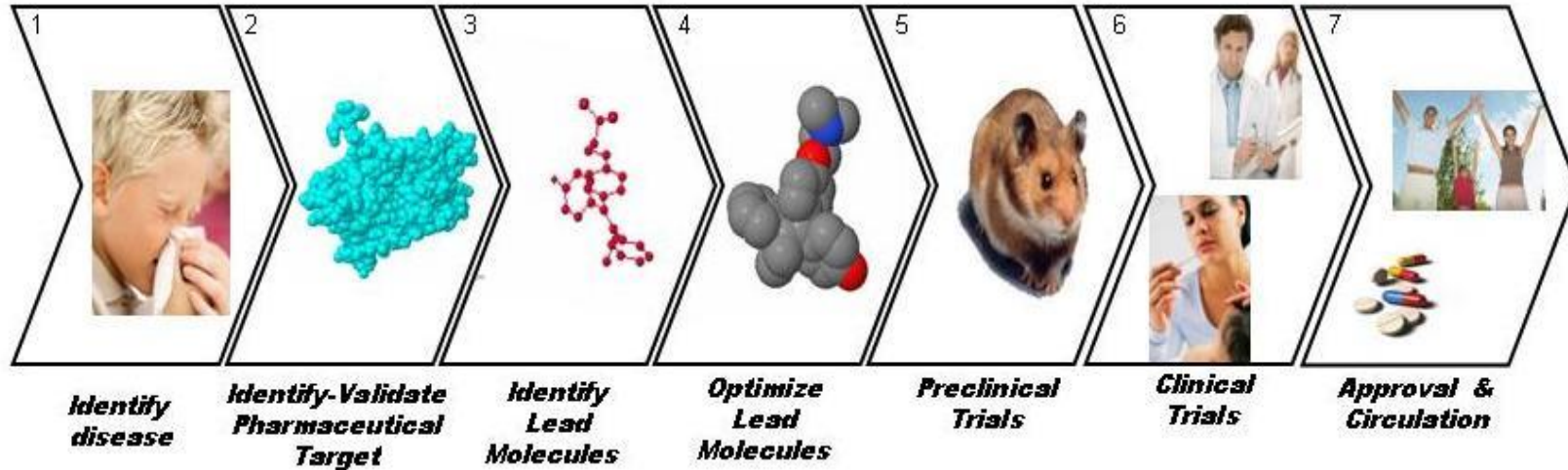


Cristallografia di raggi-X e *Drug Discovery*

Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche
Curriculum Nanobiotecnologie

A.A. 2020-21

Drug Discovery



- Definizione dell'obiettivo (Malattia)
 - Identificazione e validazione del Target (enzima, recettore, DNA...)
 - Identificazione di una molecola farmacologicamente promettente (Lead)
 - Ottimizzazione del Lead in una molecola farmacologicamente attiva
 - Fase Pre-clinica (test su animali)
 - Fase Clinica
 - Approvazione e immissione sul mercato
-

Drug Discovery: Tempi e Costi

Il processo che porta ad un nuovo farmaco è:

- Temporalmente lungo (diversi anni)
- Economicamente impegnativo (i modelli economici variano, tra i 300 e i 2000 milioni di \$)

The Drug Development Process: It's Long, Expensive and Risky

	Target to Hit	Hit to Lead	Lead Optim	Non-Clinical	Phase 1	Phase 2	Phase 3	Sub to Launch
# per Launch	24.3	19.4	14.6	12.4	8.6	4.6	1.6	1.1
P(TS)	80%	75%	85%	69%	54%	34%	70%	91%
Cycle time (yrs)	1.0	1.5	2.0	1.0	1.5	2.5	2.5	1.5
Cost/launch (\$mil)	\$94	\$166	\$414	\$150	\$273	\$319	\$314	\$48
P(TS)AD ¹					28%	8%	1.8%	100%

Adapted from: SM Paul et al. Nature Reviews: Drug Discovery, 2010.

Costs are capitalized based on 11% cost of capital and in 2010 dollars.

¹Adapted from: JA Cummings et al. Alz Res & Therapy, 2014.

Strategie per l'Identificazione dei Lead

Qualsiasi sia il protocollo seguito, devono essere definiti uno o più saggi (assays) che permettano di valutare la risposta del target all'azione dei diversi composti chimici.

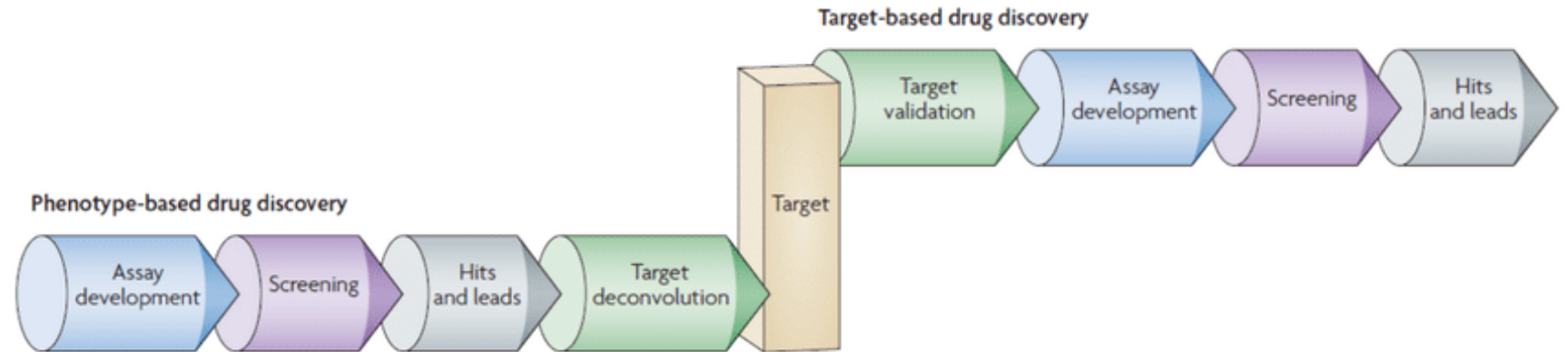


Figure 1 | Phenotype-based versus target-based drug discovery. The diagram illustrates the early phase of drug discovery, in which the aim is to identify target and lead molecules. In the phenotype-based approach, lead molecules are obtained first, followed by target deconvolution to

identify the molecular targets that underlie the observed phenotypic effects. In the target-based approach, molecular targets are identified and validated before lead discovery starts; assays and screens are then used to find a lead.

Target: Il bersaglio identificato che sarà soggetto all'azione del farmaco (recettore, enzima, DNA...).

Hit: un composto chimico, potenzialmente modificabile, che dimostra attività nei confronti di un target.

Lead: Un Hit che possiede caratteristiche chimico-fisiche tali da renderlo potenzialmente ottimizzabile in farmaco.

Approcci all'Identificazione degli Hits

Esistono due approcci fondamentalmente diversi:

'Random': si provano centinaia di migliaia (a volte milioni) di composti chimicamente diversi e si valuta quale di questi fornisce risposte positive nei saggi specifici di attività (assays) . **Non richiede necessariamente una conoscenza specifica del Target.**

'Razionale': **A partire dalle proprietà chimico-fisiche del Target** è possibile disegnare **razionalmente** una libreria di composti chimici che saranno quindi sottoposti a saggi specifici. In tal modo si riducono sia i tempi che i costi (almeno in linea di principio).

In generale richiede la conoscenza della struttura del Target, o per via sperimentale (NMR, X-ray, Cryo-EM) o per mezzo di Modelling (a partire comunque da una struttura nota sperimentalmente).

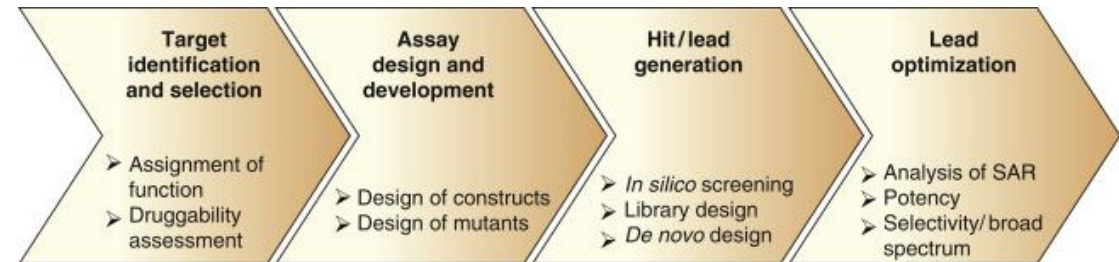
Quando l'identificazione degli Hits si basa sulla conoscenza della struttura molecolare del Target come anche il passaggio a Lead e quindi farmaco procede attraverso l'ottimizzazione razionale della interazione Target/Hit, **su base strutturale**, parliamo di **Structure Based Drug Discovery (SBDD)**.

Structure Based Drug Discovery

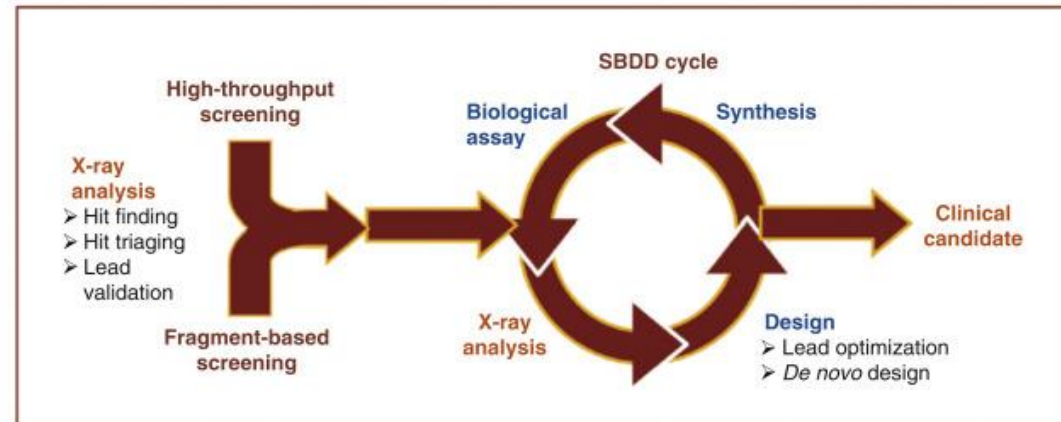
La cristallografia di raggi-X non è l'unico metodo utilizzabile per il SBDD (es: NMR e Cryo-EM), tuttavia è stato ed è ancora quello più utilizzato.

La cristallografia di raggi-X interviene a diversi livelli:

- Funzione del Target
- Druggability
- Individuazione di possibili Hit/Lid
- Validazione dei Lead
- Ottimizzazione dei Lead



(a)



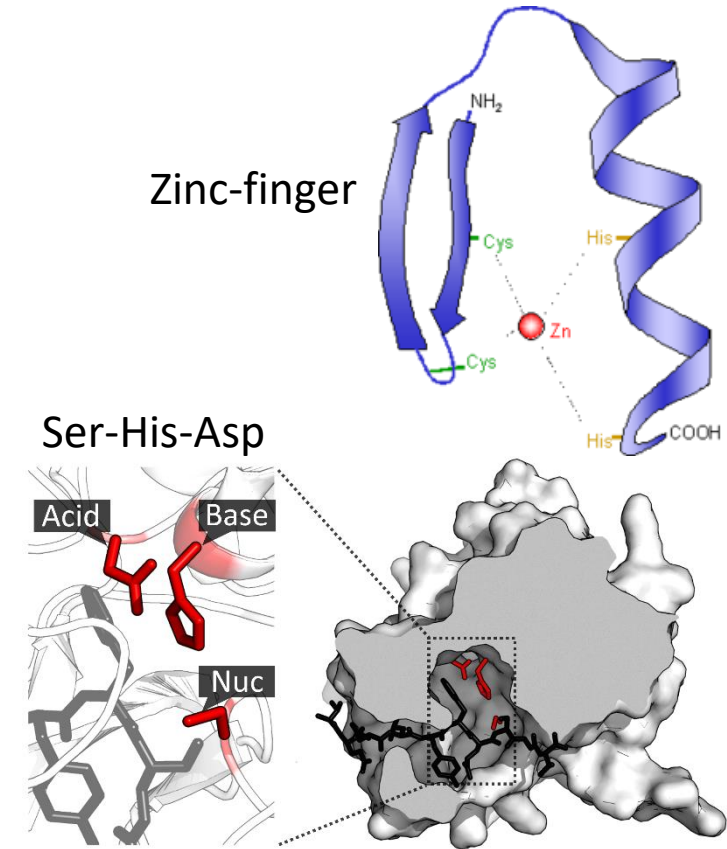
(b)

Target: funzione

L'individuazione del Target e della sua **funzione biologica** è fondamentale nel processo del Drug Discovery. Anche se non abbiamo a che fare con una progettazione razionale e guidata dalla struttura molecolare del Target, conoscere la funzione biologica del Target è indispensabile.

A partire dalla struttura tridimensionale di una proteina è possibile generare delle ipotesi sulla sua funzione chimica e biologica, specialmente se in presenza di una bassa omologia di sequenza.

- **Folding:** omologia strutturale con proteine di funzione nota
- Esistenza di **motivi strutturali** specifici di una certa classe di proteine: Zinc-finger (presente in proteine che interagiscono con gli acidi nucleici)
- **Siti specifici strutturalmente organizzati**, caratteristici di una classe funzionale di proteine: la triade catalitica Ser-His-Asp delle proteasi a serina (come la Trombina)



Target: 'Druggability' (ligandability)

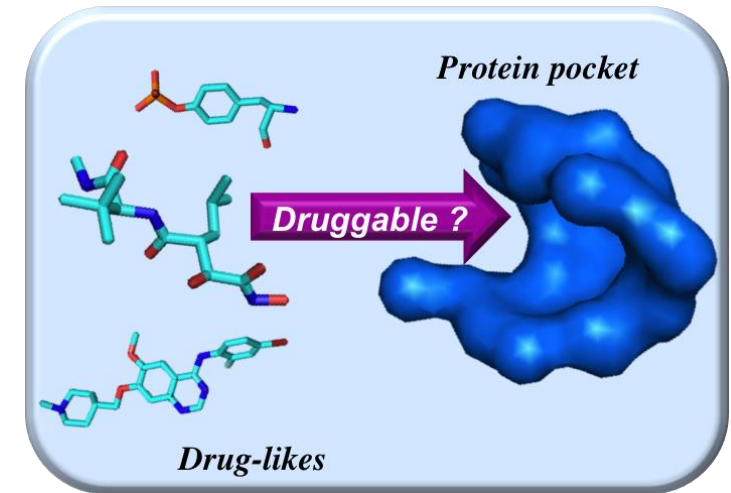
Al fine di poter sviluppare dei farmaci contro un certo Target è importante verificare se è possibile preparare piccole molecole (con MW < 500 Da) in grado di interagire con il Target stesso. In sostanza questo si traduce nel capire **se esistono sul Target delle 'zone' importanti per la sua funzione biologica, che possono essere siti di interazione/legame (binding) per molecole di massa molecolare (MW) contenuta.**

Tuttavia, affinché una molecola (piccola) sia poi potenzialmente usabile come farmaco assumibile per via orale, è stata proposta da Lipinski la cosiddetta 'regola dei cinque' (**rule of five**) da cui:

- Peso Molecolare ≤ 500 Da
- Un numero di donatori di legami idrogeno ≤ 5
- Un numero di accettori di legami idrogeno ≤ 10
- Un coefficiente di partizione ottanolo/acqua tale che $CLogP^* \leq 5$

La conoscenza della struttura del Target permette di ipotizzare quali classi di composti chimici possono soddisfare questi requisiti.

**LogP calcolato, coefficiente di partizione molare di un composto chimico, tra ottanolo e acqua*

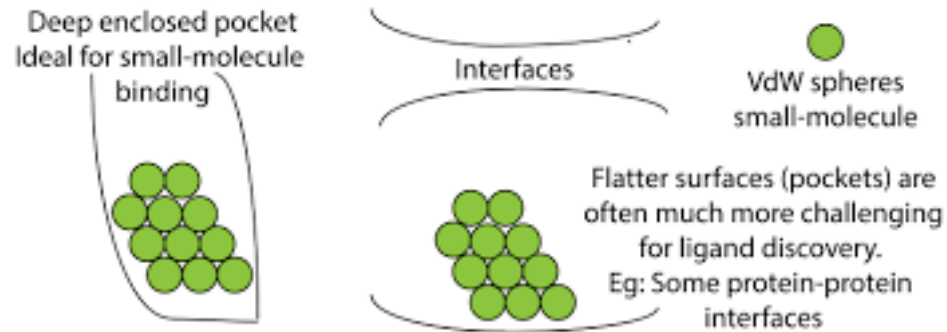


$$P = \frac{[\text{composto}]^{\text{ottanolo}}}{[\text{composto}]^{\text{acqua}}}$$

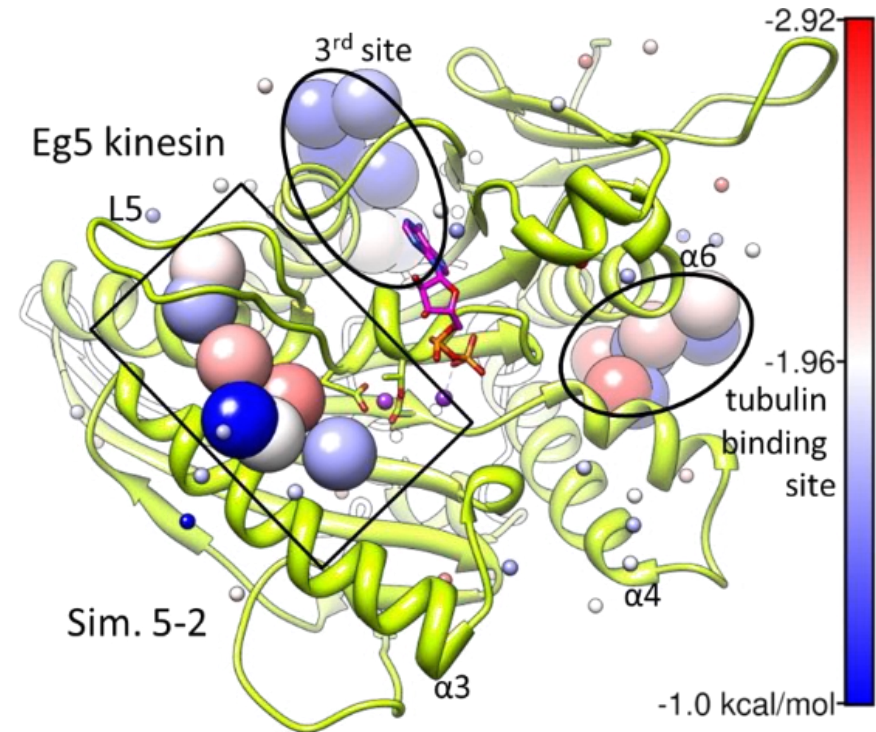
Target: Druggability

In generale, **gli enzimi possiedono spesso degli eccellenti siti di binding** (siti catalitici, siti dei cofattori), come anche i recettori di piccole molecole.

Le **zone di interazione proteina-proteina** sono invece relativamente piatte ed è più complicato trovare **molecole (piccole)** capaci di interagire con essi.



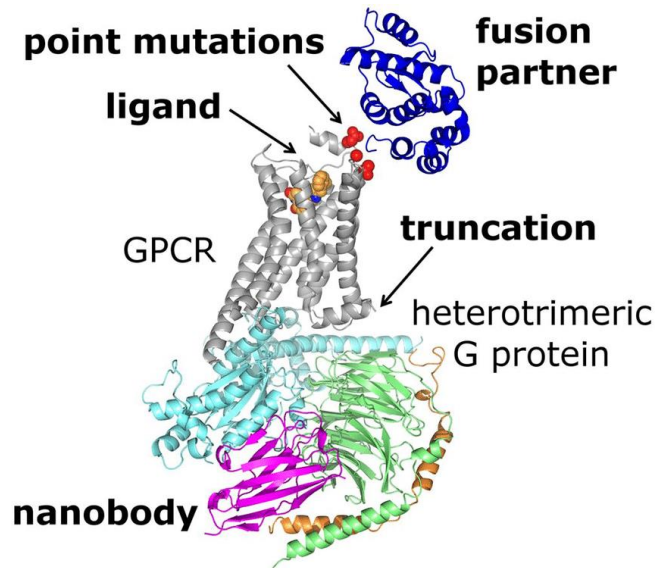
L'esistenza di potenziali siti di binding è effettuata con software dedicati, tuttavia è **essenziale avere a disposizione la struttura molecolare accurata del Target**.



Hits/Lead: identificazione

La conoscenza della struttura tridimensionale del Target e la conseguente conoscenza della sua funzione biologica (es: proteasi a serina, kinasi etc...) permette in primo luogo un approccio razionale alla ricerca di eventuali Hits.

Se, a partire dalla struttura cristallografica è nota l'omologia funzionale e strutturale con un'altra macromolecola già nota, si possono considerare eventuali ligandi noti da quest'ultima, come punto di partenza per la ricerca di Hits.



In alcuni casi, si può ricorrere alla struttura tridimensionale di proteine omologhe o modellate a partire da queste.

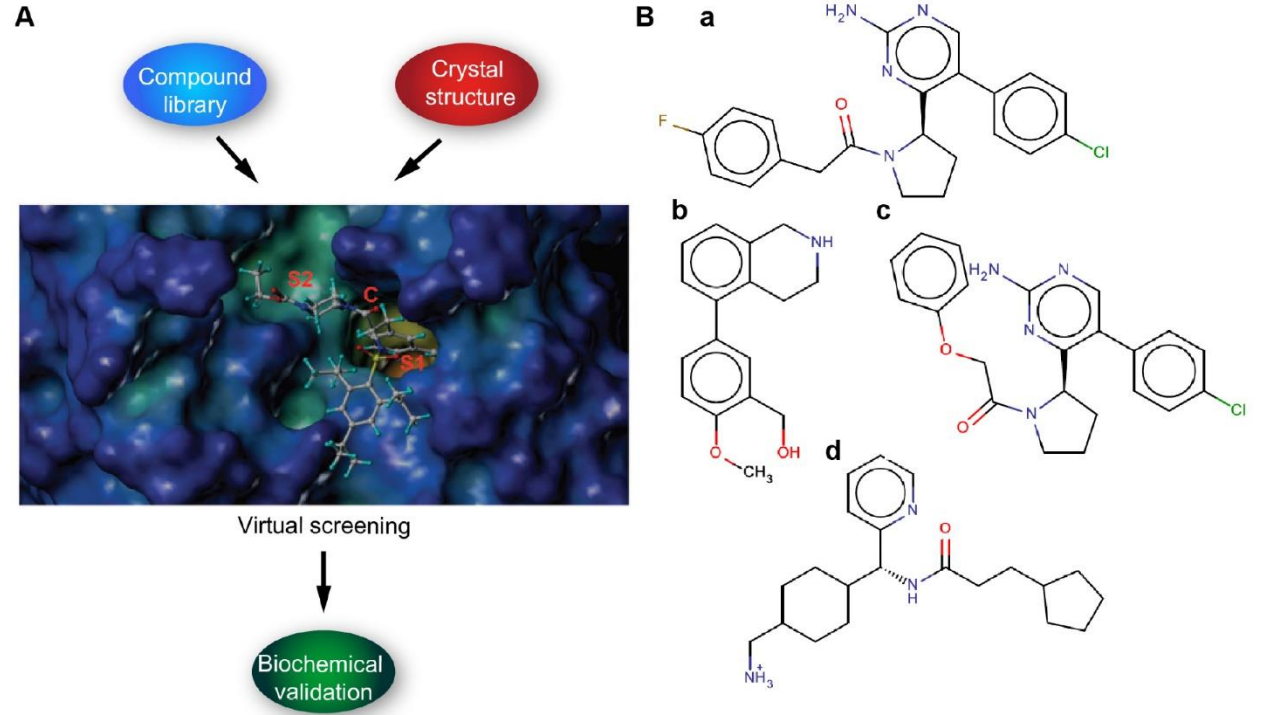
Le G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) costituiscono una importante classe di recettori di membrana, Target farmacologici per diverse patologie. Fino alla determinazione cristallografica di un mutante/chimera del β_2 -Adrenergic Receptor, venivano utilizzati modelli molecolari costruiti per homology modelling a partire dalla struttura cristallina della rodopsina

Hits/Lead: Structure-Based Virtual Screening

La struttura del Target può anche essere utilmente utilizzata per procedure *in silico* come lo **Structure Based Virtual Screening**. Migliaia di composti facenti parte di una libreria predefinita, sono sottoposti sequenzialmente a procedura di Docking (*in silico*).

Quanto più la struttura del Target è accurata, tanto più il risultato del Docking sarà attendibile.

Nel caso di Target dotati di variabilità conformazionale, la procedura *in silico* può richiedere più strutture cristallografiche rappresentative delle diverse conformazioni.

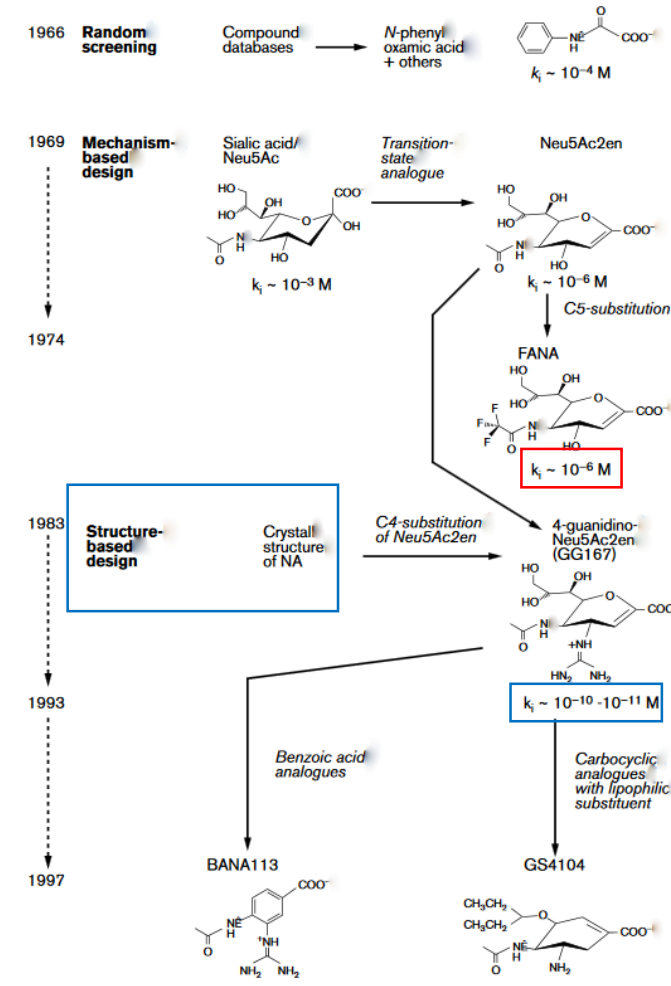
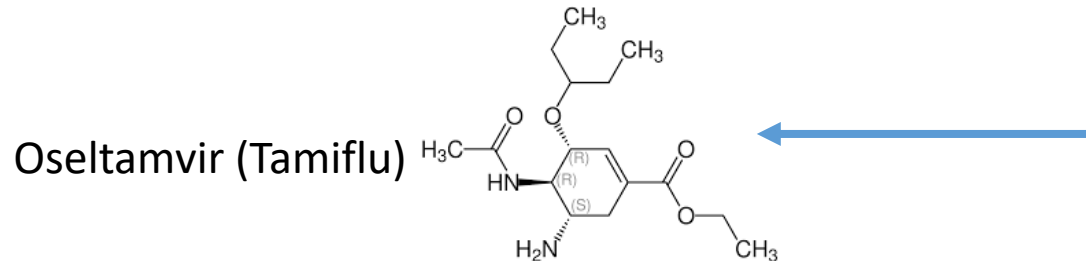


Hit/Lead: Esempio (Tamiflu)

Ricerca di un farmaco antivirale inibitore della *neuraminidasi virale*.

Strategie basate sul Random screening o sulla ricerca di analoghi dello stato di transizione non hanno dati risultati soddisfacenti.

La determinazione cristallografica della neuraminidasi e il conseguente sviluppo razionale di Hits basati sulla struttura cristallografica ha permesso di sviluppare inibitori molto più potenti.

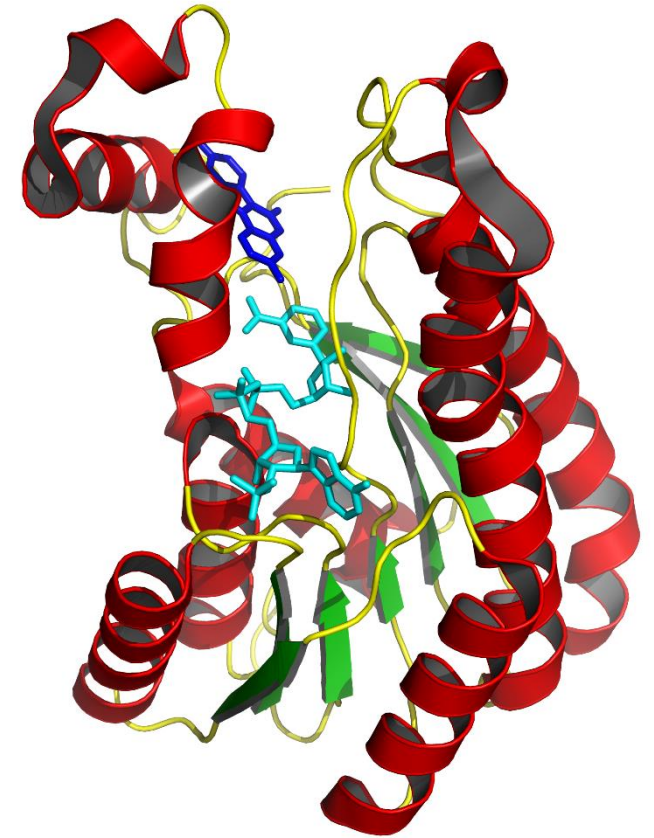


Hits/Lead: Validazione

Indipendentemente dall'approccio seguito, **l'analisi cristallografica è sicuramente uno dei metodi più sicuri ed accurati per validare l'azione di un Ligando/Hit nei confronti di un Target.**

La struttura cristallografica di un complesso Target/Hit, permette:

- Di confermare o meno le modalità di interazione tra Target e Hit
- Di verificare la presenza di ulteriori siti di binding sul Target
- Di verificare la presenza di eventuali siti, non ancora coinvolti nell'interazione, potenzialmente utili al miglioramento dell'interazione Target/Hit
- Di verificare la presenza di gruppi interferenti sull'Hit
- Di verificare eventuali variazioni conformazionali sul Target
- Di verificare eventuali conformazioni preferite del Hit
- Di considerare il coinvolgimento di altri fattori (molecole di H₂O...)



Ottimizzazione dei Lead

La conoscenza della struttura molecolare del Target e dei determinanti strutturali coinvolti nell'interazione con i vari Hits, come determinato dalle analisi delle diverse strutture cristallografiche Target/Hit, sono alla base delle **Structure Activity Relationship**, usate per il miglioramento dell'efficacia dei Leads. Eventuali miglioramenti nell'efficacia del Lead possono essere nuovamente investigati per via cristallografica come nuovi complessi Target/Lead.

Un aspetto in cui la conoscenza delle modalità di interazione dei Lead è sicuramente quello delle proprietà ADME, ovvero delle proprietà farmacologiche/farmacodinamiche del potenziale farmaco (**A**ssorbimento, **D**iffusione, **M**etabolismo, **E**liminazione). **Proprietà come la lipofilicità del Lead o il numero di legami idrogeno possibili, possono essere opportunamente ottimizzate una volta note sperimentalmente le modalità di interazione tra Target e Lead/Farmaco.**

Infine, anche nel miglioramento delle proprietà **T**ossicologiche del farmaco, la conoscenza delle modalità di interazione tra proteina e farmaco può essere di grande aiuto.

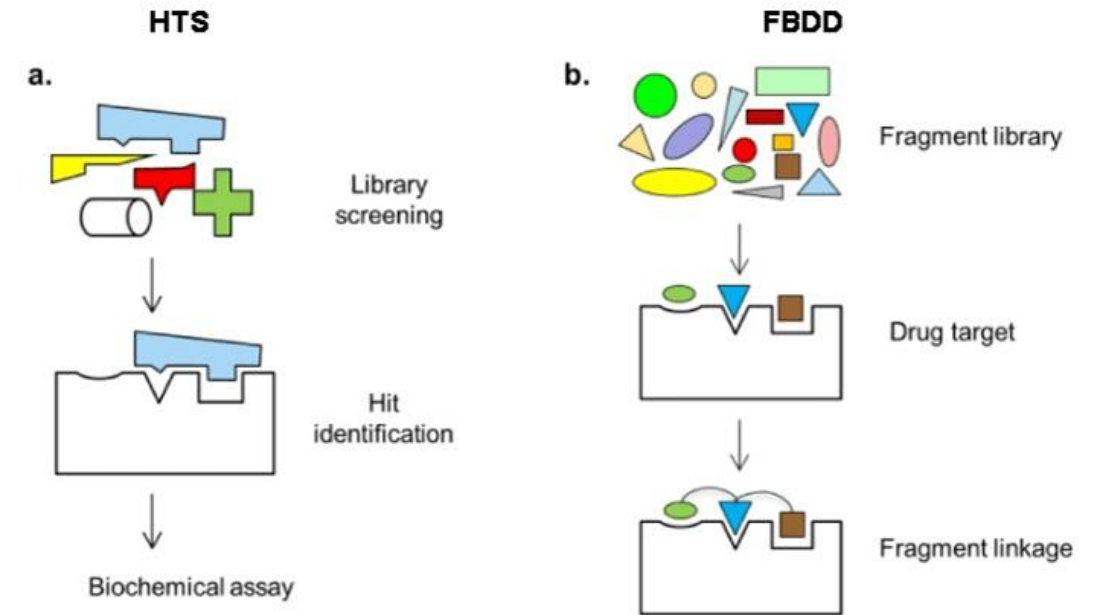
Fragment Based Drug Discovery

L'approccio usato in modo quasi esclusivo fino agli inizi del nuovo millennio era quello *dell'High Throughput Screening (HTS)*, dove centinaia di migliaia di composti venivano utilizzati in test biochimici per provarne l'efficacia come potenziali Leads.

L'idea alla base dell'HTS è quella di esplorare in modo esaustivo lo 'spazio chimico' per trovare, in modo casuale, molecole molto vicine al farmaco finale.

Tuttavia, *anche una libreria di milioni di composti esplora solo una parte trascurabile dello spazio chimico dei composti possibili* ($\sim 1.5 \times 10^{11}$ per molecole non più grandi di 17 atomi non-H!).

Inoltre, una molecola che può essere potenzialmente un ligando perfetto, può avere una bassa affinità per il Target a causa di un singolo gruppo interferente.



L'idea alla base del *Fragment Based Drug Discovery (FBDD)* è quella di usare frammenti più piccoli, che saranno successivamente elaborati in molecole di dimensioni maggiori.

Fragment Based Drug Discovery

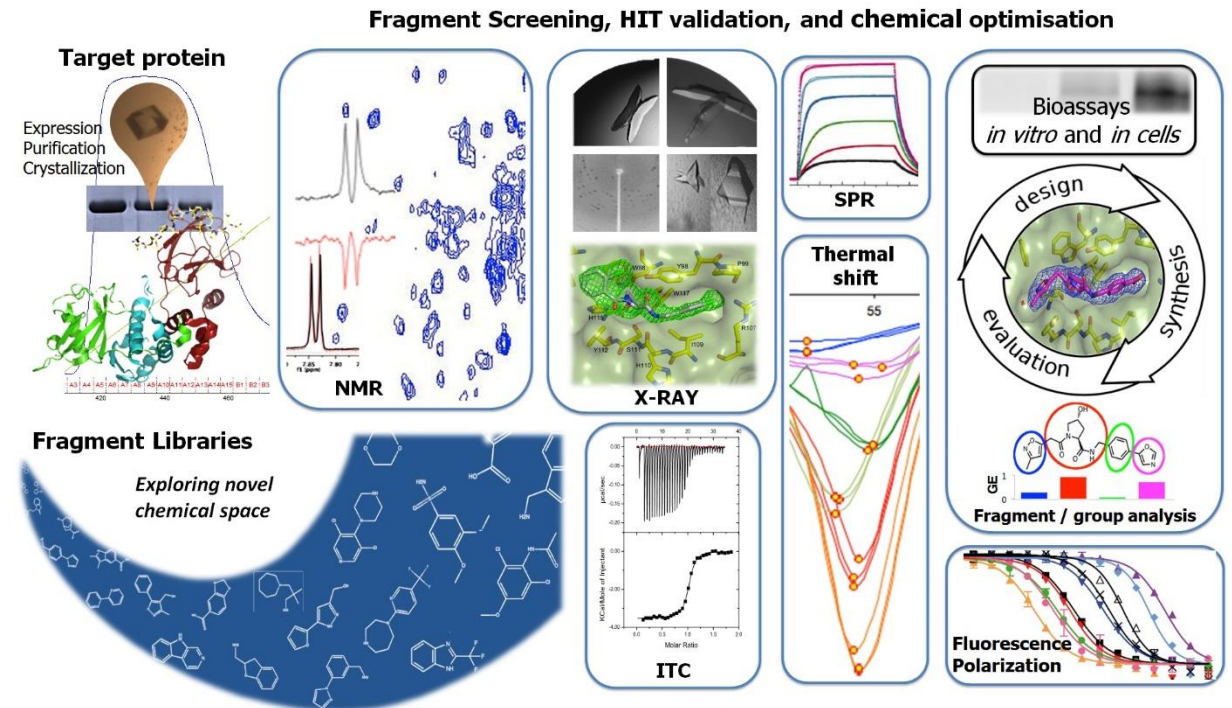
L'utilizzo di frammenti più piccoli riduce le dimensioni delle librerie di composti.

Nel FBDD le librerie sono di poche migliaia di composti chimici di piccole dimensioni (non eccedono i 300 Da).

E' molto importante la costruzione delle librerie di composti (deve essere rappresentativa di varie classi di ligandi), talvolta sono costruite *ad hoc* per il Target in esame.

Il protocollo classico del FBDD prevede:

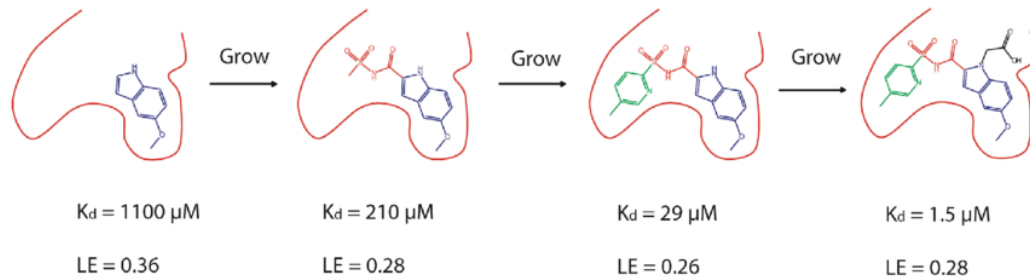
- Purificazione e Espressione del Target
- Screening in-vitro (es: DSF / SPR)
- **Determinazione struttura** (X-ray/NMR)
- Test funzionali in-vivo



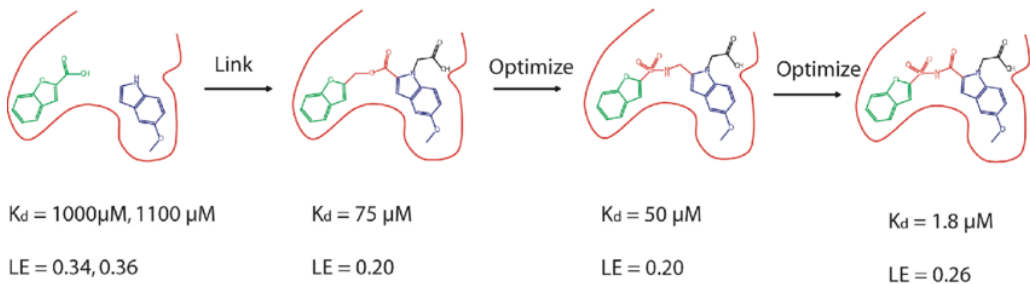
Fragment Based Drug Discovery

I frammenti identificati possono essere sviluppati in veri e propri Leads, usando una chimica opportuna ed evitando la presenza di gruppi interferenti.

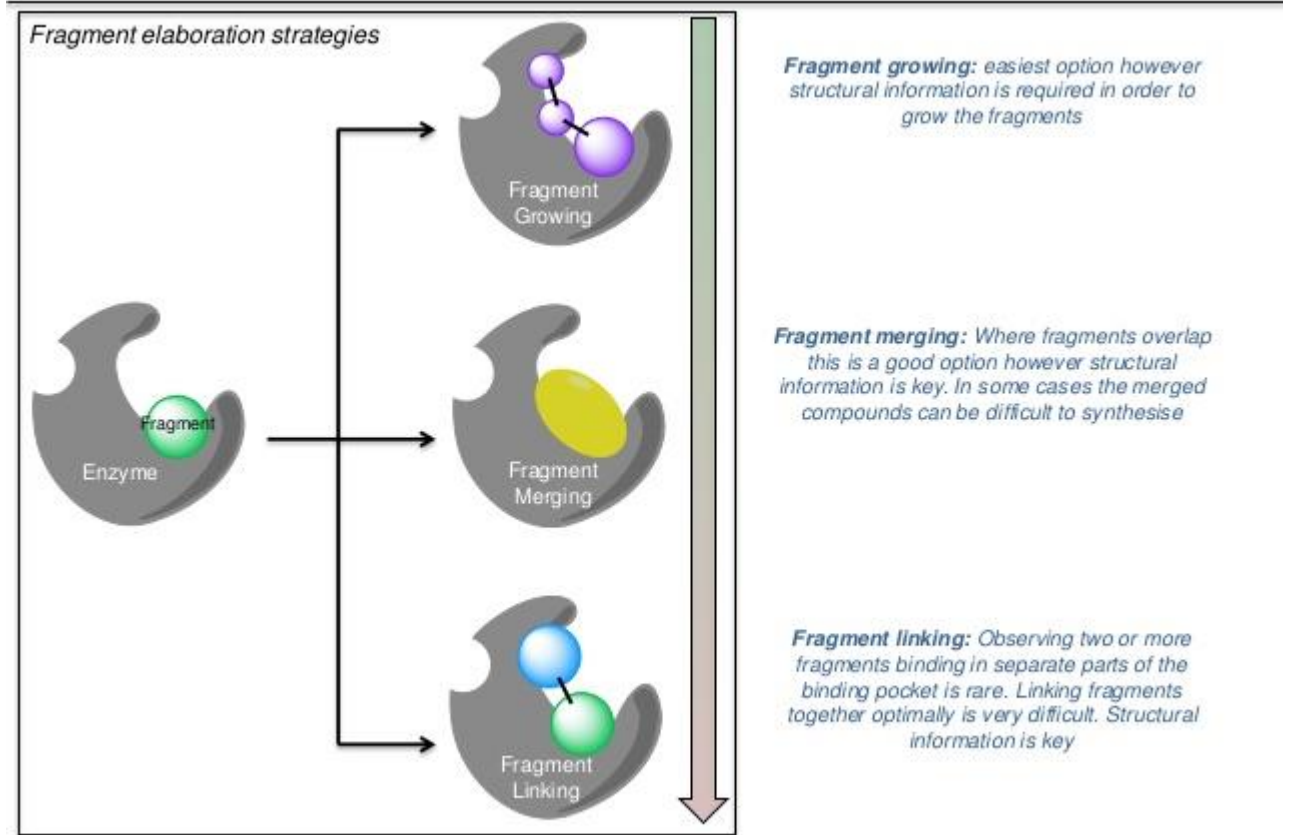
(a) Fragment growing



(b) Fragment linking



Fragment Elaboration Strategies – A Comparison



Cristallografia e FBDD

Poiché devo capire come il Ligando, potenziale Hit, interagisce con il Target, la conoscenza delle modalità di interazione tra Ligando e Target è essenziale. **E' importante capire come il Ligando interagisce con il Target a livello di struttura molecolare.**

Poiché i frammenti sono più piccoli, possiedono anche un numero inferiore di gruppi funzionali in grado di interagire con il Target. Di conseguenza **l'affinità dei frammenti verso il Target sarà in generale bassa (Kd dell'ordine del mM).**

La cristallografia di raggi-X è forse il metodo più attendibile per identificare interazioni deboli tra Target e ligando, anche se non è una tecnica semplice come alcuni metodi NMR.

Va sottolineato che ligandi di basso peso molecolare, sono in genere più solubili. Non è complicato raggiungere concentrazioni dell'ordine delle decine mM.

Cristallografia nel Drug Discovery

La cristallografia offre dei notevoli vantaggi laddove informazioni strutturali siano necessarie:

- Fornisce una **descrizione dettagliata** dell'interazione macromolecola/ligando
- L'analisi cristallografica **non prevede limiti di MW per il target** (NMR 40-50 kDa)
- L'analisi risulta semplificata poiché la macromolecola (Target) è sempre lo stesso
- E' una **tecnica consolidata**, ed è facile creare pipeline 'automatiche'

Una volta definito un protocollo per la preparazione dei cristalli, in una forma cristallina adeguata, la parte successiva del protocollo può essere molto rapida e relativamente semplice (addirittura noiosa...)

Considerazioni preliminari: cristalli del Target

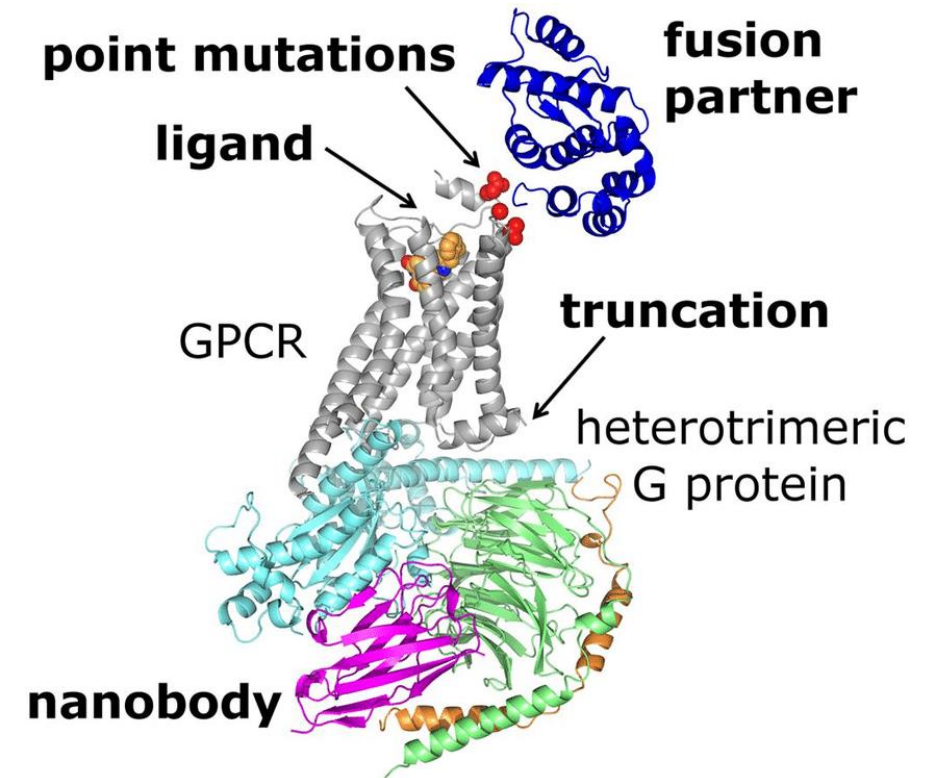
Ovviamente è necessario che il target sia **cristallizzabile!**

Se si intende perseguire una strategia in cui si intende determinare sperimentalmente i complessi tra il Target e il ligando (potenziale Hit), non bastano i pochi cristalli necessari alla sola risoluzione della struttura del Target.

La cristallizzazione deve essere **riproducibile** e se possibile **rapida**.

Inoltre la forma cristallina del Target deve essere tale da non impedire l'accesso del ligando al sito di binding (per soaking)

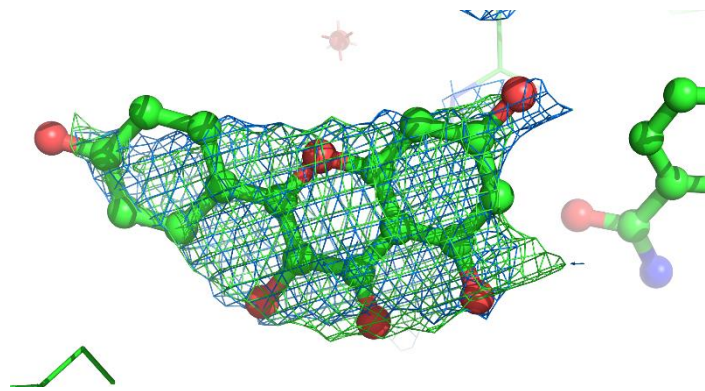
In alcuni casi (come per le GPCR) la ricerca di condizioni adeguate per produrre cristalli può essere molto difficile e lunga.



Considerazioni preliminari: risoluzione

Lo scopo non è solo quello di capire se un composto chimico ha legato la molecola target in un certo sito di binding, ma anche *comprendere il meccanismo di interazione* (legami idrogeno, interazioni elettrostatiche...).

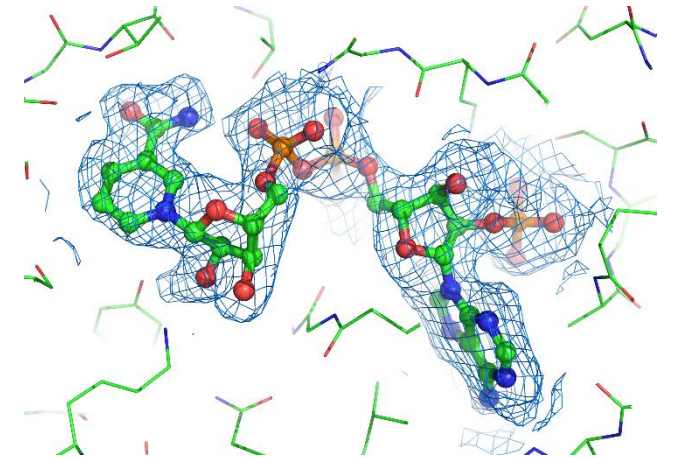
Poiché vogliamo una descrizione quanto più dettagliata dell'interazione tra target e ligando, è importante che **la risoluzione sia quanto più alta possibile.**



Mappa 2Fo-Fc e Fo-Fc (Kemferolo non incluso nel modello) ad una risoluzione di 2.5 Å

In pratica la risoluzione dovrebbe essere almeno di 2.0-2.5 Å.

*Talvolta anche le **molecole di acqua** partecipano all'interazione del ligando e quindi devono essere chiaramente visibili (1.5 – 2.0 Å).*



Mappa 2Fo-Fc (NADPH non incluso nel modello) ad una risoluzione di 1.9 Å

Introdurre il ligando

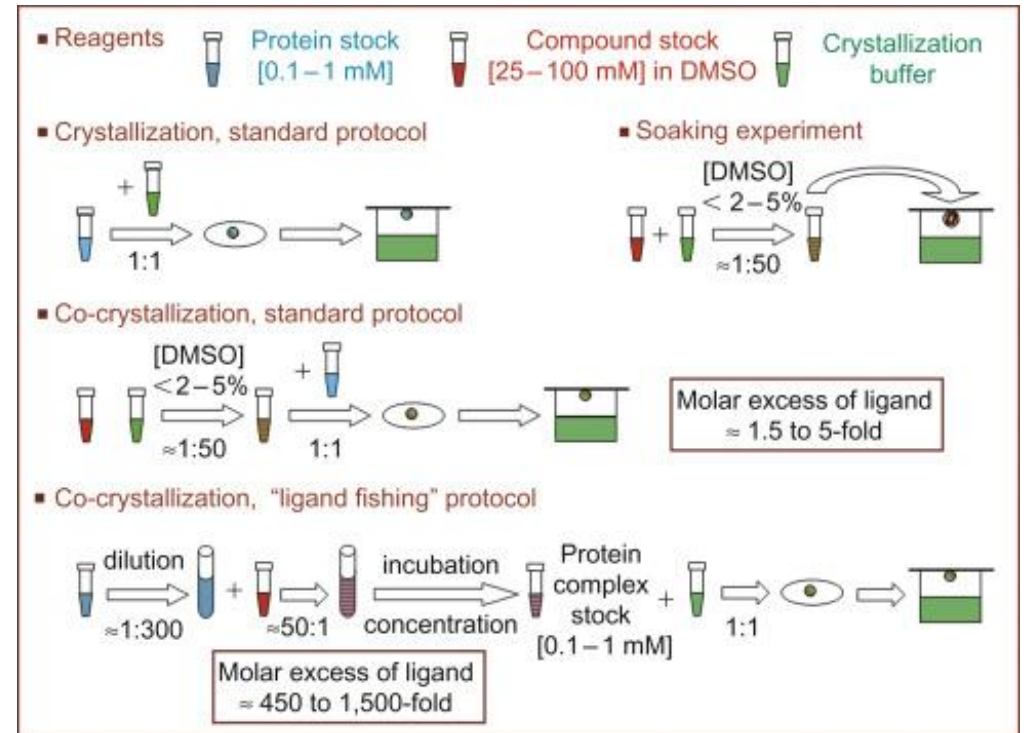
Il passaggio chiave per lo studio dell'interazione Target/Ligando è l'ottenimento di condizioni per la formazione del complesso tra Target e Ligando, nel cristallo.

L'efficienza del binding dipende dall'affinità del ligando per il sito di binding, infatti il rapporto tra la concentrazione del complesso rispetto alla concentrazione totale del Target è dato dalla relazione:

$$\frac{[PL]}{[PL] + [P]} = \frac{[L]}{[L] + K_d}$$

$$PL \rightarrow P + L \quad K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} \quad P = \text{Target}; L = \text{ligando}$$

Da questa relazione si evince che **$[L] \sim 10K_d$** per avere il 90% del Target legato al Ligando



I metodi usati per introdurre il ligando sono due

- Soaking
- Co-cristallizzazione

Introdurre il Ligando

- I ligandi possono essere più o meno solubili in soluzione acquosa (più lo sono meglio è).
- **La scarsa solubilità del ligando può essere un problema**, precipitanti come i PEG o alcoli/polialcoli, favoriscono la solubilizzazione del ligando.
- In genere il ligando è disciolto in una soluzione concentrata (25-100 mM) e poi diluito in fase di soaking/co-cristallizzazione. Se il ligando non è molto solubile (in acqua) viene disciolto in un solvente, organico (tipicamente **DMSO**).
- Se il ligando è poco solubile si utilizza un co-solvente che favorisce la solubilizzazione ma che non sia reattivo nei confronti del ligando. **In genere si aggiunge DMSO come co-solvente in fase di cristallizzazione o soaking (5 % v/v), se non danneggia la proteina/Target.**

** Il DMSO può, talvolta, interagire in modo specifico con il Target e alterare l'efficienza del binding del Ligando.*

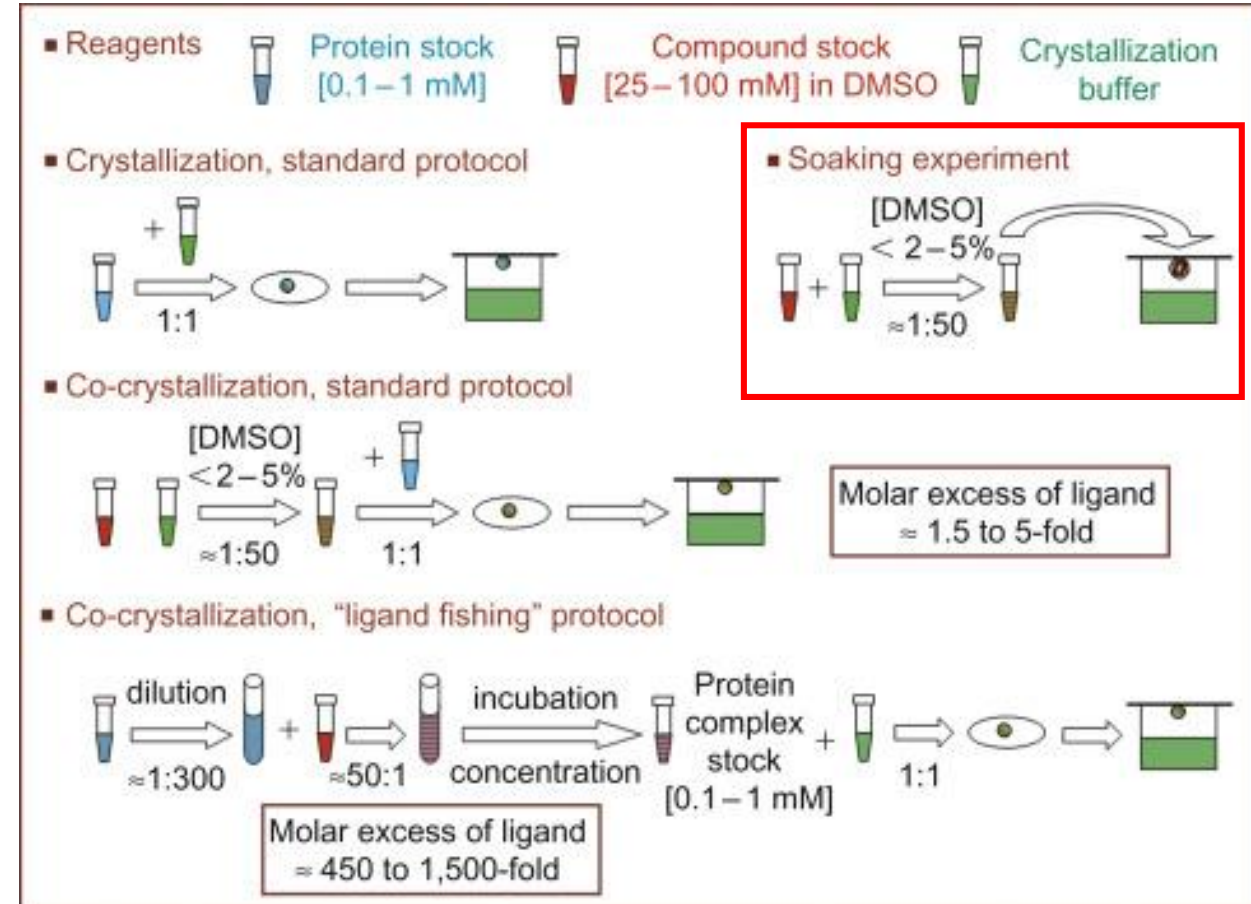
Soaking

I cristalli sono ottenuti in modo convenzionale, quindi sono trasferiti in una soluzione dove oltre al precipitante e liquido madre, è presente il ligando in concentrazione adeguata (0.5 – 10 mM).

Talvolta si aggiunge la soluzione del ligando direttamente alla goccia contenente i cristalli.

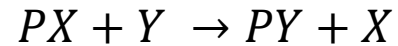
Il ligando diffonde all'interno del cristallo e tramite i canali di solvente presenti nel cristallo raggiunge i siti di binding.

La concentrazione della soluzione e il tempo di soaking (da poche ore a giorni) sono parametri da ottimizzare.



Spostamento del ligando

In alcuni casi può essere più semplice preparare cristalli che contengono un ligando specifico (per esempio per mezzo di co-cristallizzazione). **In questi casi si può provare a sostituire il ligando originario con uno nuovo, per mezzo di soaking.**



Dove X è il ligando che si vuole sostituire con il nuovo ligando Y

Se K_d^x è la costante di dissociazione per il ligando originario: $PX \rightarrow P + X$

E K_d^y è la costante di dissociazione per il ligando originario: $PY \rightarrow P + Y$, ne consegue:

$$\frac{K_d^x}{K_d^y} = \frac{[P][X]}{[PX]} \cdot \frac{[PY]}{[P][Y]} = \frac{[PY][X]}{[PX][Y]} \Rightarrow \frac{[PY]}{[PX]} = \frac{K_d^x[Y]}{K_d^y[X]}$$

Lo spostamento del ligando originale sarà tanto più efficiente quanto maggiore sarà la concentrazione e l'affinità per il Target del nuovo ligando rispetto a quello originario.

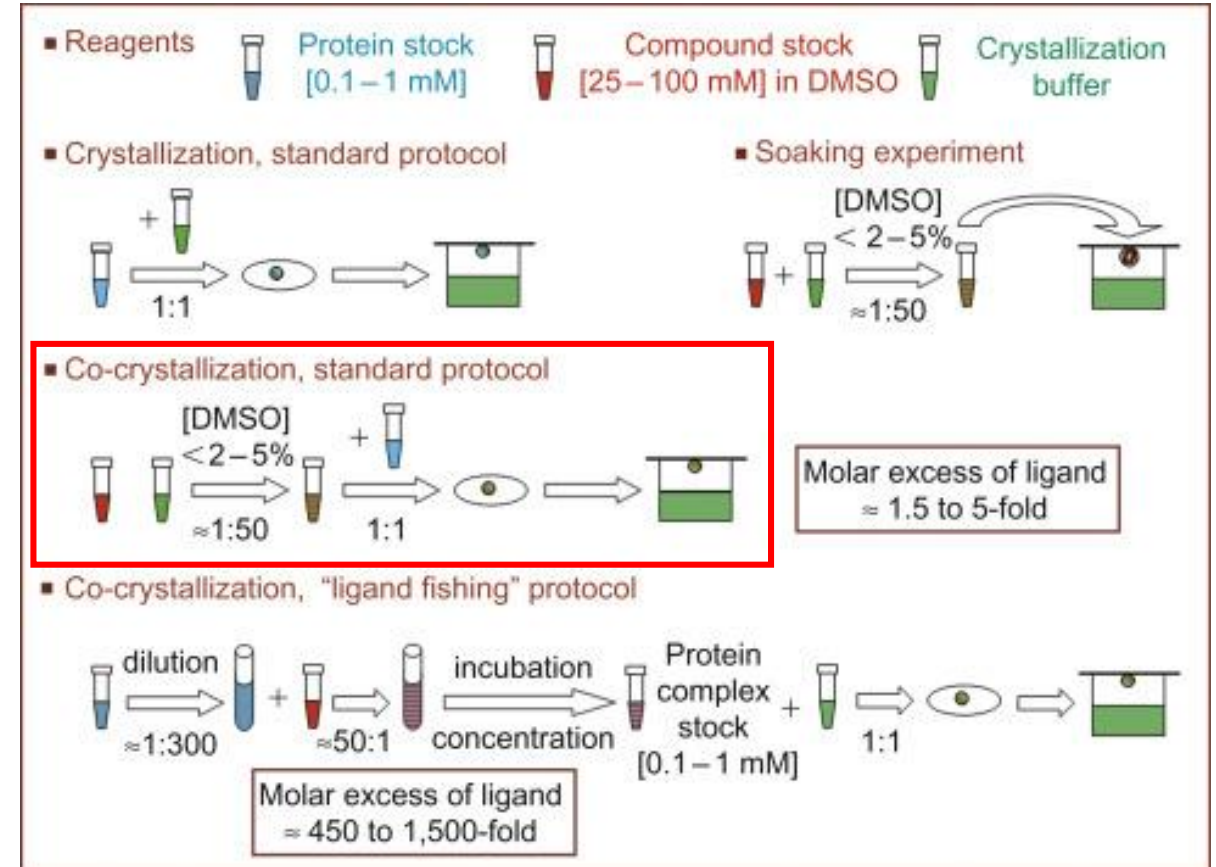
Co-cristallizzazione

La soluzione con il ligando è aggiunta direttamente in fase di cristallizzazione.

Le condizioni di cristallizzazione possono cambiare un po' ed è quindi necessario uno screening intorno alle condizioni di cristallizzazione conosciute. Talvolta il *cross-seeding* può semplificare le cose.

L'interazione Target/Ligando avviene in soluzione ed è quindi più 'naturale' (non risente dell'impacchettamento cristallino).

Nel caso di cambiamenti conformazionali indotti dal ligando, può essere l'unico modo possibile per cristallizzare il complesso Target/Ligando.



Fishing

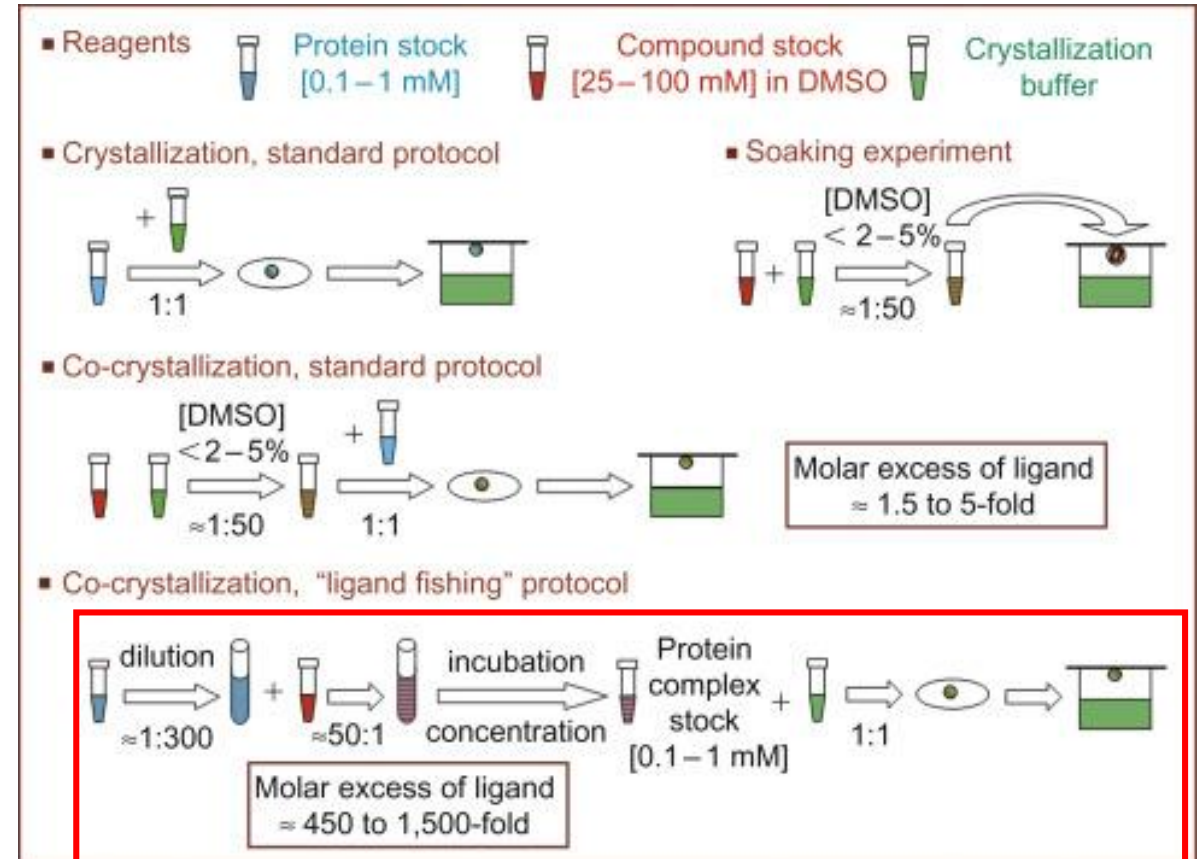
Il 'fishing' può essere un modo possibile se la solubilità del ligando è bassa ed è difficile ottenere un rapporto [Ligando]/[Target] maggiore o uguale al necessario (diciamo 5-10).

La proteina viene diluita adeguatamente e quindi incubata con il ligando poco solubile in modo da avere un rapporto [Ligando]/[Target] adeguato.

Una volta incubata la proteina con il ligando ad una concentrazione adeguata per il tempo necessario (non più di qualche ora), la soluzione viene nuovamente concentrata alla concentrazione del Target necessaria per la sua cristallizzazione. **Il ligando rimarrà legato al Target.**

Al termine del processo di 'arricchimento' si procede alla cristallizzazione.

Di fatto è una co-cristallizzazione.



Confronto Soaking/Co-Cristallizzazione

Vantaggi

Svantaggi

Soaking:

- Semplice
- Rapido
- Riproducibile

- Può risentire della forma cristallina
- Difficoltà se il ligando è poco solubile
- Il soaking danneggia il cristallo e peggiora la risoluzione
- Problematico se il binding induce variazioni conformazionali

Co-Cristallizzazione:

- Interazione in soluzione
- Possibile con ligandi poco solubili (fishing)
- Ammette variazioni conformazionali importanti
- La risoluzione non peggiora

- 'Nuove' condizioni di cristallizzazione
- Più lento
- Ho tante cristallizzazioni quanti sono i ligandi

In generale la prima soluzione provata è il soaking (a meno che non vi siano validi motivi per non provare).

Acquisizione e Affinamento dei Dati

L'acquisizione dei dati non presenta particolarità di rilievo. Una moderna beamline di sincrotrone può acquisire un dataset completo in poche decine di minuti (anche meno), il che si traduce nell'acquisizione di decine di dataset (potenziali strutture di complessi Target/ligandi) in un solo giorno.

I composti chimici che si usano come crioprotettori non devono competere con il sito di binding. E' comunque buona pratica aggiungere un po' di ligando alla soluzione del crioprotettore.

La struttura del Target deve essere nota da studi precedenti, le strutture dei complessi sono determinate per Molecular Replacement.

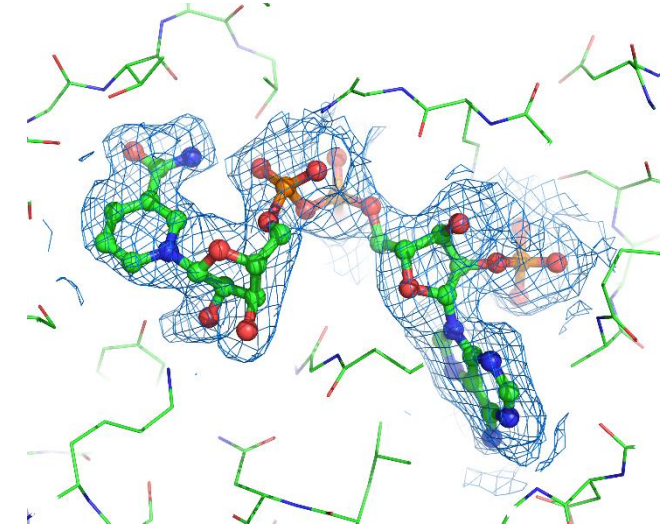
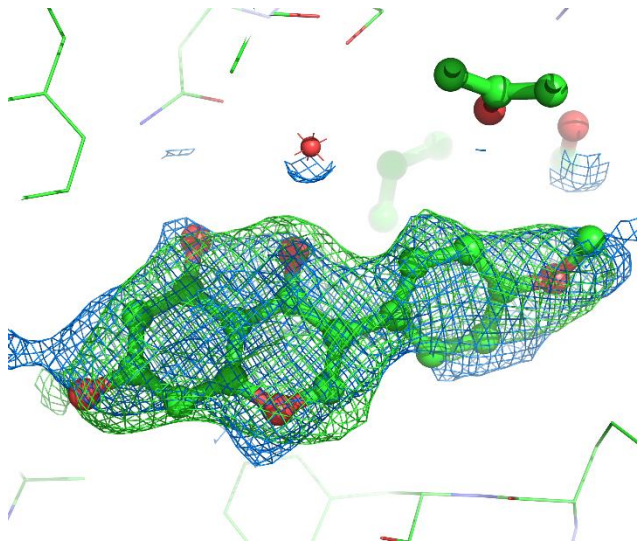
Anche il protocollo di affinamento della struttura è noto da studi precedenti, non vi è nessuna difficoltà né particolarità specifica in questa fase.

- **Se il Ligando è una molecola nuova, vanno generati gli opportuni *restrarints* per l'affinamento con i minimi quadrati (parametri geometrici).**
 - *Quando si introducono le molecole di solvente, in fase di completamento del modello, spesso si evita di aggiungerle nella zona dove si suppone possa interagire il ligando.*
-

Identificazione e modelling del ligando

La presenza del ligando è determinata dalla visualizzazione delle mappe Fo-Fc (mappa differenza) e 2Fo-Fc (mappa di densità).

Un ligando che interagisce fortemente con il Target darà luogo a picchi molto intensi nelle due mappe. In questi picchi verrà inserito e modellato il ligando (di struttura chimica nota).



Talvolta l'interazione non è molto forte, per cui le mappe non mostrano picchi molto intensi dovuti ad una bassa occupazione del sito di binding da parte del ligando. **L'occupazione da parte del ligando può essere affinata, ma ci vuole cautela (correla con il fattore termico!) e dati a buona risoluzione.**

I picchi della mappa Fo-Fc hanno intensità tra i 3 e i 5 σ della mappa (in genere) . Per quelli della 2Fo-Fc basta solo 1 o 2 σ .

Validazione dei risultati



In alcuni casi (alta risoluzione, binding molto forte) la geometria e l'orientamento del Ligando sono immediatamente determinati.

In altri casi possono esistere delle ambiguità, non solo nell'orientamento del ligando, ma anche sull'evidenza che il ligando sia effettivamente presente (solvente? Crioprotettore? La valutazione è sempre soggettiva!). Validazione: <http://www.ruppweb.org/twilight/default.htm>)

In alcuni casi può essere necessario ripetere più volte l'affinamento partendo da geometrie e orientazioni del ligando diverse, al fine di chiarire se il ligando è effettivamente presente e quale è il suo orientamento.

La scelta del modello finale è cruciale, poiché definisce il modello di interazione Target/ligando e quindi la successiva fase di ottimizzazione da ligando a Lead.

Analisi delle interazioni

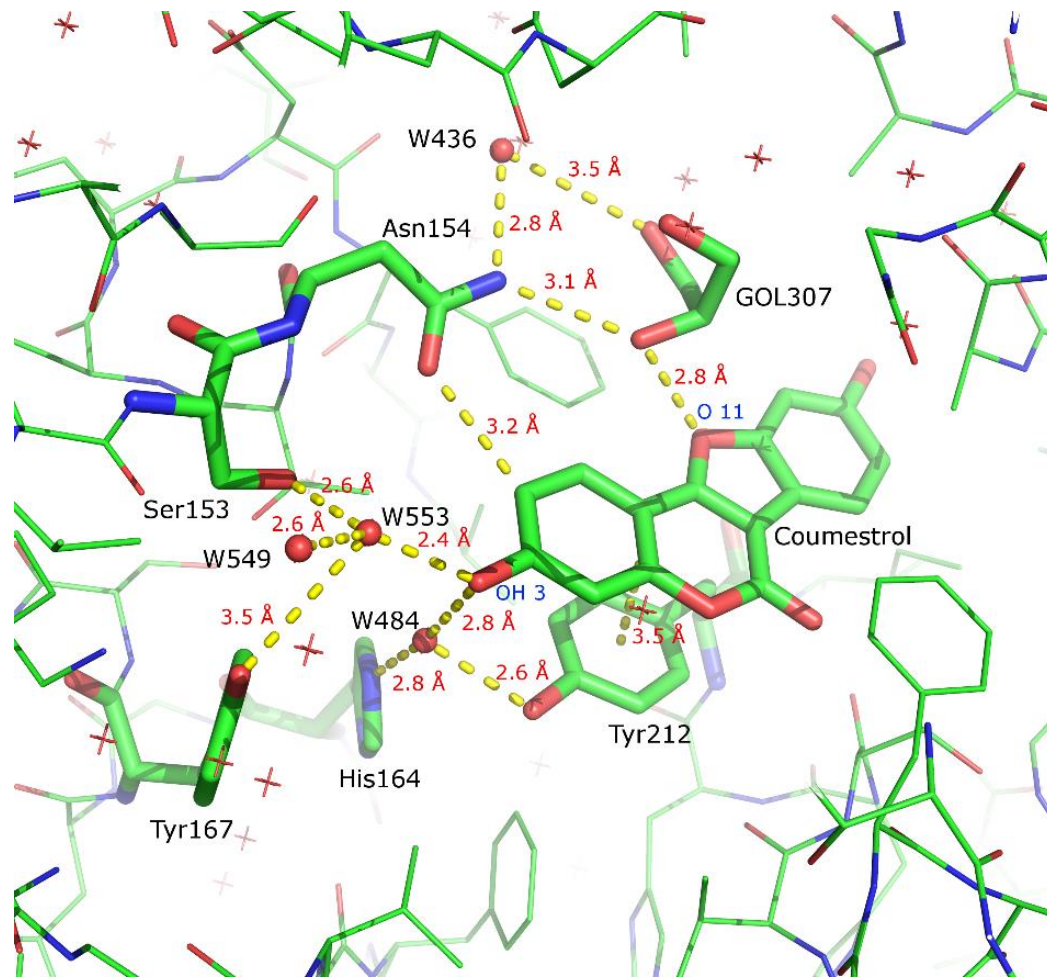
L'analisi delle interazioni tra Target e ligando viene svolta in fase di grafica molecolare con software opportuni. (Pymol, ChimeraX...)

In questa fase vengono chiariti:

- Legami idrogeno (donatore/accettore)
- Interazioni elettrostatiche
- Interazioni di dipolo
- Interazioni π - π

Inoltre l'analisi delle superfici combinata con la pura ispezione visiva, mette in evidenza la presenza di gruppi, sul ligando, che disturbano l'interazione con il Target per motivi sterici, o la presenza di superfici potenzialmente utilizzabili per ulteriori interazioni Van der Waals.

E' possibile che ci siano molecole di acqua coinvolte nel processo di binding.



Importanza della luce di sincrotrone

L'impatto della luce di sincrotrone nel Structure Based Drug Discovery è stato molto forte.

La possibilità di **acquisire dati in tempi molto brevi** permette di provare centinaia di complessi Target/ligando in tempi relativamente brevi e quindi di validare rapidamente i possibili candidati ad Hit.

Inoltre, **l'automazione nei processi di montaggio, acquisizione e analisi dei dati**, ha enormemente accelerato l'intero processo della determinazione strutturale.



PX-X10SA (Swiss Light Source, *Willigen - CH*): finanziata da Novartis e Hoffmann-La Roche

Considerati i tempi necessari alla valutazione dei Hit/Lead, la parte di acquisizione dei dati cristallografici non è più il collo di bottiglia.

Fragment Based Drug Discovery e Luce di Sincrotrone

Beamline I04-1 (Diamond; Oxford UK)

La beamline si inserisce nel contesto del FBDD.

I cristalli vengono in contatto per soaking (1 ora) con ligandi (5-10 mM) presenti in librerie opportune, sviluppate internamente o disponibili commercialmente.

- E' stata sviluppata 'in house' una libreria di frammenti specifica per il Fragment Based Drug Discovery
- Sono stati automatizzati il processo di soaking e di 'gestione documentale' dei diversi cristalli da sottoporre ad analisi cristallografica
- Poiché i frammenti possono interagire con bassa affinità (Kd dell'ordine del mM), è stato sviluppato un protocollo (software) per l'identificazione di Ligandi legati debolmente (**PanDDA**)



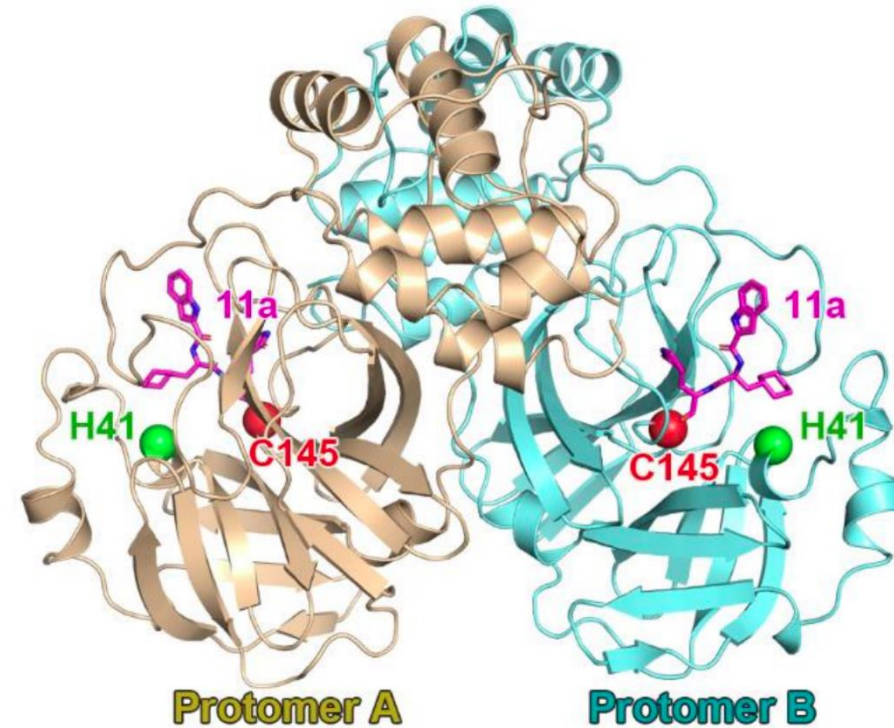
Una seconda beamline operante nel Fragment Based Drug Discovery è operativa a BESSY, Berlino-D.

Anche in questo caso è stata sviluppata una libreria di frammenti 'in house'.

SARS-CoV-2 Main Protease

SARS-CoV-2 3C-like protease, nota anche come SARS-CoV-2 3CL^{pro}, SARS-CoV-2 Main Protease o SARS-CoV-2 nsp5, è una proteasi a cisteina responsabile del taglio in 11 posizioni della poliproteina da cui maturano proteine coinvolte nella replicazione del virus.

La Main Protease è considerato un interessante target farmacologico nella terapia del COVID-19, data l'assenza di proteine 'simili' nel genoma umano.



PanDDA e SARS-CoV-2 Main Protease (*DIAMOND*)

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, lacks effective therapeutics. Additionally, no antiviral drugs or vaccines were developed against the closely related coronavirus, SARS-CoV-1 or MERS-CoV, despite previous zoonotic outbreaks. To identify starting points for such therapeutics, we performed a large-scale screen of electrophile and non-covalent fragments through a combined mass spectrometry and X-ray approach against the SARS-CoV-2 main protease, one of two cysteine viral proteases essential for viral replication. Our crystallographic screen identified 71 hits that span the entire active site, as well as 3 hits at the dimer interface. These structures reveal routes to rapidly develop more potent inhibitors through merging of covalent and non-covalent fragment hits; one series of low-reactivity, tractable covalent fragments were progressed to discover improved binders. These combined hits offer unprecedented structural and reactivity information for on-going structure-based drug design against SARS-CoV-2 main protease.

Nat. Comm. (2020) 11, 5047

PanDDA e SARS-CoV-2 Main Protease

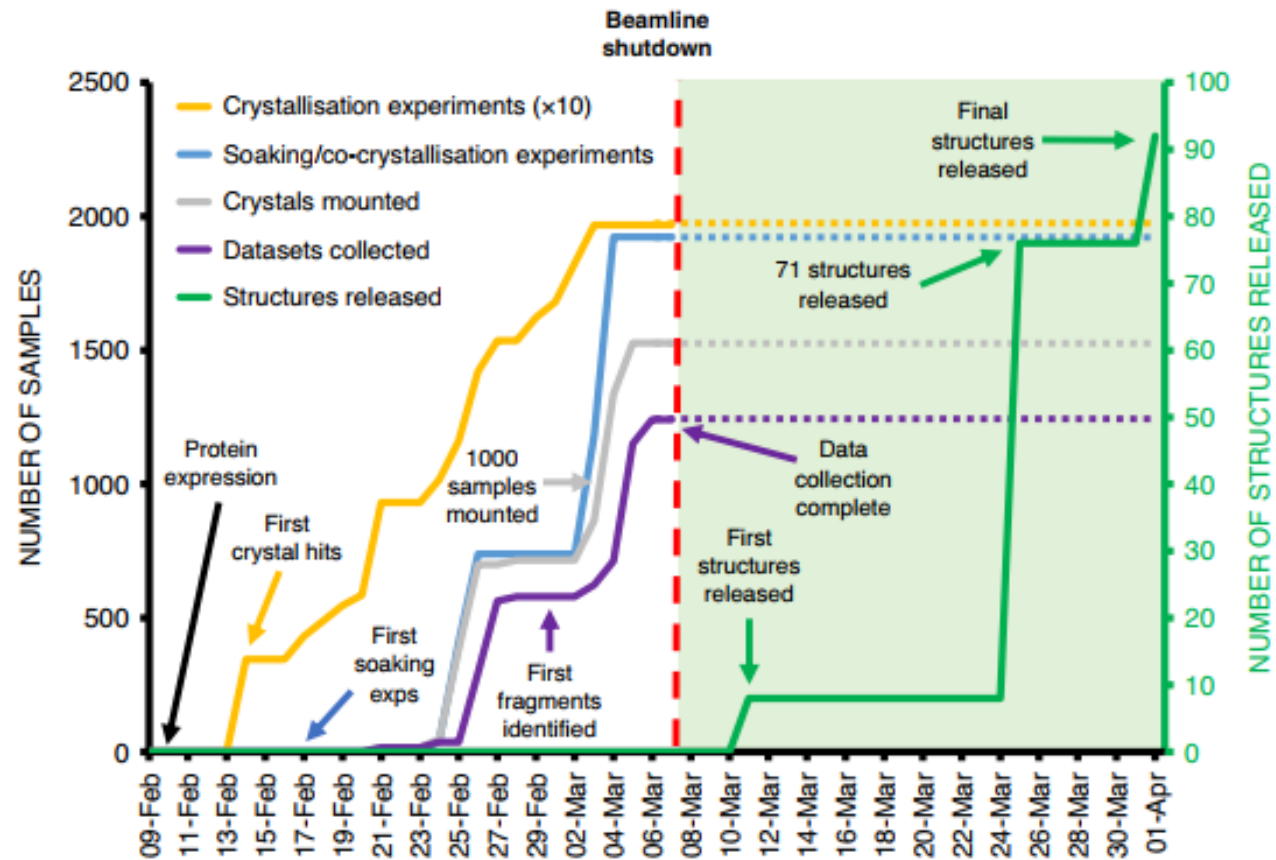


Fig. 2 Timeline of crystallographic fragment screen. Progress of the Mpro fragment screening experiment from the start of protein production and purification (9 Feb 2020) to the deposition and release of the high-resolution ligand-free structure of Mpro PDB ID 6YB7[10.2210/pdb6yb7/pdb] and the structures of the 96 fragment hits identified in the fragment screening campaign using the XChem platform at Diamond Light Source.

PanDDA e COVID-19

Ad oggi:

- SARS-CoV-2 3C-like protease/ nsp5/ Main Protease: 121 strutture di complessi
- SARS-CoV-2 Uridylate-specific endoribonuclease /nsp15/NendoU: 7 strutture di complessi
- SARS-CoV-2 Helicase/: nsp13 51 strutture di complessi

Riferimenti

Rondeau & Schreuder, 'Protein Crystallography and Drug Discovery' (2015) *The Practice of Medicinal Chemistry*, Chapter **22** 511-537

Wermuth et al, 'Strategies in the Search for New Lead Compounds or Original Working Hypotheses' (2015) *The Practice of Medicinal Chemistry*, Chapter **4** 73-99

Danley E., 'Crystallization to obtain protein-ligand complexes for structure-aided drug design' (2006), *Acta Cryst D***62**, 569-575

Douangamath A., et al, 'Crystallographic and electrophilic fragment screening of the SARS-CoV-2 main protease' (2020) *Nat. Comm* **11**, 5047