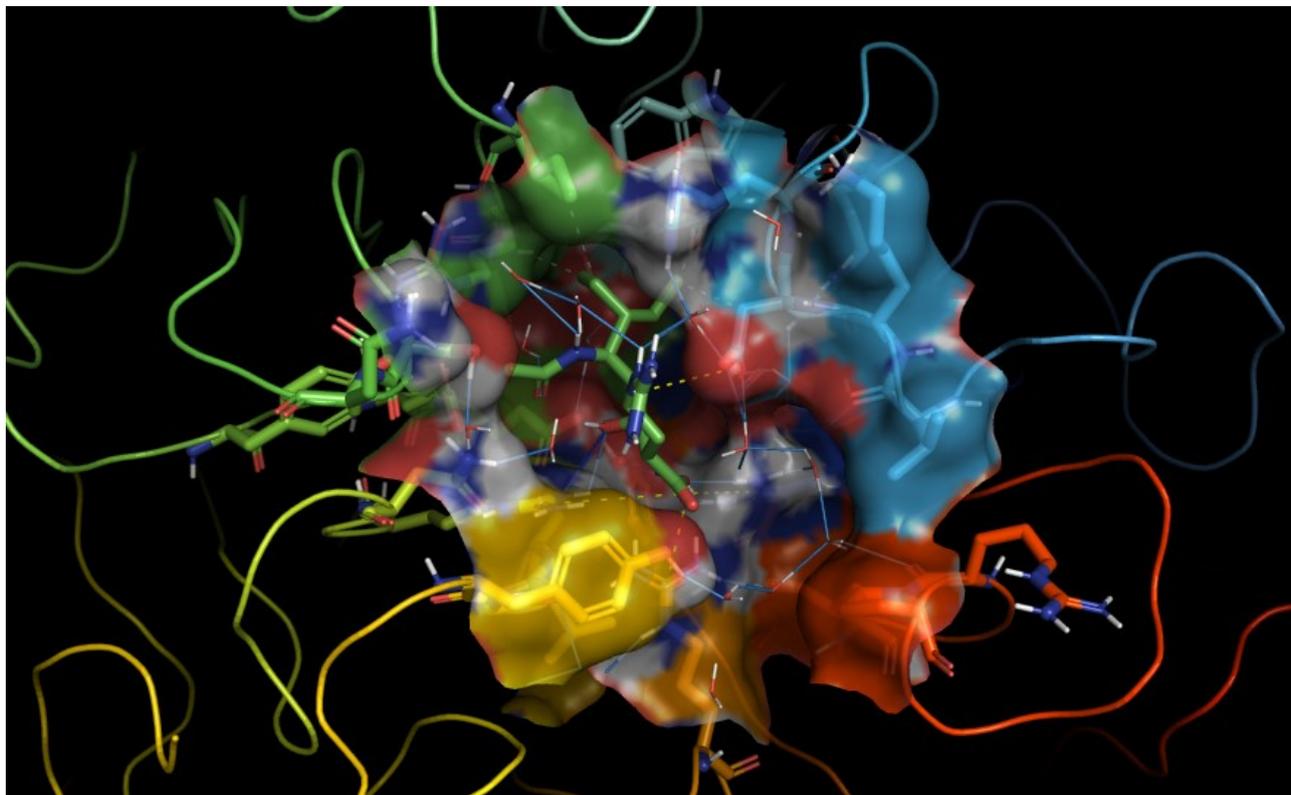


Figura 29, Rendering 3D del complesso proteina-ligando tra peramivir e N1 dal modello 3CKZ, il codice dei colori per le interazioni è uguale alle precedenti immagini.

Hydrophobic Interactions ****

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	151A	ASP	3.37	4209	652
2	152A	ARG	3.26	4209	662
3	222A	ILE	3.45	4210	1325
4	224A	ARG	3.36	4211	1341

Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Sidechain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	292A	ARG	3.50	3.92	107.27	✓	✓	1974 [Ng+]	4221 [O3]
2	292A	ARG	2.51	3.07	114.03	✓	✓	1975 [Ng+]	4221 [O3]
3	406A	TYR	2.23	2.99	136.93	✗	✓	4225 [O.co2]	3023 [O3]

Index	Residue	AA	Dist. A-W	Dist. D-W	Donor Angle	Water Angle	Protein donor?	Donor Atom	Acceptor Atom	Water Atom
1	118A	ARG	2.78	3.36	112.62	113.16	✓	334 [Ng+]	4224 [O.co2]	4010
2	151A	ASP	2.54	2.81	123.93	97.86	✗	4212 [Ng+]	655 [O2]	4172
3	152A	ARG	2.84	3.98	120.09	75.21	✓	666 [Ng+]	4215 [Ng+]	4172
4	152A	ARG	3.24	3.90	118.61	105.83	✓	667 [Ng+]	4212 [Ng+]	4121
5	152A	ARG	2.85	3.90	118.61	81.81	✓	667 [Ng+]	4202 [Nam]	4121
6	224A	ARG	3.16	4.02	100.36	97.34	✓	1344 [Ng+]	4205 [O2]	3938
7	347A	TYR	3.74	2.62	157.10	127.00	✓	2457 [O3]	4224 [O.co2]	3695

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	118A	ARG	4.19	✓	Carboxylate	4225, 4224
2	151A	ASP	4.83	✗	Guanidine	4212, 4214, 4215
3	292A	ARG	5.31	✓	Carboxylate	4225, 4224
4	371A	ARG	3.48	✓	Carboxylate	4225, 4224

Figura 30, Tabelle riassuntive sulle interazioni di non legame di Peramivir e 3CLO

Si può facilmente notare che questo principio attivo da interazioni idrofobiche maggiori dei due precedenti, anche a causa della ridotta dimensione molecolare della struttura di base (un ciclopentano) che permette una maggiore libertà nel posizionamento della frazione lipofila del sostituito. Si mantiene però anche una discreta affinità del catione guanidinico per ASP 151.

Di seguito uno schema strutturale riassuntivo per le interazioni polari e ioniche:

Si è evidenziato con gli archi di circonferenza le zone apolari idrofobe che interagiscono con la catena del sostituito etil-butilico in posizione 3, senza però descrivere graficamente tali interazioni.

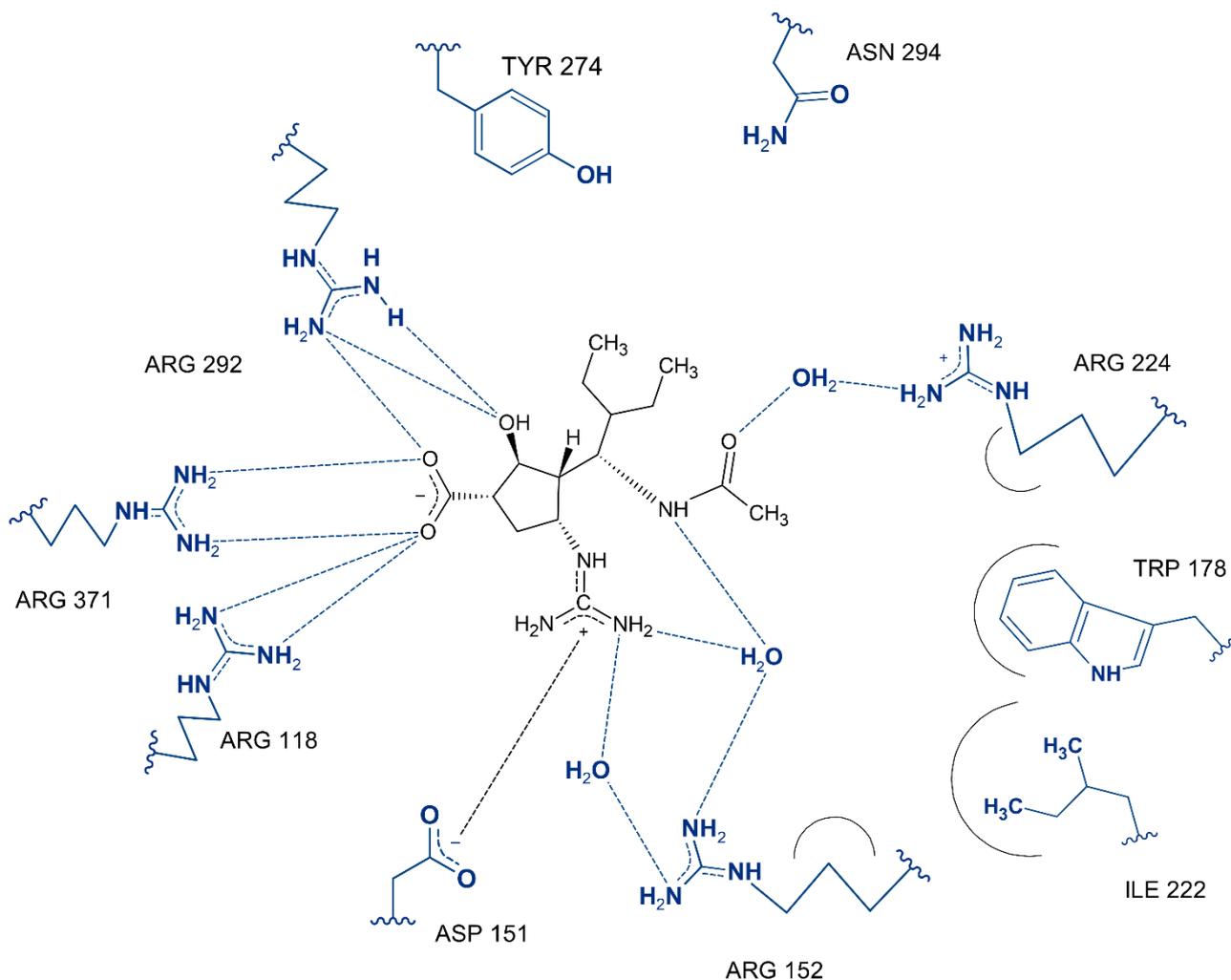


Figura 31, mappa delle interazioni polari e ioniche tra peramivir e residui del sito di legame.

7.5 Proposte personali di farmaco: Ipotesi Pirrolidone e sviluppo di Pirrolivir.

Questa parte di lavoro è di tipo sperimentale.

Mediante lo studio *in silico* di nuove proposte farmacologiche, si vuole dimostrare l'acquisizione di competenza nell'uso dei programmi e dei metodi del Rational Drug Design, seppur ad un livello ancora basilare.

Dunque, sarà di seguito descritto il processo di progettazione a partire dalle idee iniziali per ognuna delle proposte.

7.5.1 Proposta 1: Ipotesi Zanamivir (R)-idrossipirrolidone.

Nei tentativi iniziali si è scelto Zanamivir come molecola di partenza da cui ricavare derivati a maggiore attività inibitoria.

Si è proceduto all'espansione del gruppo N-Acetilico e alla sua ciclizzazione, in modo da ottenere un pirrolidone su cui agganciare in seguito nuovi possibili gruppi biologicamente attivi.

La struttura di questo primo composto (vedi Figura 33) presenta un notevole ingombro sterico e fornisce quindi interazioni peggiori con il sito attivo di 3CKZ (scelto come fonte della struttura proteica in quanto presentante in origine un ligando ZMR). In particolare, si è ottenuto -8.8 Kcal/mol come punteggio migliore per le binding pose ottenute.

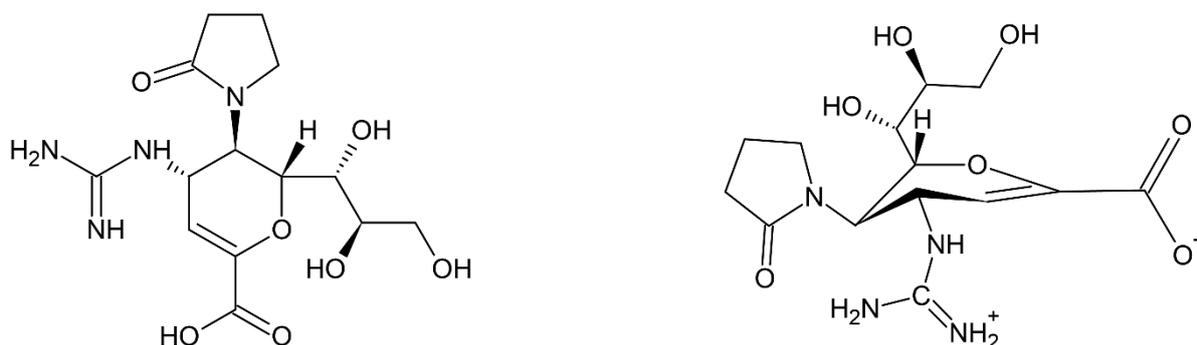


Figura 32, Formula di struttura dell'ipotesi zanamivir-pirrolidone e relativa rappresentazione a mezza sedia

Tale risultato, comunque, era prevedibile, alla luce appunto della natura più ingombrante del sostituto rispetto all'N-acetile.

Si è proceduto comunque a verificare se, sostituendo il quinto carbonio con un ossidrile, si ottenesse un risultato migliore. In una minima parte, ciò si verifica impiegando un ossidrile con configurazione R del carbonio chirale, in quanto il miglior punteggio ottenuto dal docking è di -8.9 Kcal/mol.

Risulta evidente, già solo da queste informazioni e dall'analisi delle interazioni, che l'ipotesi farmacologica "Zanamivir (R)-idrossipirrolidone", dal sottoscritto elaborata, non sia la strada giusta da seguire.

Si propone dunque un velocissimo riepilogo grafico su: formula di struttura della seconda ipotesi, rendering 3D del sito di legame e tabelle computate da PLIP.

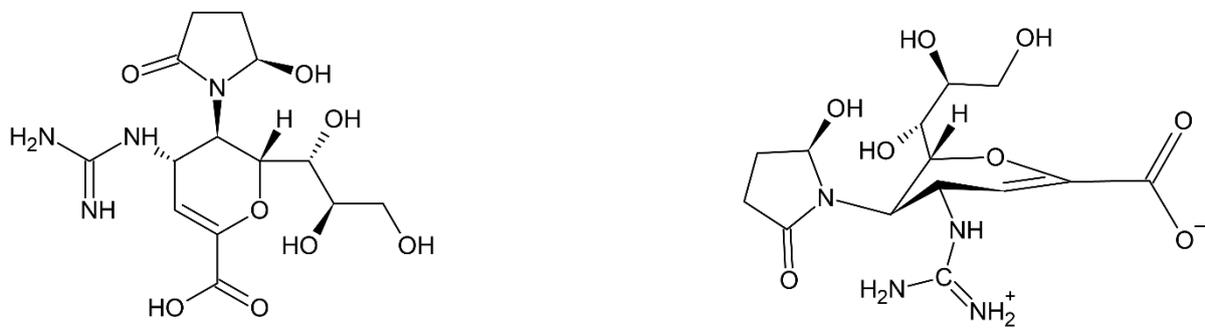


Figura 33, Formule di struttura dell'ipotesi Zanamivir_(R)Idrossipirrolidone.

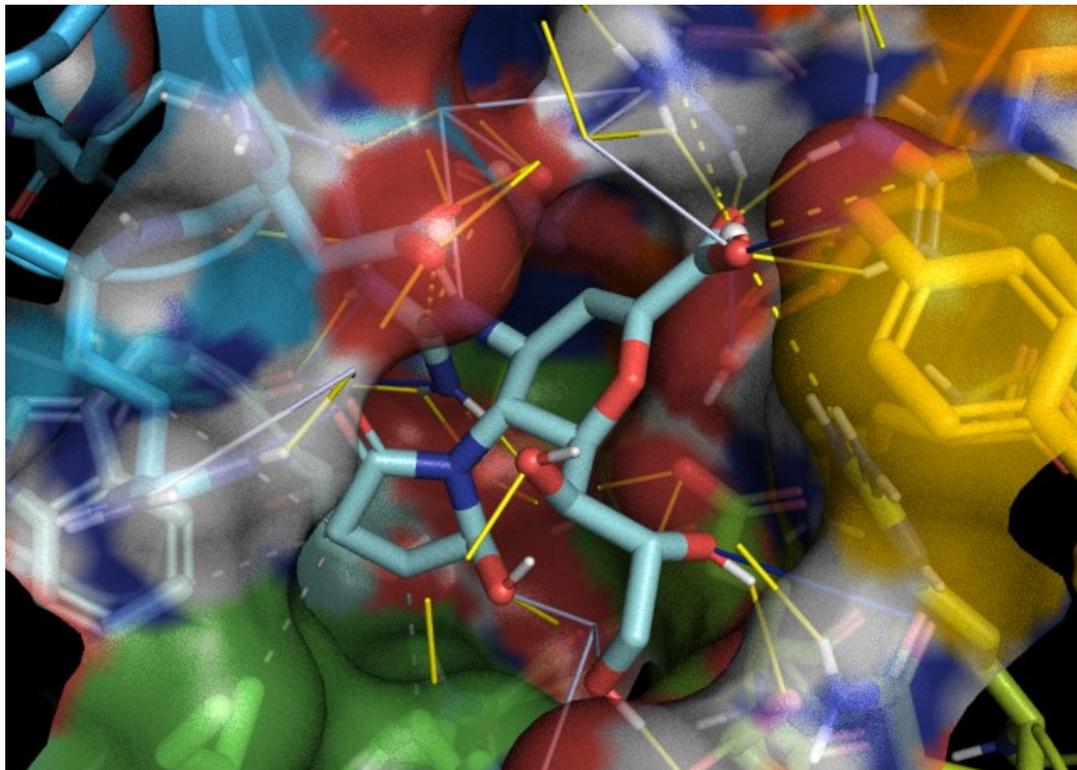


Figura 34, Rendering 3D del complesso enzima-ligando, con il sostituito idrossi-pirrolidone ben in vista.

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	152A	ARG	3.92	4214	662
2	178A	TRP	3.77	4214	925
3	222A	ILE	3.33	4214	1325
4	224A	ARG	3.40	4215	1341

Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Sidechain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	152A	ARG	1.93	2.85	150.79	✓	✓	667 [Ng+]	4213 [O2]
2	156A	ARG	2.51	2.87	100.91	✓	✓	710 [Ng+]	4204 [Ng+]
3	178A	TRP	2.48	3.15	121.97	✗	✗	4205 [Ng+]	916 [O2]
4	178A	TRP	2.09	2.88	131.53	✗	✗	4204 [Ng+]	916 [O2]
5	276A	GLU	2.00	2.85	142.49	✗	✓	4225 [O3]	1837 [O3]
6	294A	ASN	3.18	4.09	153.78	✗	✓	4227 [O3]	1997 [O2]
7	347A	TYR	2.07	2.84	135.99	✓	✓	2457 [O3]	4221 [O.co2]
8	406A	TYR	2.59	3.00	106.64	✗	✓	4220 [O.co2]	3023 [O3]

Water Bridges —

Index	Residue	AA	Dist. A-W	Dist. D-W	Donor Angle	Water Angle	Protein donor?	Donor Atom	Acceptor Atom	Water Atom
1	118A	ARG	3.69	3.86	109.10	78.87	✓	334 [Ng+]	4202 [Ng+]	3665
2	118A	ARG	3.15	3.36	112.62	109.21	✓	334 [Ng+]	4221 [O.co2]	4010
3	119A	GLU	2.77	3.69	125.36	105.50	✗	4202 [Ng+]	349 [O2]	3665
4	152A	ARG	4.04	3.98	120.09	88.71	✓	666 [Ng+]	4213 [O2]	4172
5	224A	ARG	2.88	4.02	100.36	101.34	✓	1344 [Ng+]	4217 [O3]	3938
6	224A	ARG	4.03	4.02	100.36	129.08	✓	1344 [Ng+]	4225 [O3]	3938

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	118A	ARG	4.38	✓	Carboxylate	4221, 4220
2	119A	GLU	3.51	✗	Guanidine	4202, 4204, 4205
3	151A	ASP	4.74	✗	Guanidine	4202, 4204, 4205
4	227A	GLU	4.74	✗	Guanidine	4202, 4204, 4205
5	292A	ARG	4.90	✓	Carboxylate	4221, 4220
6	371A	ARG	3.47	✓	Carboxylate	4221, 4220

Figura 35, Tabelle sulle interazioni fornite da PLIP.

7.5.2 Dall'Ipotesi 5C_pirrolidone al candidato Pirrolivir.

Accantonata la via della modifica di zanamivir, si è deciso il cambiamento definitivo dell'approccio alla progettazione.

Si è optato dunque per la via della decostruzione razionale dei farmaci già noti, per giungere all'individuazione degli elementi farmacoforici fondamentali da inserire nella struttura delle future ipotesi.

L'intuizione migliore, dunque, è venuta studiando il meccanismo di reazione e comparandolo con peramivir, da quest'idea, quindi si è deciso di partire da uno scheletro molecolare ciclico a cinque termini, che però presentasse anche un certo grado di rigidità nella sua struttura conformazionale, ovvero che avesse una parziale planarità rispetto ad un normale ciclopentano.

A tale scopo si doveva individuare un composto avente almeno un carbonio ibridato sp^2 .

L'ipotesi migliore, dunque, è venuta dal fallimento precedente: si è adottato come base molecolare proprio il pirrolidone.

Si è scelta questa molecola in quanto il suo anello γ -lattamico presenta non solo un carbonio ibridato sp^2 ma anche un carattere parzialmente rigido del legame tra N e C1, dovuto alla presenza di un ibrido di risonanza tra diverse forme limite.

Si è dunque proceduto con l'inserimento dei gruppi chimici biologicamente attivi:

- Il carbossilato è stato posto sull'azoto ammidico.

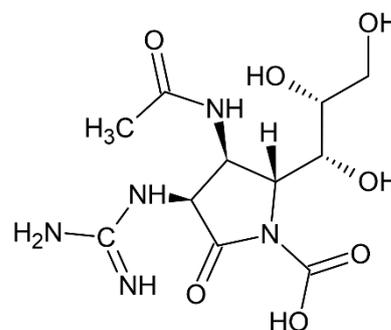


Figura 36, Struttura dell'ipotesi 5C_pirrolidone

- Il catione guanidinio è stato posto sul C2 con configurazione R.
- Il gruppo N-acetile è stato posto sul C3 con configurazione S.
- La catena di (R,R)-glicerolo presente in Neu5Ac è stata mantenuta tale e quale e inserita sul C4 con configurazione R.

Sono stati dunque eseguiti diversi tentativi di docking, con risultati molto promettenti.

Nel secondo tentativo, ad esempio, sono state generate 6 conformazioni diverse, con punteggi assegnati da Vina migliori anche di quelli calcolati per zanamivir.

La miglior Binding Pose per la molecola di cui sopra, da me chiamata "Ipotesi 5C_pirrolidone", presenta -9.8 Kcal/mol come punteggio.

Si riportano di seguito alcuni rendering 3D del complesso enzima-ligando e le tabelle generate da PLIP sulle interazioni di legame:

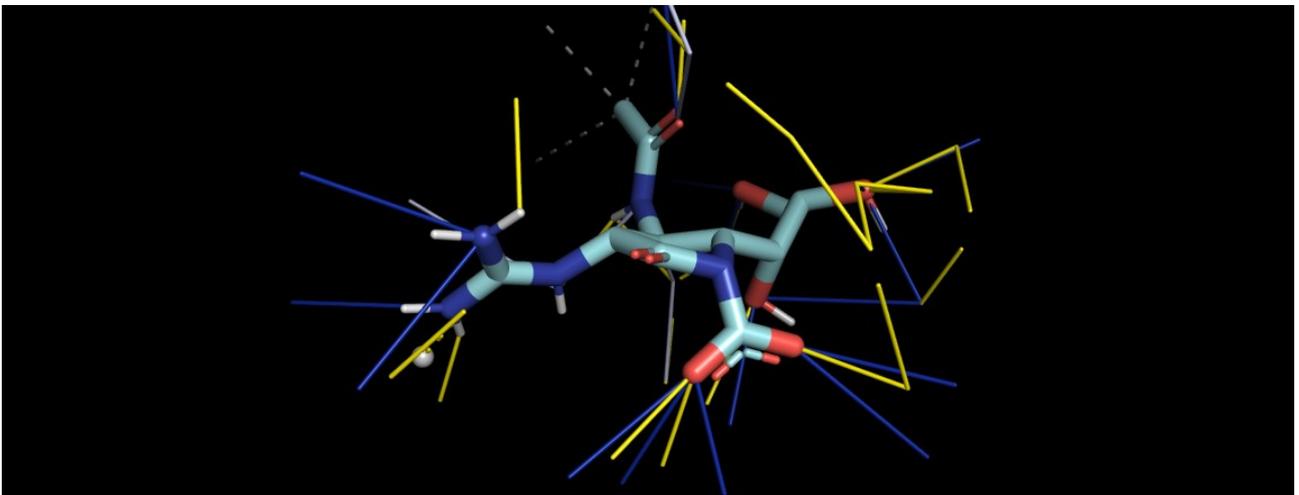


Figura 37, Struttura tridimensionale della conformazione migliore per il ligando, in blu i legami a idrogeno previsti da PLIP, in giallo le interazioni polari previste da PyMOL.

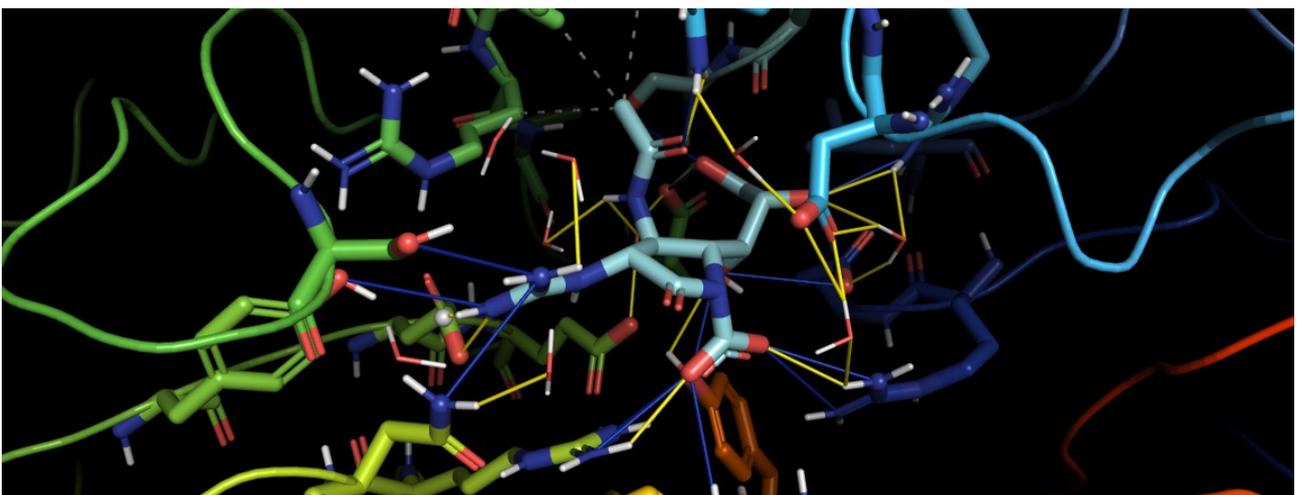


Figura 38, Rappresentazione 3D dei residui del sito attivo che interagiscono con l'Ipotesi 5C_pirrolidone, si noti come l'unica interazione a ponte salino sia tra GLU 119 e il catione guanidinio.

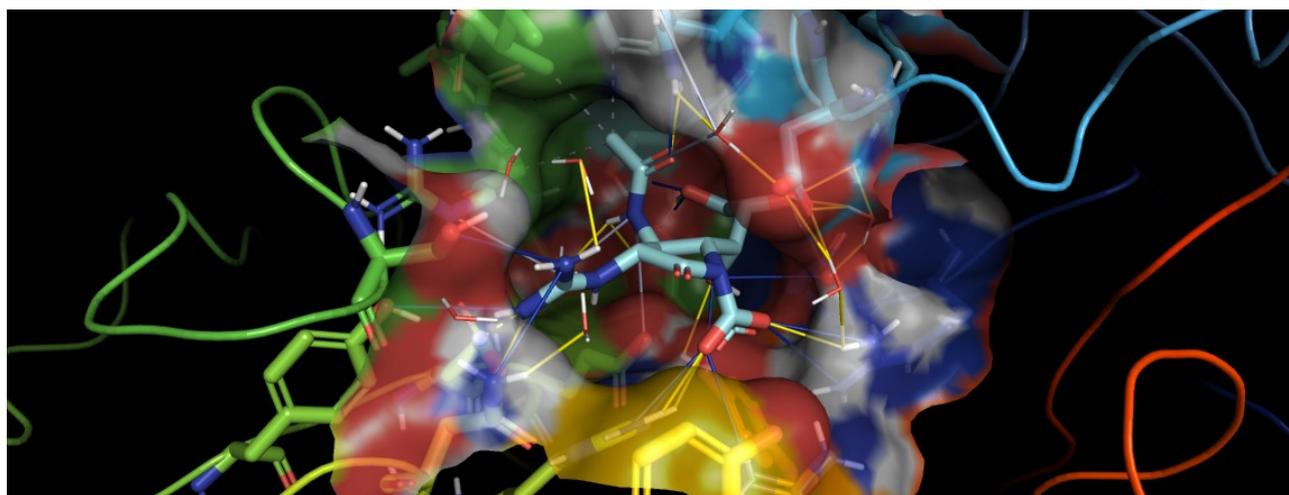


Figura 39, Rappresentazione più completa della tasca del sito attivo complessato con il ligando.

Hydrophobic Interactions ****

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	178A	TRP	3.86	4216	925
2	222A	ILE	3.11	4216	1325
3	224A	ARG	3.92	4216	1341

Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Sidechain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	118A	ARG	3.27	3.97	127.53	✓	✓	333 [Ng+]	4202 [O.co2]
2	118A	ARG	2.51	3.37	142.31	✓	✓	334 [Ng+]	4202 [O.co2]
3	119A	GLU	2.95	3.71	134.36	✗	✓	4211 [O3]	349 [O2]
4	119A	GLU	1.89	2.86	166.21	✗	✓	4209 [O3]	349 [O2]
5	151A	ASP	2.28	3.07	141.90	✓	✓	654 [O3]	4209 [O3]
6	152A	ARG	2.11	2.88	131.79	✓	✓	667 [Ng+]	4215 [O2]
7	156A	ARG	2.27	3.01	128.85	✓	✓	710 [Ng+]	4209 [O3]
8	179A	SER	3.44	4.00	119.02	✓	✓	934 [O3]	4207 [O3]
9	227A	GLU	1.78	2.70	154.63	✗	✓	4207 [O3]	1383 [O2]
10	246A	SER	3.18	3.70	115.41	✓	✓	1535 [O3]	4221 [Ng+]
11	246A	SER	2.76	3.70	155.92	✗	✓	4221 [Ng+]	1535 [O3]
12	274A	TYR	3.19	4.03	147.18	✓	✓	1813 [O3]	4220 [Ng+]
13	274A	TYR	3.53	4.03	112.82	✗	✓	4220 [Ng+]	1813 [O3]
14	292A	ARG	2.45	3.25	136.12	✓	✓	1974 [Ng+]	4201 [O.co2]
15	292A	ARG	2.40	3.22	137.09	✓	✓	1975 [Ng+]	4201 [O.co2]
16	294A	ASN	3.42	3.79	103.78	✓	✓	1998 [Nam]	4221 [Ng+]
17	371A	ARG	2.98	3.99	176.14	✓	✓	2693 [Ng+]	4201 [O.co2]
18	406A	TYR	2.64	3.01	103.57	✓	✓	3023 [O3]	4211 [O3]

Water Bridges —

Index	Residue	AA	Dist. A-W	Dist. D-W	Donor Angle	Water Angle	Protein donor?	Donor Atom	Acceptor Atom	Water Atom
1	152A	ARG	3.93	3.98	120.09	88.97	✓	666 [Ng+]	4215 [O2]	4171
2	224A	ARG	3.87	4.02	100.36	97.25	✓	1344 [Ng+]	4218 [Ng+]	3937
3	224A	ARG	3.26	4.02	100.36	71.17	✓	1344 [Ng+]	4213 [Nam]	3937
4	277A	GLU	2.62	2.96	106.47	75.63	✗	4213 [Nam]	1848 [O2]	3913

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	276A	GLU	3.77	✗	Guanidine	4218, 4220, 4221

Figura 40, Tabelle relative alle interazioni tra ligando e proteina generate da PLIP

Si può notare facilmente, dalle immagini precedenti, che a fronte di un quantitativo esiguo di interazioni elettrostatiche, si ha un grande numero di interazioni polari e legami a idrogeno, che dunque contribuiscono a rendere la molecola un efficace inibitore, almeno *in silico*.

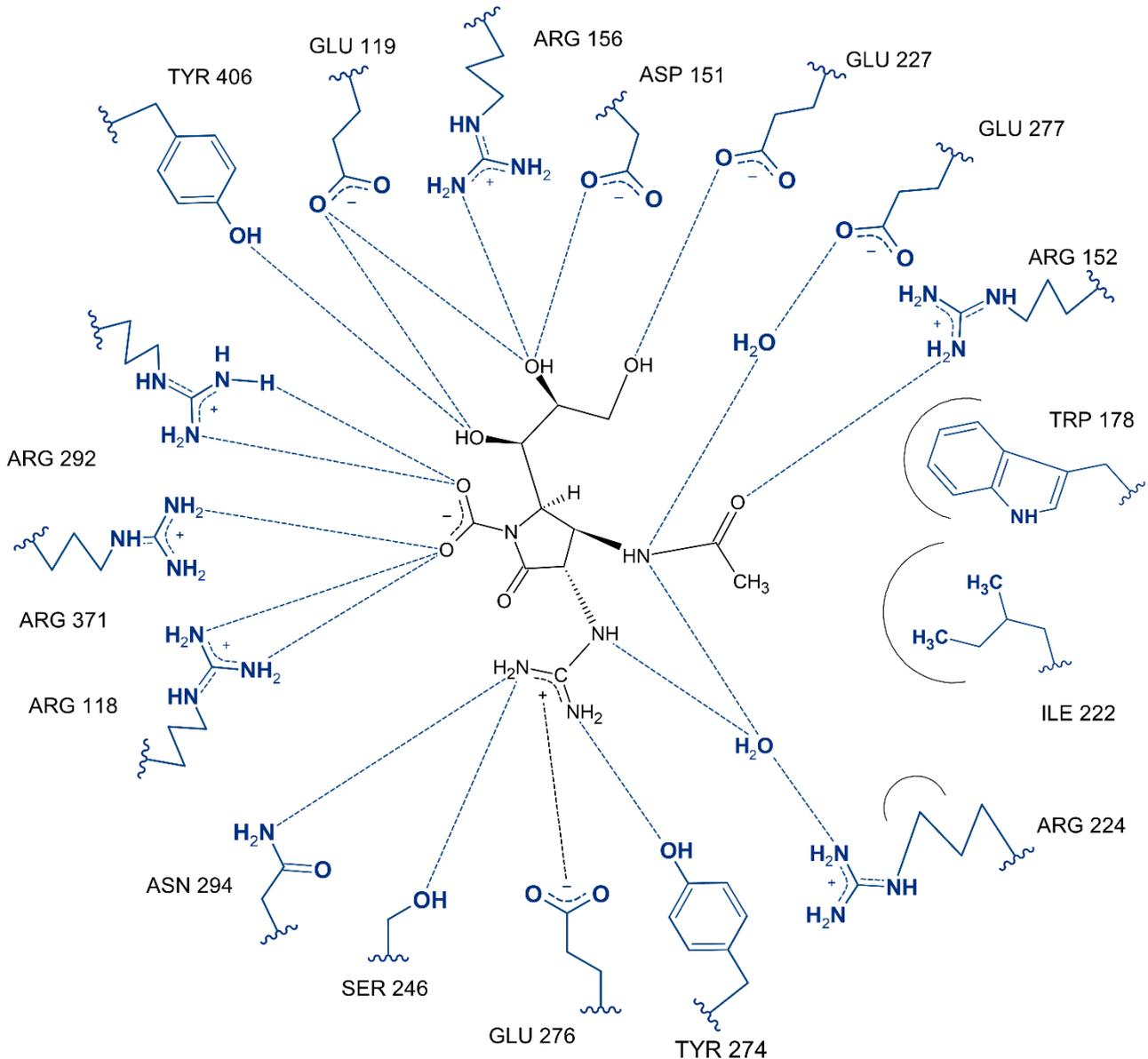


Figura 41, Mappa delle interazioni polari e ioniche tra sito di legame e Ipotesi_5C_pirrolidone.

La ridotta quantità di ponti salini è giustificata dalla natura più piccola dell'anello pirrolidinico rispetto a quello a sei termini di Neu5Ac, zanamivir e oseltamivir, che non permette al carbossilato di inserirsi al meglio nel cluster di ARG. Si hanno comunque legami a idrogeno con tali residui.

In particolare, anche se con legami relativamente più deboli, sono coinvolti molti residui quali SER 246 e TYR 274, che in altri complessi non sono impegnati.

L'interazione più forte, in termini di distanza tra donatore e accettore di legami H, è quella con GLU 227.

In Figura 41 si riposta lo schema riassuntivo delle interazioni proteina-ligando di questa seconda proposta farmaceutica.

A seguito di ulteriori analisi mediante il programma Chemscketch, si è previsto che il LogP dell'Ipotesi 5C_pirrolidone è pari a -6.29 ± 0.85 , dunque incompatibile con i requisiti minimi della regola di Lipinski.

Eseguendo diverse prove si è scoperto che la previsione di tal descrittore della lipofilia cala drasticamente rimuovendo due degli ossidrili nella catena laterale di glicerolo. Si sono dunque eseguiti ulteriori test, provando a modificare la struttura della catena e inserendo ramificazioni, fino all'ottenimento di un risultato soddisfacente nel docking del candidato finale.

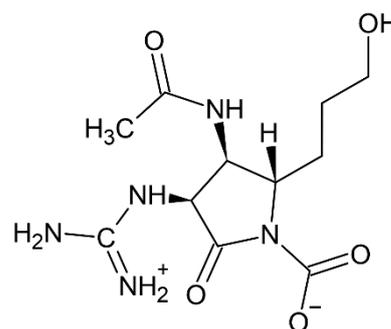


Figura 42, Struttura di pirrolivir

Il candidato in questione non è altro che un analogo di 5C_pirrolidone, presentante però i primi due ossidrili della catena laterale di glicerolo sostituiti con atomi di idrogeno.

Il miglior punteggio tra le Binding pose ottenute è pari a -9.5 Kcal/mol, paragonabile a zanamivir.

Il valore previsto di LogP è -4.85 ± 0.69 , comunque non abbastanza lipofilo per la regola di Lipinski, ma migliore del composto progenitore.

Il nome di questa proposta definitiva è Pirrolivir.

Si riportano di seguito i risultati di docking, il rendering 3D del sito attivo, le tabelle generate da PLIP e lo schema delle interazioni di non legame.

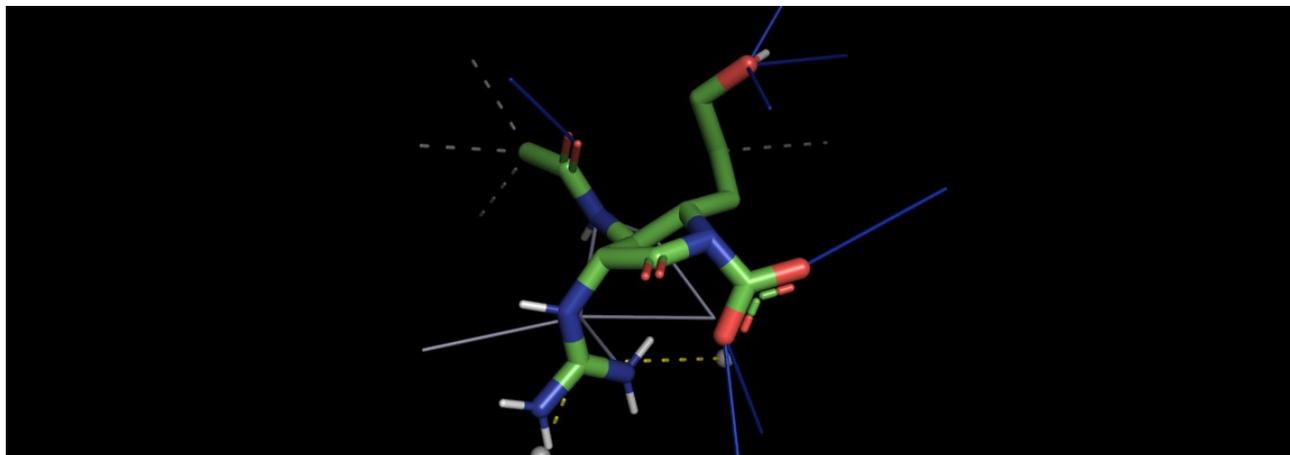


Figura 43, Rendering 3D della miglior posa di docking con le relative interazioni di non legame computate da PLIP

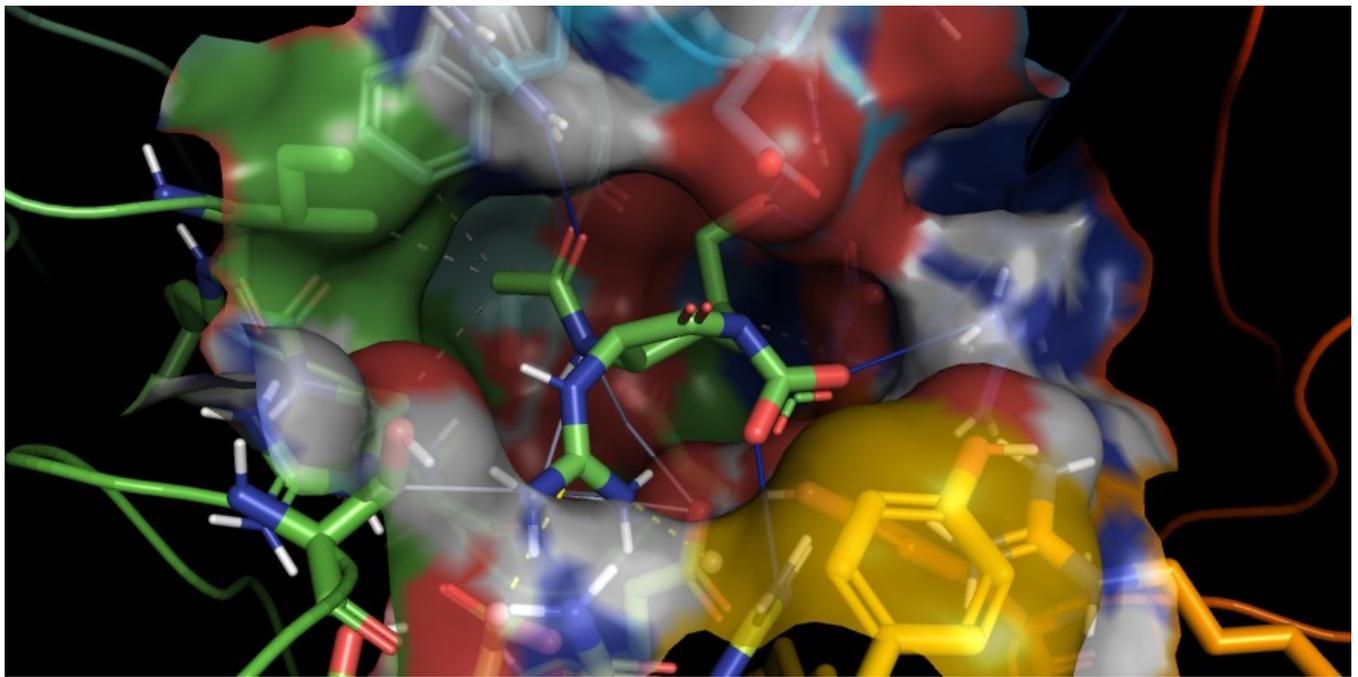


Figura 44, Rendering 3D con il ligando posto nella tasca del sito di legame.

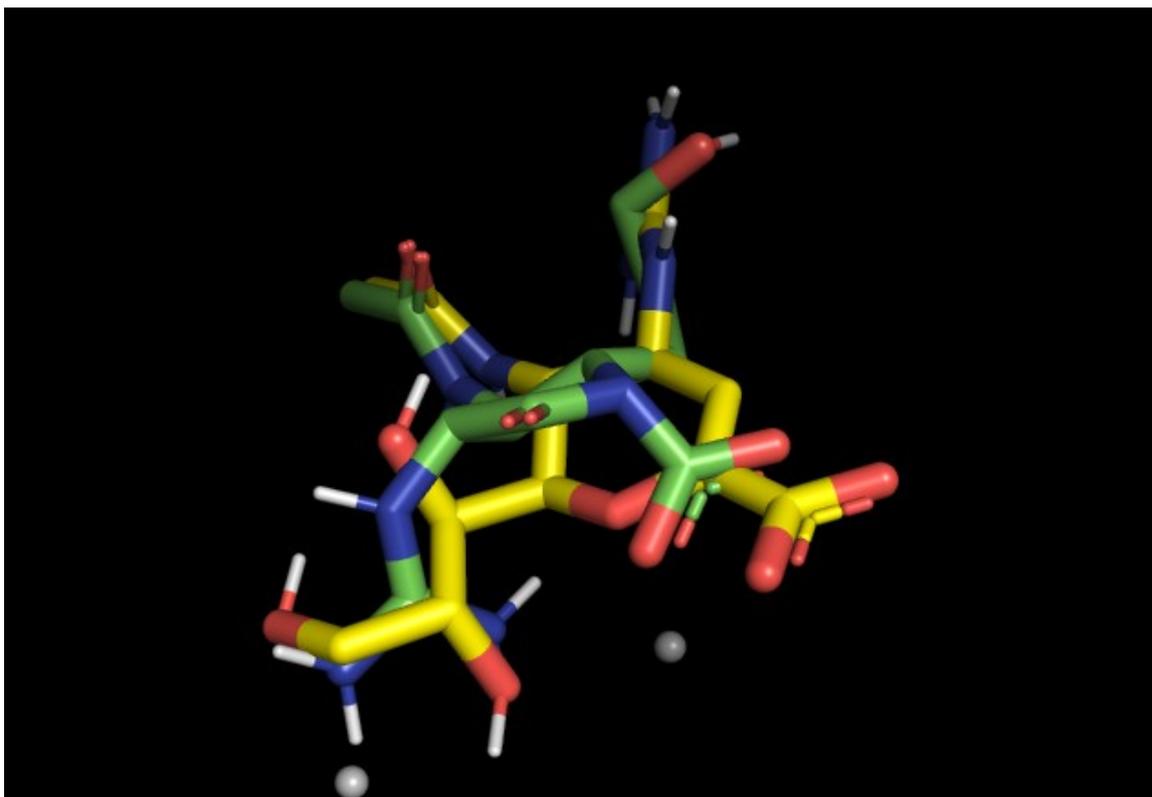


Figura 45, Rendering 3D delle conformazioni con miglior punteggio di pirrolivir (in verde) e zanamivir (in giallo). Si notino le parziali sovrapposizioni del sostituente N-acetile e dello ione carbossilato.

La caratteristica più rilevante per cui differiscono tra loro l'ipotesi 5C pirrolidone e Pirrolivir sta nella catena laterale alchilica di quest'ultimo, che è in grado di interagire con la porzione apolare del residuo GLU 119 e nell'assenza dei legami a idrogeno dati dai gruppi ossidrilici (che fanno scendere il punteggio della conformazione di due 3 decimali).

Hydrophobic Interactions

Index	Residue	AA	Distance	Ligand Atom	Protein Atom
1	119A	GLU	3.69	4220	346
2	178A	TRP	3.56	4217	925
3	222A	ILE	3.38	4217	1325
4	224A	ARG	3.56	4217	1341

Hydrogen Bonds —

Index	Residue	AA	Distance H-A	Distance D-A	Donor Angle	Protein donor?	Sidechain	Donor Atom	Acceptor Atom
1	118A	ARG	2.84	3.76	152.60	✓	✓	334 [Ng+]	4203 [O.co2]
2	119A	GLU	2.55	3.42	149.61	✗	✓	4222 [O3]	348 [O3]
3	151A	ASP	2.18	3.00	144.73	✓	✓	654 [O3]	4222 [O3]
4	152A	ARG	2.12	2.97	140.64	✓	✓	667 [Ng+]	4216 [O2]
5	156A	ARG	2.10	2.88	131.82	✓	✓	710 [Ng+]	4222 [O3]
6	292A	ARG	2.57	3.19	119.91	✓	✓	1974 [Ng+]	4202 [O.co2]
7	292A	ARG	2.61	3.22	119.36	✓	✓	1975 [Ng+]	4202 [O.co2]

Water Bridges —

Index	Residue	AA	Dist. A-W	Dist. D-W	Donor Angle	Water Angle	Protein donor?	Donor Atom	Acceptor Atom	Water Atom
1	224A	ARG	3.28	4.02	100.36	92.90	✓	1344 [Ng+]	4207 [Ng+]	3938
2	277A	GLU	2.62	2.81	107.07	71.90	✗	4214 [Nam]	1848 [O2]	3914
3	277A	GLU	3.42	3.19	146.79	92.88	✗	4214 [Nam]	1848 [O2]	3938

Salt Bridges

Index	Residue	AA	Distance	Protein positive?	Ligand Group	Ligand Atoms
1	276A	GLU	3.38	✗	Guanidine	4205, 4207, 4208
2	277A	GLU	5.24	✗	Guanidine	4205, 4207, 4208

Figura 46, Tabelle sull'interazione proteina-ligando tra Pirroliovir e N1 da 3CKZ

Con le due seguenti immagini, relative alla mappa delle interazioni di non legame e ad uno schema riassuntivo sul ciclo di replicazione virale di Influenza Virus A e B, si conclude la trattazione sulle sialidasi influenzali. Seguono Ringraziamenti e Bibliografia.

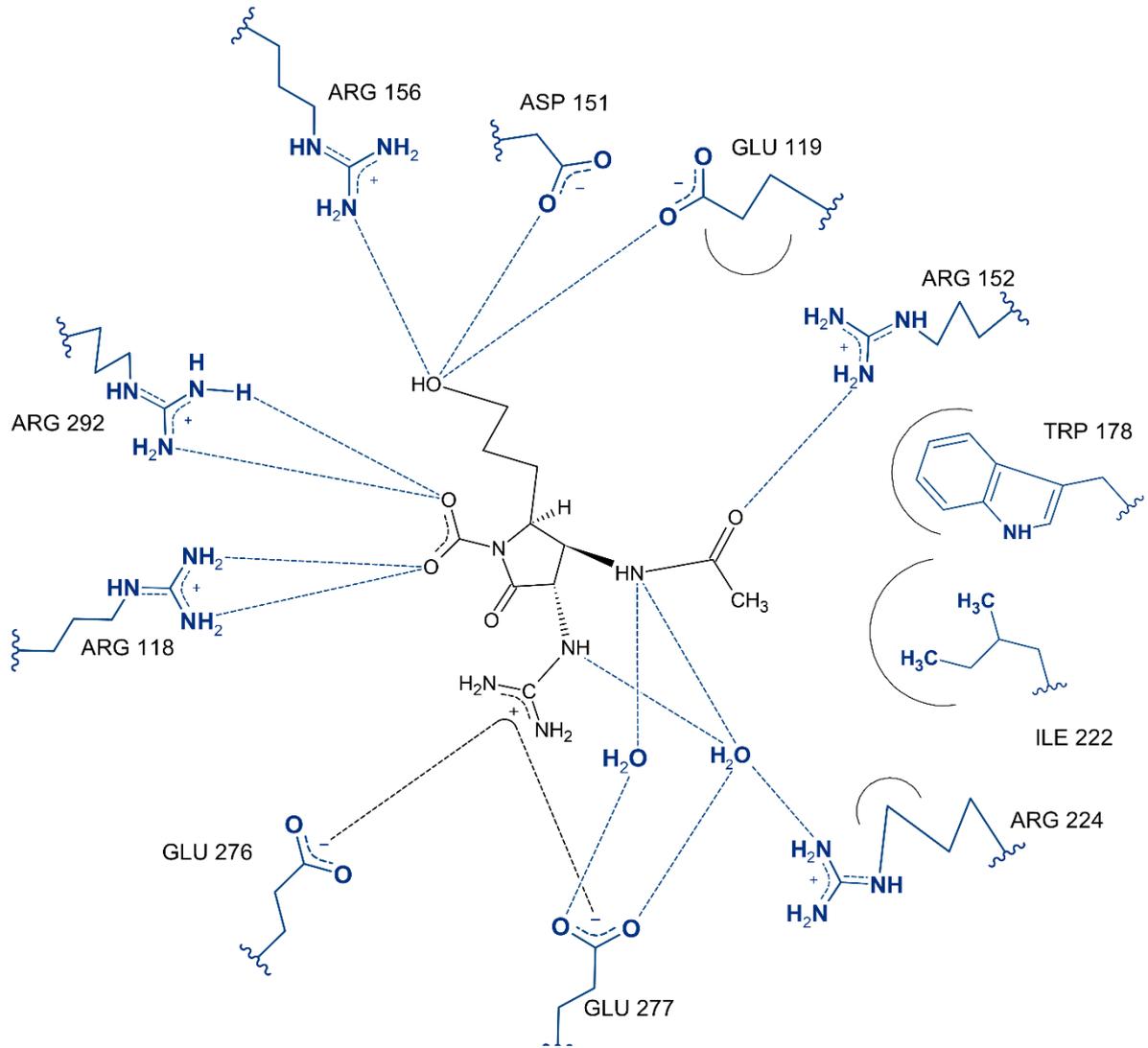


Figura 47, Mappa riassuntiva delle interazioni polari ed elettrostatiche tra Pirrolivir e sito di legame di N1 da 3CKZ.

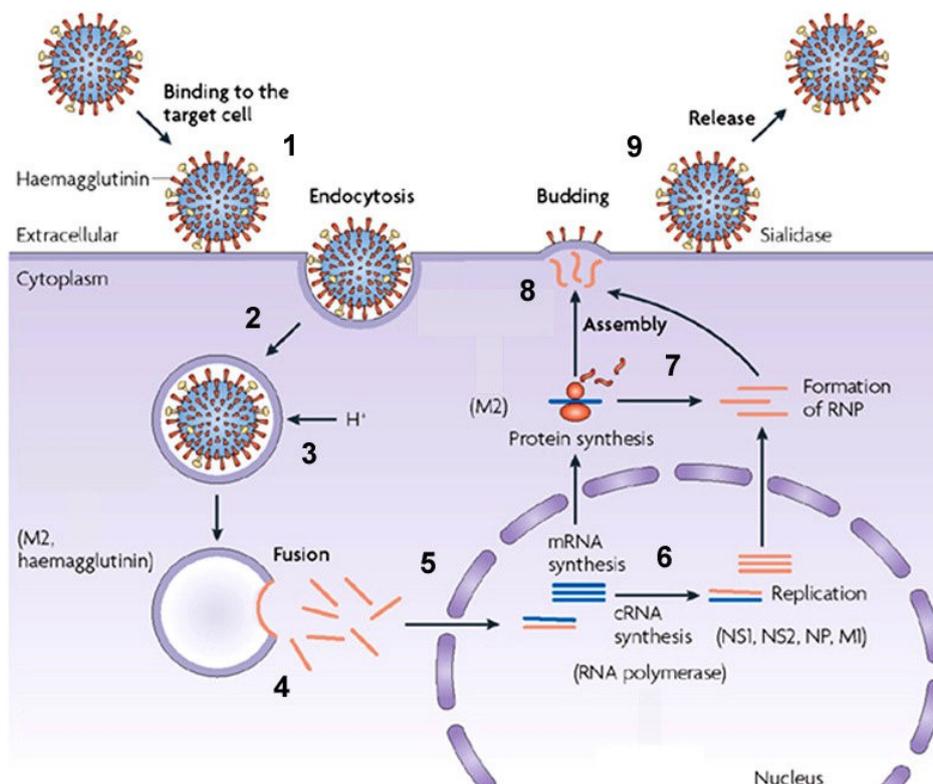


Figura 48, Meccanismo di replicazione di Influenzavirus A e B.

Ringraziamenti

Si ringraziano gentilmente due delle persone senza cui questo lavoro non sarebbe potuto esistere:

- Francesco Mugheddu, che mi ha indirizzato verso la corretta letteratura scientifica e ha fornito un grandissimo supporto alla comprensione dei complessi meccanismi del docking molecolare.
- Roman Laskowski, responsabile per la distribuzione del programma Ligplot+, che mi ha gentilmente dato l'accesso a questo strumento informatico pur non avendo una e-mail istituzionale.

Un ultimo grande ringraziamento va al lettore, per la sua cortese attenzione.

Bibliografia e sitografia

Atigadda, V. R., Brouillette, W. J., Duarte, F., Ali, S. M., Babu, Y. S., Bantia, S., Chand, P., et al. (1999). Potent Inhibition of Influenza Sialidase by a Benzoic Acid Containing a 2-Pyrrolidinone Substituent. *J. Med. Chem.*, 42(13), 2332–2343. Retrieved June 19, 2020, from [10.1021/jm980707k](https://doi.org/10.1021/jm980707k)

Babu, Y. S., Chand, P., Bantia, S., Kotian, P., Dehghani, A., El-Kattan, Y., Lin, T.-H., et al. (2000). BCX-1812 (RWJ-270201): Discovery of a Novel, Highly Potent, Orally Active, and Selective Influenza Neuraminidase Inhibitor through Structure-Based Drug Design. *J. Med. Chem.*, 43(19), 3482–3486. Retrieved June 19, 2020, from [10.1021/jm0002679](https://doi.org/10.1021/jm0002679)

Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank, 28(1), 235–242. Retrieved June 19, 2020, from [10.1093/nar/28.1.235](https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235)

Cabezas, J. A. (1991). Some questions and suggestions on the type references of the official nomenclature (IUB) for sialidase(s) and endosialidase, 278(1), 311–312. Retrieved June 19, 2020, from [10.1042/bj2780311](https://doi.org/10.1042/bj2780311)

Collins, P. J., Haire, L. F., Lin, Y. P., Liu, J., Russell, R. J., Walker, P. A., Skehel, J. J., et al. (2008). Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature*, 453(7199), 1258–1261. Retrieved June 19, 2020, from [10.1038/nature06956](https://doi.org/10.1038/nature06956)

Davies, B. E. (2010). Pharmacokinetics of oseltamivir: an oral antiviral for the treatment and prophylaxis of influenza in diverse populations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(Supplement 2), ii5–ii10. Retrieved June 19, 2020, from [10.1093/jac/dkq015](https://doi.org/10.1093/jac/dkq015)

Djoumbou-Feunang, Y., Fiamoncini, J., Gil-de-la-Fuente, A., Greiner, R., Manach, C., & Wishart, D. S. (2019). BioTransformer: a comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. *J Cheminform*, 11(1). Retrieved June 19, 2020, from [10.1186/s13321-018-0324-5](https://doi.org/10.1186/s13321-018-0324-5)

von Itzstein, M. (2007). The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 6(12), 967–974. Retrieved June 19, 2020, from [10.1038/nrd2400](https://doi.org/10.1038/nrd2400)

Janakiraman, M. N., White, C. L., Laver, W. G., Air, G. M., & Luo, M. (1994). Structure of Influenza Virus Neuraminidase B/Lee/40 Complexed with Sialic Acid and a Dehydro Analog at

1.8-ANG. Resolution: Implications for the Catalytic Mechanism. *Biochemistry*, 33(27), 8172–8179. Retrieved June 19, 2020, from [10.1021/bi00193a002](https://doi.org/10.1021/bi00193a002)

McAuley, J. L., Gilbertson, B. P., Trifkovic, S., Brown, L. E., & McKimm-Breschkin, J. L. (n.d.). Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front. Microbiol.*, 10. Retrieved June 19, 2020, from [10.3389/fmicb.2019.00039](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00039)

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (n.d.). *I principi di biochimica di Lehninger* (7th ed., pp. 210–212). Bologna: Zanichelli Editore.

Protein, R. (n.d.). RCSB PDB: Homepage. Retrieved June 19, 2020, from <https://www.rcsb.org/>

Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F., & Schroeder, M. (2015). PLIP: fully automated protein–ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res*, 43(W1), W443–W447. Retrieved June 19, 2020, from [10.1093/nar/gkv315](https://doi.org/10.1093/nar/gkv315)

Taylor, N. R., & von Itzstein, M. (1994). Molecular Modeling Studies on Ligand Binding to Sialidase from Influenza Virus and the Mechanism of Catalysis. *J. Med. Chem.*, 37(5), 616–624. Retrieved June 19, 2020, from [10.1021/jm00031a011](https://doi.org/10.1021/jm00031a011)

Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.*, NA-NA. Retrieved June 18, 2020, from [10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334)

Vavricka, C. J., Liu, Y., Kiyota, H., Sriwilaijaroen, N., Qi, J., Tanaka, K., Wu, Y., et al. (2013). Influenza neuraminidase operates via a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors. *Nat Commun*, 4(1). Retrieved June 19, 2020, from [10.1038/ncomms2487](https://doi.org/10.1038/ncomms2487)

(n.d.). Pubchem. Retrieved June 19, 2020a, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

(n.d.). DrugBank. Retrieved June 19, 2020b, from <https://www.drugbank.ca/>

(n.d.) PianetaChimica, Retrieved June 19, 2020b, from <https://www.pianetachimica.it/>

Indice

1. Introduzione
2. I substrati delle sialidasi: derivati dell'acido neuraminico
3. L'idrolisi dei glicosidi di acidi sialici: la famiglia delle neuraminidasi.
 - 3.1. Localizzazione dell'enzima
 - 3.2. Struttura delle eso- α -sialidasi virali
4. Idrolisi di sialosidi terminali: proposte più accreditate di meccanismi di reazione
5. Inibitori enzimatici delle sialidasi: retrospettive e future applicazioni
 - 5.1. Inibitori per analogia di struttura: un esempio di progettazione razionale di farmaci
 - 5.1.1. Zanamivir
 - 5.1.2. Oseltamivir
 - 5.1.3. Peramivir
 - 5.2. Inibitori covalenti del meccanismo nucleofilo: fluoroderivati di Neu5Ac e nuove prospettive
6. Docking molecolare: un approccio informatico al Rational Drug Design
 - 6.1. La scelta delle strutture cristallografiche
 - 6.1.1. 3CKZ
 - 6.1.2. 3CL0
 - 6.2. Protocolli di docking standard per Autodock Vina
 - 6.2.1. Preparazione della macromolecola
 - 6.2.2. Preparazione standard dei ligandi
 - 6.2.3. Allestimento del file di griglia
 - 6.3. Protocolli modificati per l'impiego di Chimera
 - 6.4. Proposta di validazione: re-docking e comparazione tra output e cristallografia
 - 6.4.1. Risultati della validazione di zanamivir in 3CKZ
7. Risultati di Docking e valutazione delle interazioni recettore-ligando
 - 7.1. Acido Sialico (Neu5Ac)
 - 7.2. Zanamivir
 - 7.3. Oseltamivir carbossilato
 - 7.4. Peramivir
 - 7.5. Proposte personali di farmaco: Ipotesi pirrolidone e sviluppo di Pirrolivir
 - 7.5.1. Ipotesi Zanamivir (R)-idrossipirrolidone.
 - 7.5.2. Dall'ipotesi 5C_pirrolidone al candidato Pirrolivir.
8. Ringraziamenti
9. Bibliografia e sitografia