

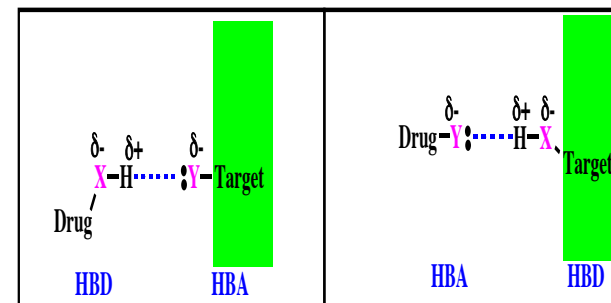
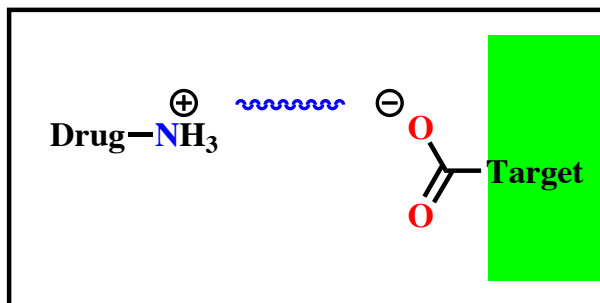
# Farmaci e loro target: introduzione

# Legami tra ligando e target

# Forze coinvolte

## Legami ionici o forze elettrostatiche

- **Il più forte** dei legami intermolecolari (**20-40 kJ mol<sup>-1</sup>**)
- Si instaura tra gruppi con cariche opposte
- La forza dell'interazione è inversamente proporzionale alla distanza tra le due cariche
- **Interazioni più forti in ambienti idrofobici**
- La forza dell'interazione diminuisce meno rapidamente all'aumento della distanza tra le due porzioni rispetto alle altre interazioni intermolecolari
- **Interazioni iniziali più importanti** quando un farmaco entra nel sito di binding

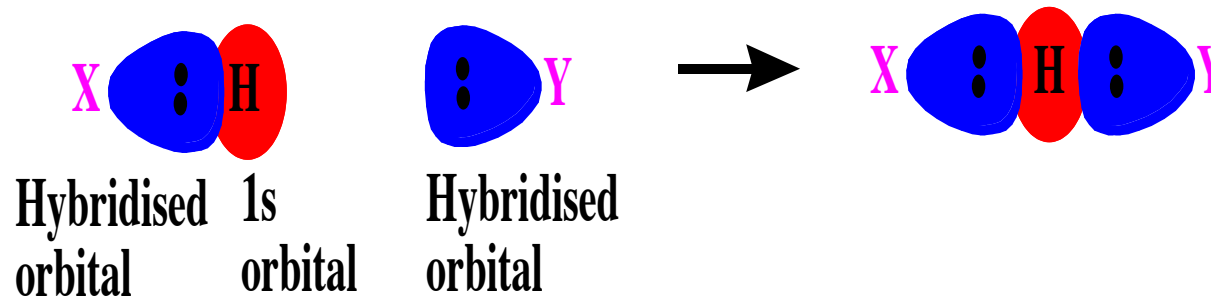


# Forze coinvolte

## Legami idrogeno

- Di forza varia
- Più deboli delle interazioni elettrostatiche, ma più forti di quelle di van der Waals
- Un legame idrogeno ha luogo tra un **idrogeno elettrone-deficiente** e un **eteroatomo ricco di elettroni** (N o O)
- L'atomo di idrogeno è generalmente legato a un eteroatomo (O o N)
- Donatore di legami idrogeno
- Accettore di legami idrogeno

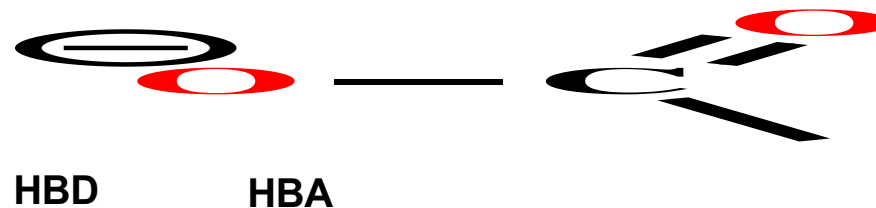
## Legami intermolecolari



# Forze coinvolte

## Legami idrogeno

- L'interazione coinvolge orbitali ed è direzionale
- Orientazione ottimale: il legame H-X punta direttamente verso il doppietto elettronico di Y, in modo che l'angolo tra X, H e Y sia di 180°



- Forti accettori di legami idrogeno
  - carbossilati, fosfati, ammine terziarie
- Moderate accettori di legami idrogeno
  - acidi carbossilici, ossigeno ammidico, chetone, estere, etere, alcool
- Scarsi accettori di legami idrogeno
  - solfuri, fluoruri, cloruri, anelli aromatici, azoto ammidico, ammine aromatiche
- Buoni donatori di legami idrogeno
  - ioni alchilammonici

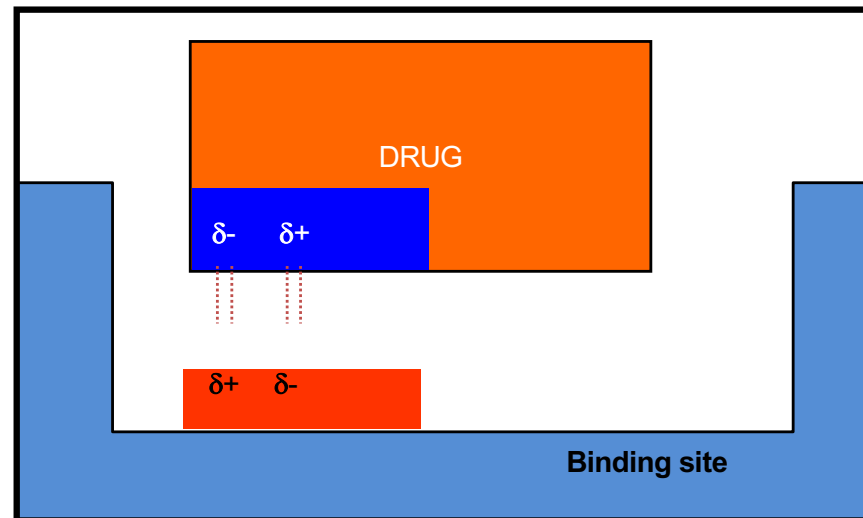
# Forze coinvolte

## Interazioni di Van der Waals

- Interazioni molto deboli ( $2-4 \text{ kJ mol}^{-1}$ )
- Hanno luogo tra le regioni idrofobiche del farmaco e del target
- Aree transitorie di alta e bassa densità elettronica che causano dipoli temporanei
- L'interazione diminuisce rapidamente con la distanza
- Il farmaco deve essere vicino alla regione di legame affinché si verifichino le interazioni
- Il contributo complessivo delle interazioni di van der Waals può essere cruciale per il binding

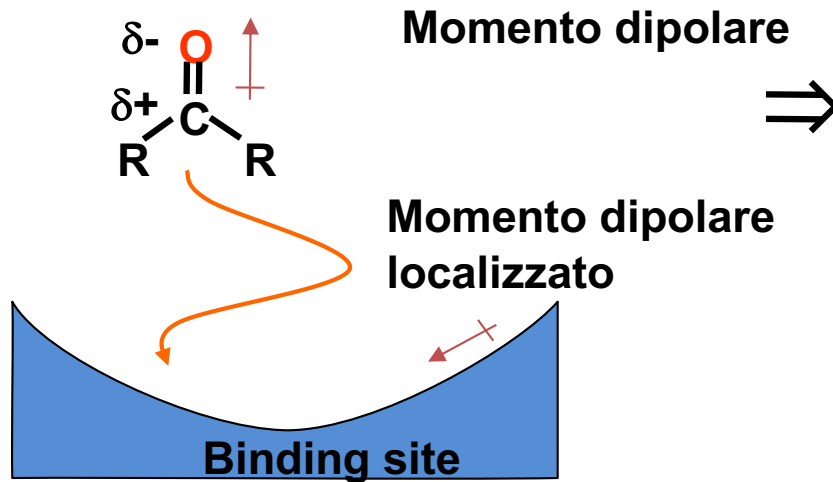
## Legami intermolecolari

- ■ Hydrophobic regions
- δ+ δ- Transient dipole on drug
- ⋮ van der Waals interaction

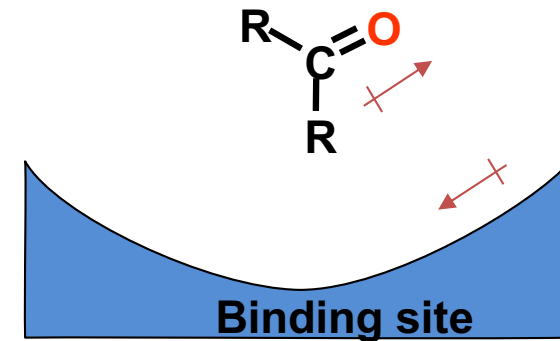


# Forze coinvolte

## Interazioni dipolo-dipolo

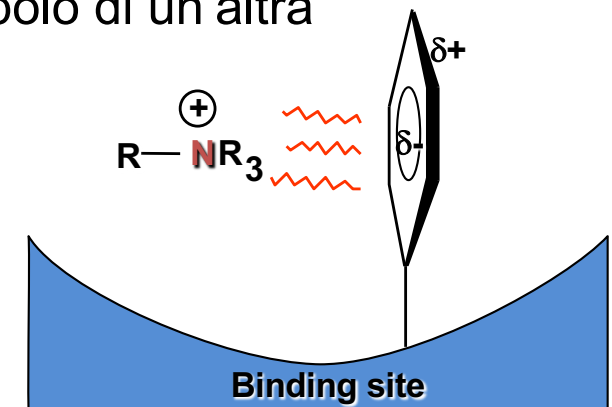


## Legami intermolecolari



## Interazioni dipolo indotto

- Ha luogo quando la carica di una molecola induce il dipolo di un'altra
- Ione ammonio e anello aromatico

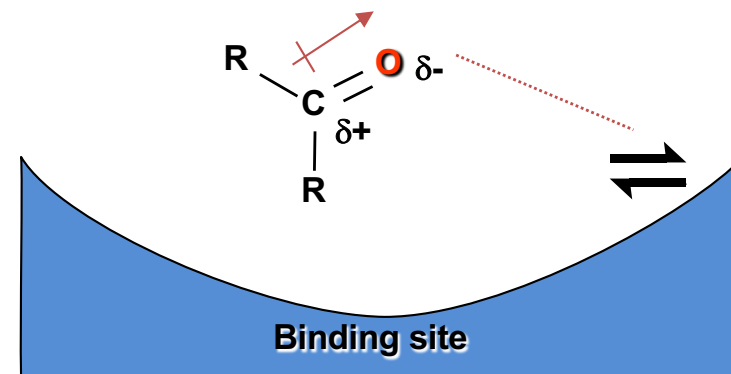
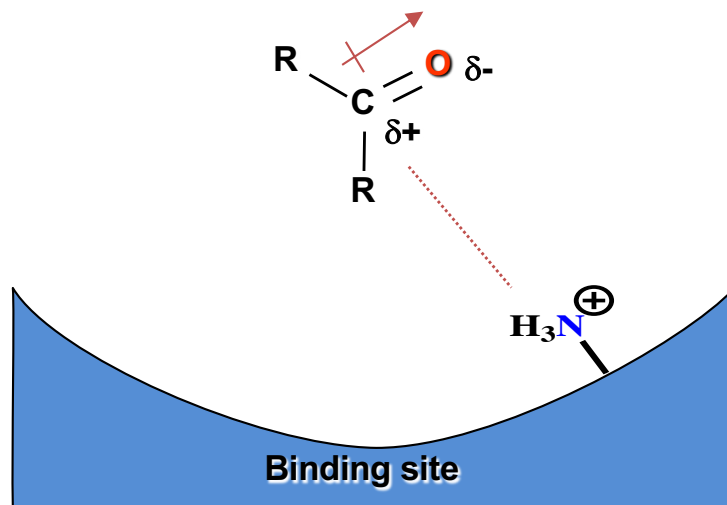


# Forze coinvolte

## Interazioni ione-dipolo

- Hanno luogo quando la carica di una molecola interagisce con il momento dipolare di un'altra
- Più forti delle interazioni dipolo-dipolo
- La forza del legame diminuisce meno velocemente all'aumentare della distanza rispetto a quanto succede per le interazioni dipolo-dipolo

## Legami intermolecolari

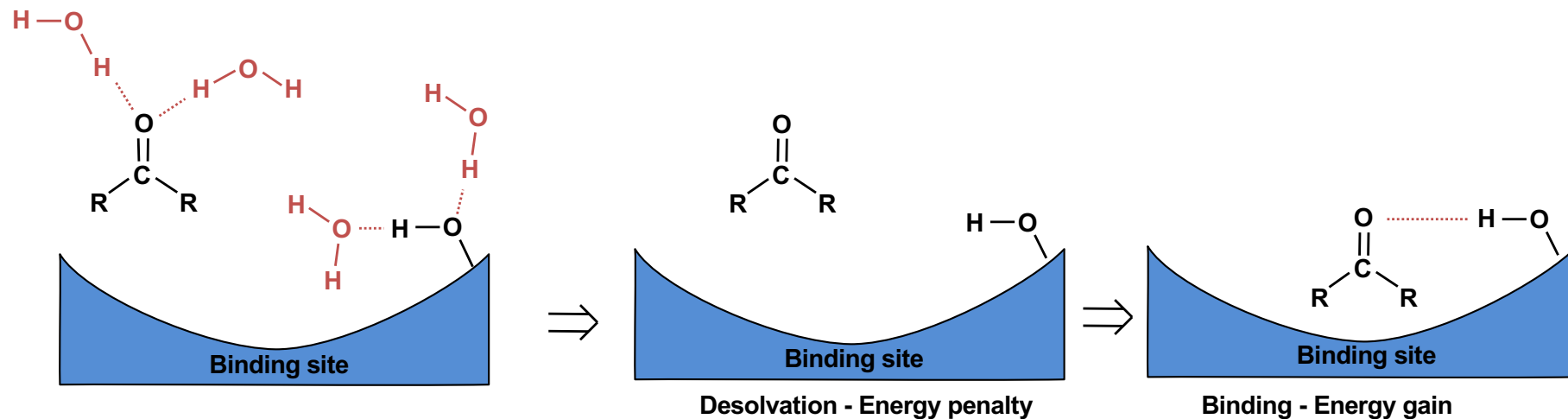




# Forze coinvolte

## Desolvatazione

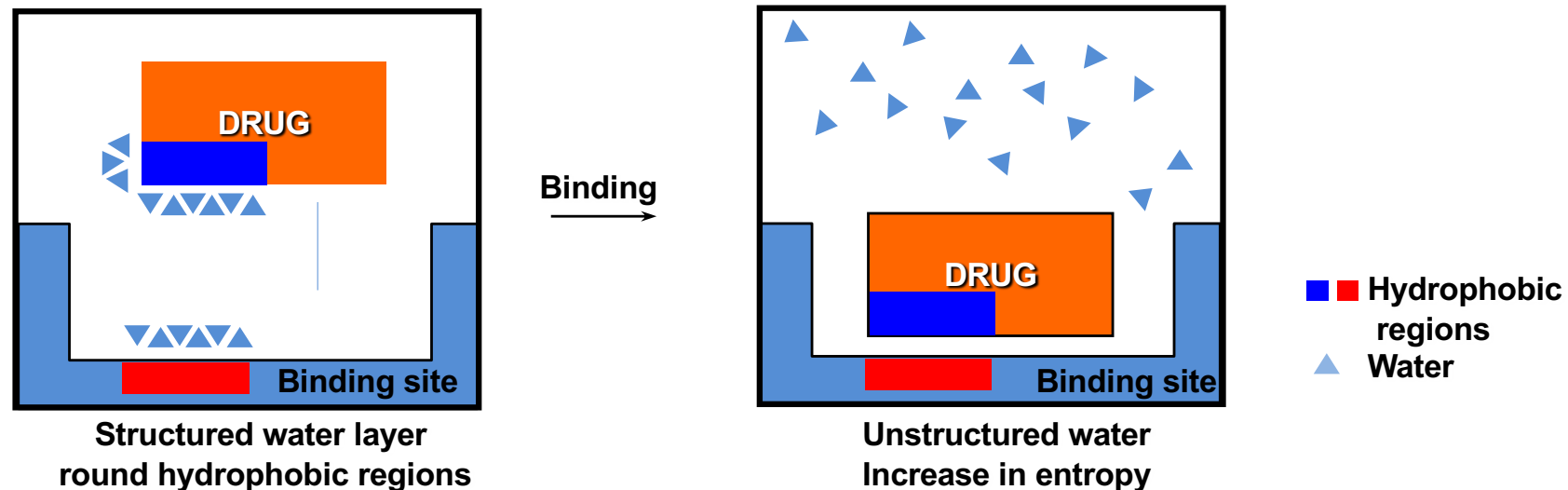
- Regioni polari di un farmaco e del suo target: solvate prima dell'interazione
- Desolvatazione: necessaria e richiede energia
- L'energia ottenuta dall'interazione farmaco-target deve essere maggiore dell'energia richiesta per la desolvatazione



# Forze coinvolte

## Interazioni idrofobiche

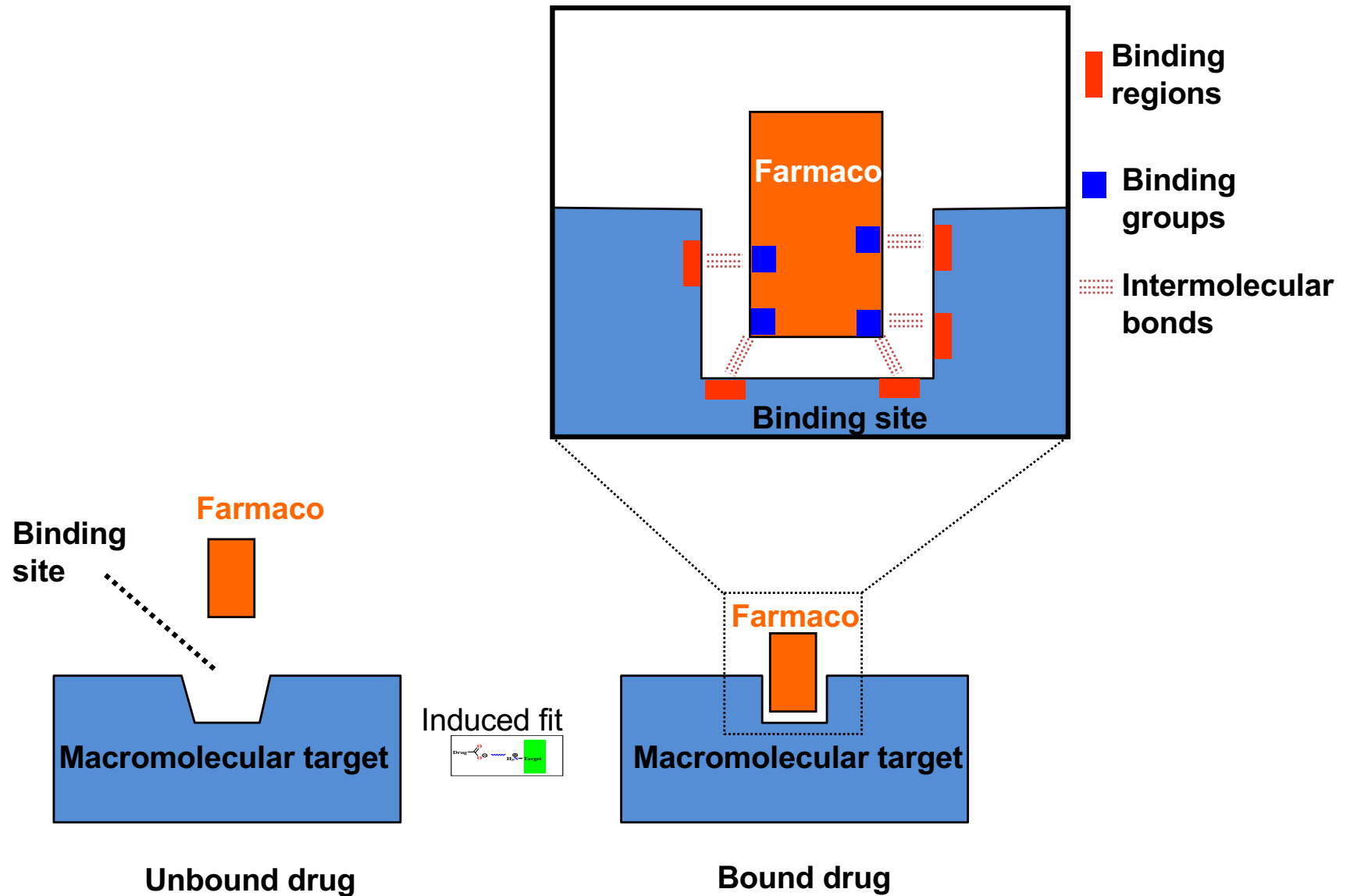
- Le regioni idrofobiche del farmaco e del suo target non sono solvate
- Le molecole d'acqua interagiscono tra loro e formano uno strato ordinato vicino alle regioni idrofobiche - entropia negativa
- Le interazioni tra le regioni idrofobiche del farmaco e del suo target 'rilasciano' le molecole d'acqua impaccate
- Aumento di entropia
- Vantaggioso per energia di legame



# Target di farmaci

- Bersagli farmacologici: macromolecole
- **Farmaci: molecole generalmente molto più piccole** dei loro bersagli
- Farmaci: interazione con il target mediante legame ai siti di legame del target stesso
- Siti di legame: tipicamente cavità idrofobiche o fessure sulla superficie di macromolecole
- Interazioni di legame: tipicamente legami intermolecolari
- In genere in **equilibrio tra forma legata e non**
- **Gruppi funzionali del farmaco coinvolti nelle interazioni di legame (binding groups)**
- Regioni specifiche all'interno del sito di legame coinvolte nelle interazioni di legame (regioni di binding)

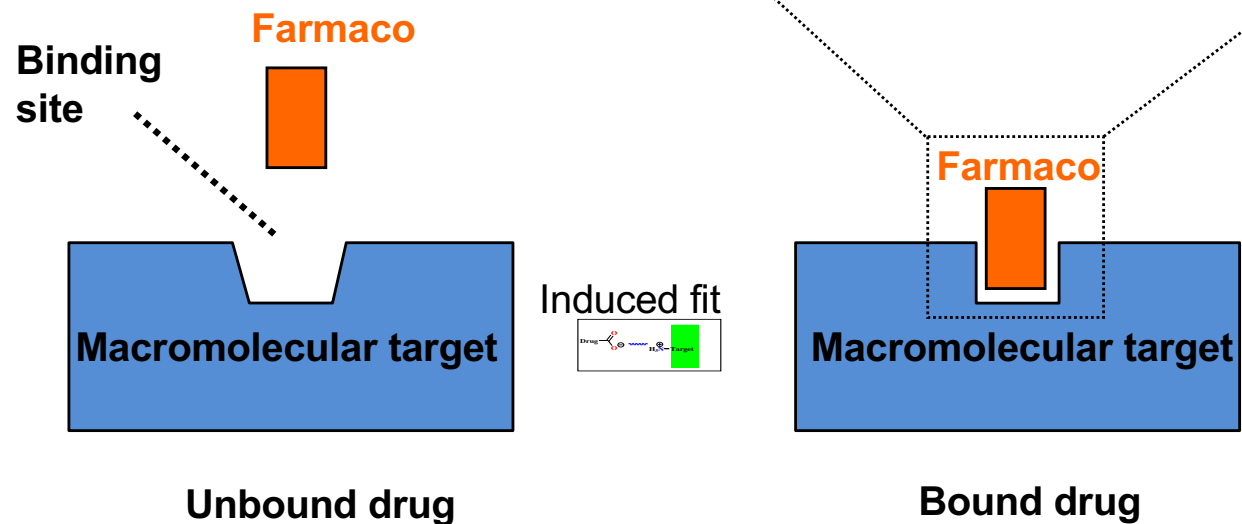
# Target di farmaci



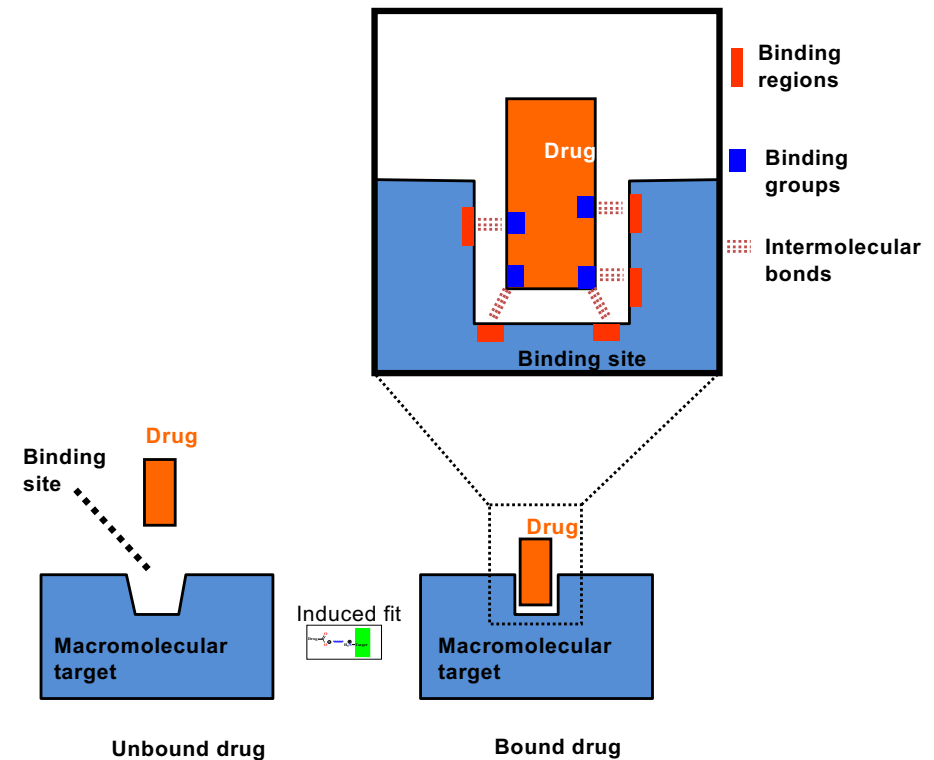
# Target di farmaci

“**Lock and Key**”: complementarità “rigida” tra target e substrato a esso complementare

“**Induced fit**”: gradi di flessibilità della struttura. Adattamento del target alla conformazione del substrato quando le due parti interagiscono



# Target di farmaci



Le interazioni di legame generalmente portano a un **“induced fit”** in cui il binding site cambia forma per accomodare il farmaco (substrato)

L'**induced fit** può portare anche a variazioni della struttura complessiva del target

**Importante per l'effetto farmacologico del farmaco**

# Target di farmaci

## Lipidi

Lipidi della membrana cellulare

## Carboidrati

Carboidrati della superficie cellulare

Antigeni e molecole di riconoscimento

## Acidi Nucleici

DNA

RNA

## Proteine

Enzimi

Proteine di trasporto

Proteine strutturali (tubulina)

Recettori

# Target di farmaci

## Lipidi

Lipidi della membrana cellulare

## Carboidrati

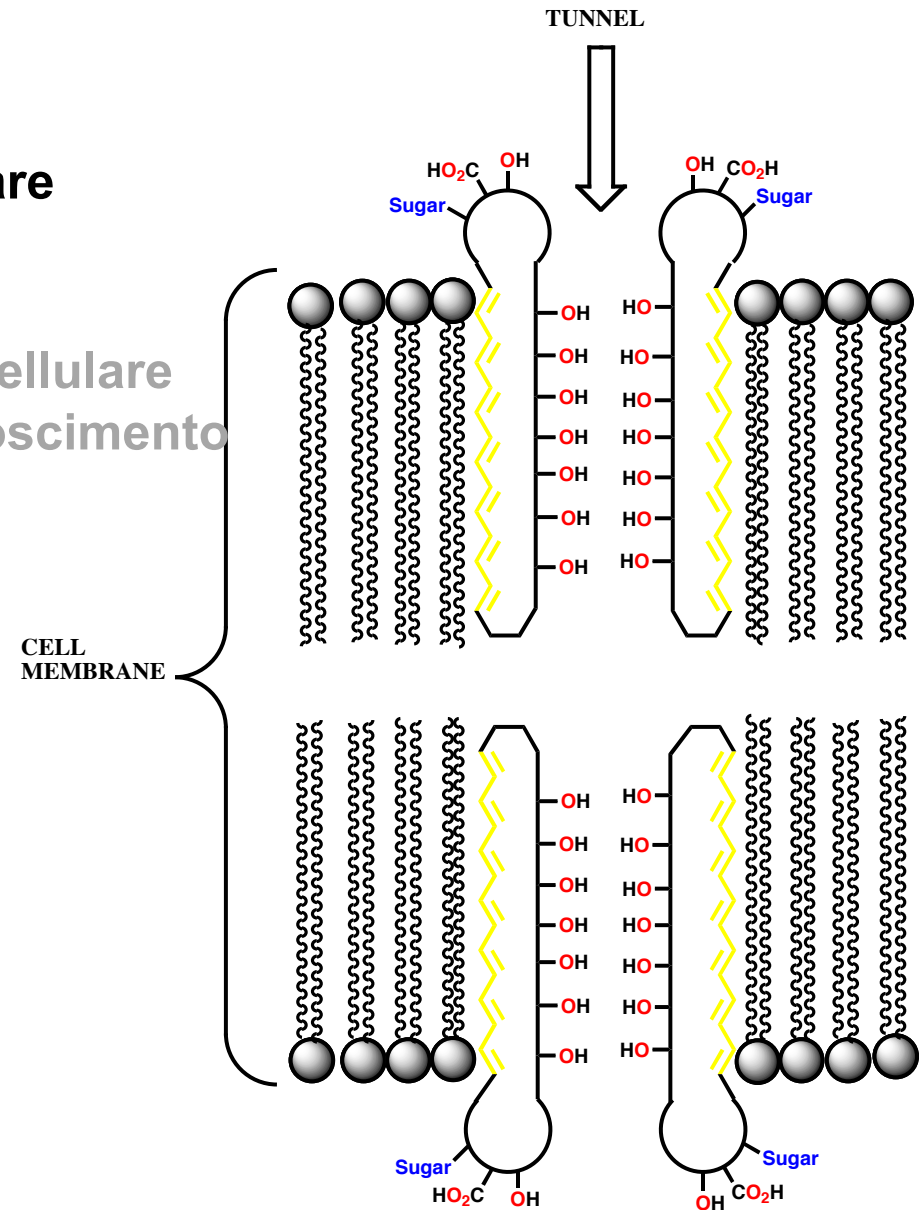
Carboidrati della superficie cellulare  
Antigeni e molecole di riconoscimento

## Acidi Nucleici

DNA  
RNA

## Proteine

Enzimi  
Proteine di trasporto  
Proteine strutturali (tubulina)  
Recettori





# Target di farmaci

## Lipidi

Lipidi della membrana cellulare

## Carboidrati

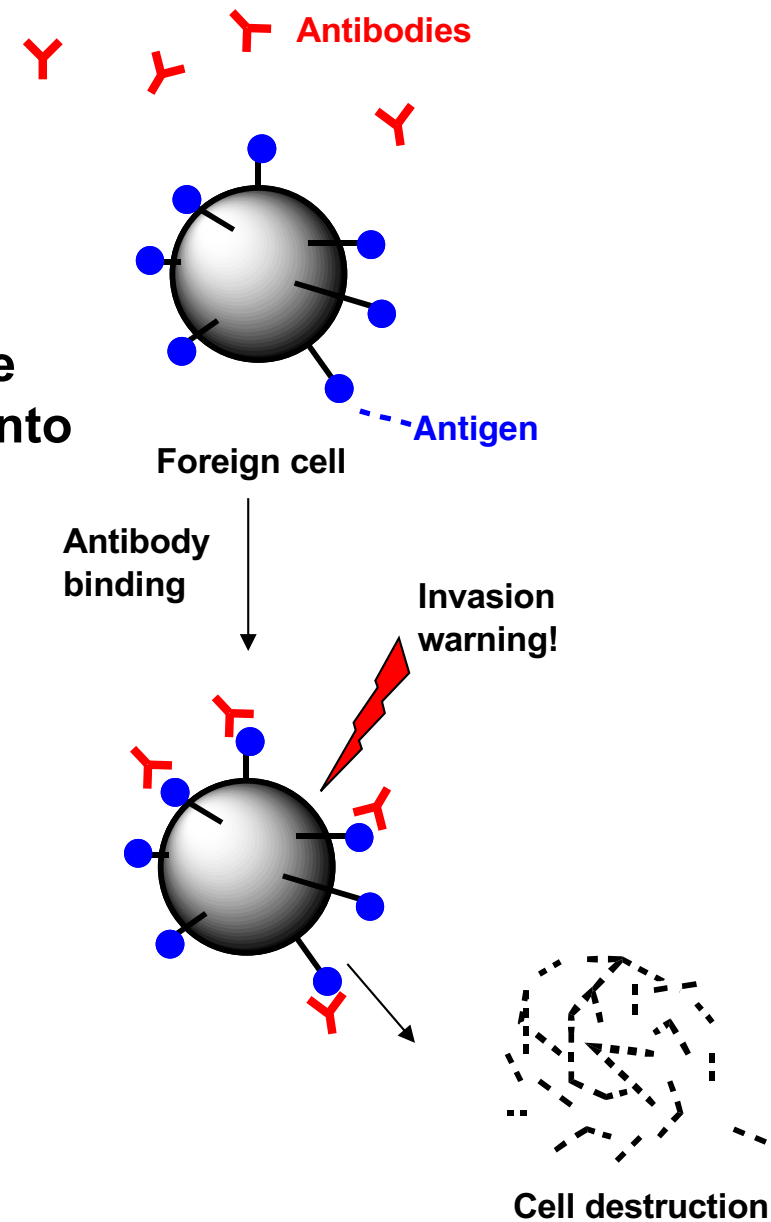
Carboidrati della superficie cellulare  
Antigeni e molecole di riconoscimento

## Acidi nucleici

DNA  
RNA

## Proteine

Enzimi  
Proteine di trasporto  
Proteine strutturali (tubulina)  
Recettori



# Target di farmaci

## Lipidi

Lipidi della membrana cellulare

## Carboidrati

Carboidrati della superficie cellulare  
Antigeni e molecole di riconoscimento

## Acidi Nucleici

**DNA**

**RNA**

## Proteine

Enzimi

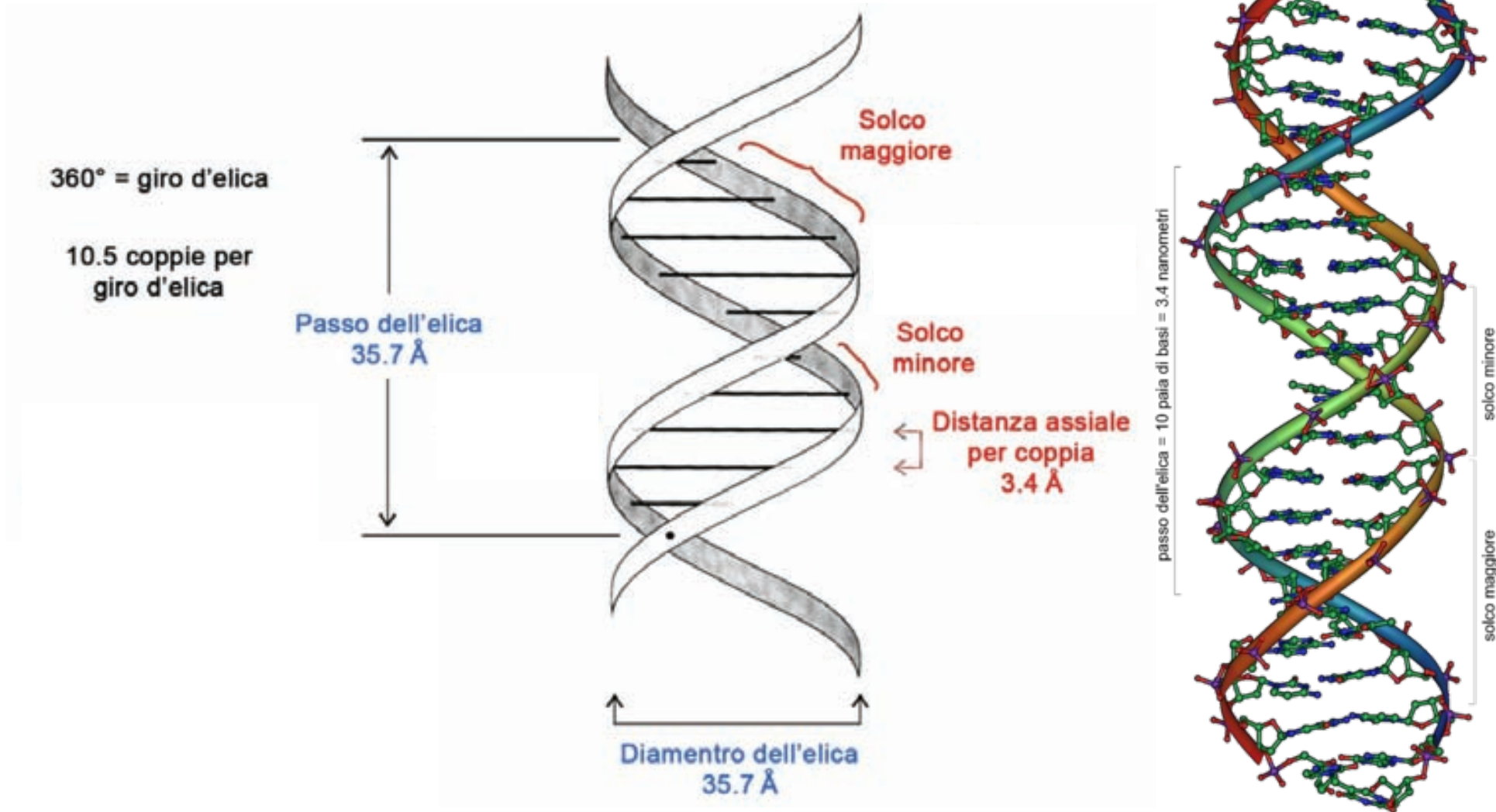
Proteine di trasporto

Proteine strutturali (tubulina)

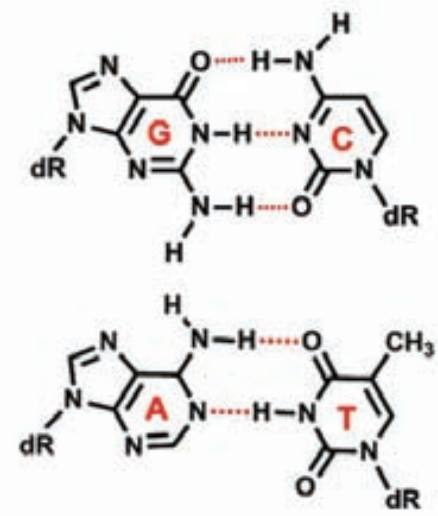
Recettori

# Target di farmaci: Acidi Nucleici

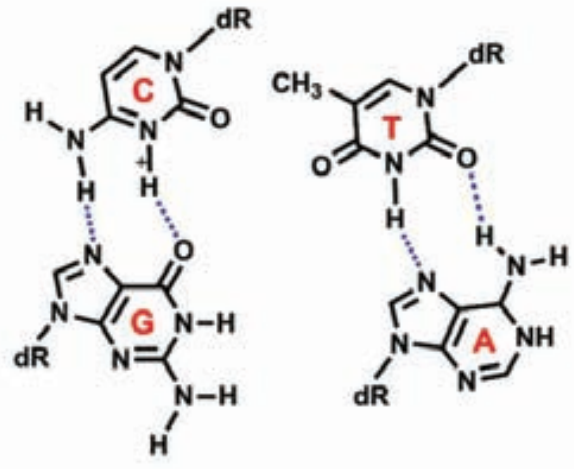
# Doppia elica



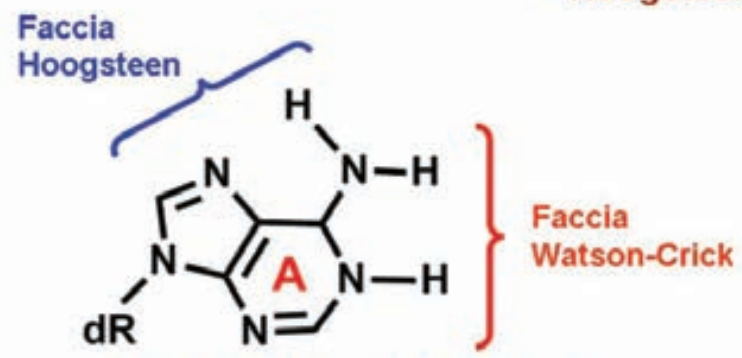
# Tripla elica



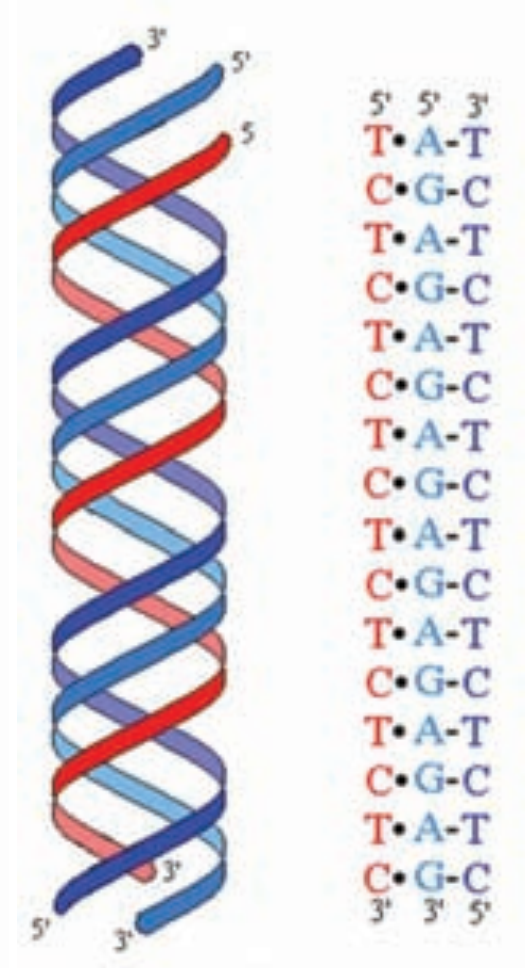
Accoppiamenti "Watson-Crick"



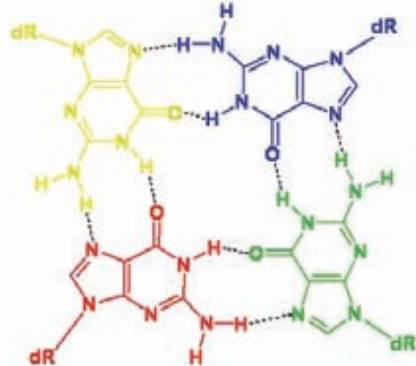
Accoppiamenti "Hoogsteen"



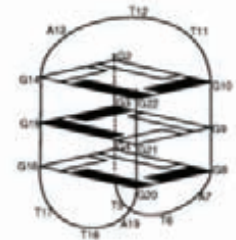
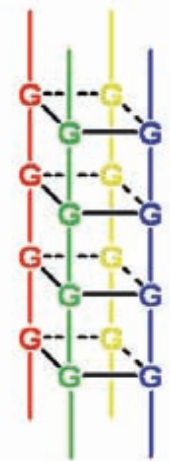
La "double face" dell'Adenina



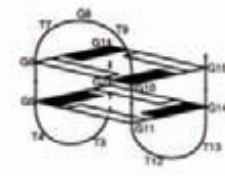
# Quadruplex



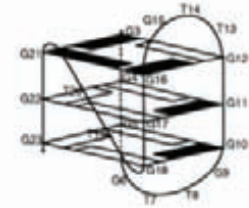
**Quartetto di G**



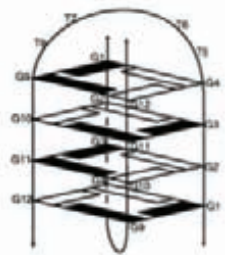
**monomolecolare anti-parallela**



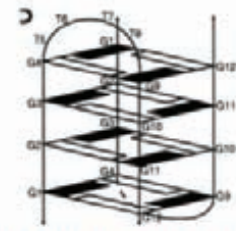
**monomolecolare anti-parallela**



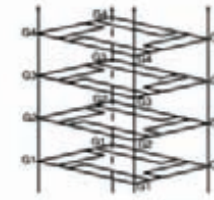
**monomolecolare mista**



**bimolecolare anti-parallela**



**bimolecolare anti-parallela**



**tetramolecolare parallela**

# Meccanismi dei farmaci a livello di AN

Agenti intercalanti

(Veleni delle Topoisomerasi)

Agenti alchilanti

Agenti metallanti

Chain cutters

Chain terminators

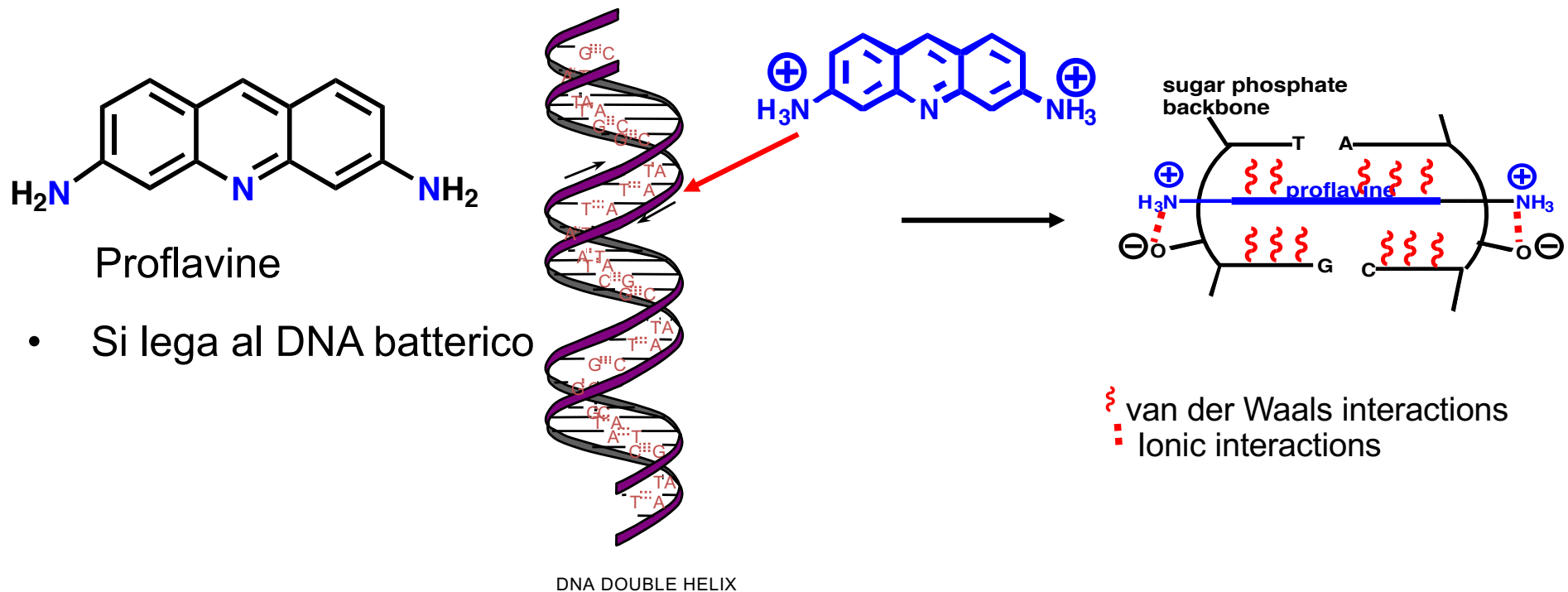
Controllo della trascrizione genetica



## Agenti intercalanti

### Meccanismo d'azione

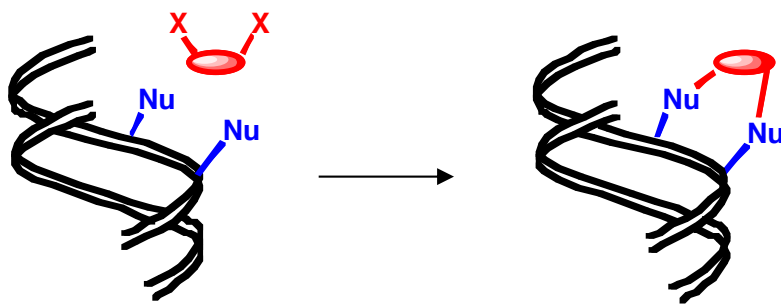
- Sistemi ad anello planari aromatici o eteroaromatici
- Intercalazione a livello di coppie di basi
- Disturbo della forma dell'elica
- Intercalazione preferenziale o per il solco minore o per il solco maggiore
- Blocco di replicazione e trascrizione
- Possibile inibizione della topoisomerasi



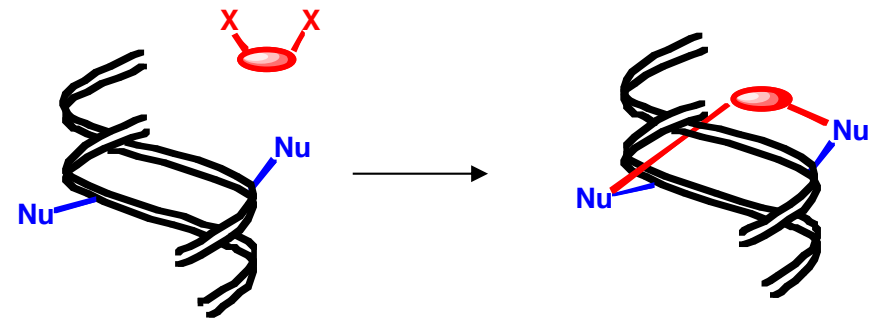


Cross linking

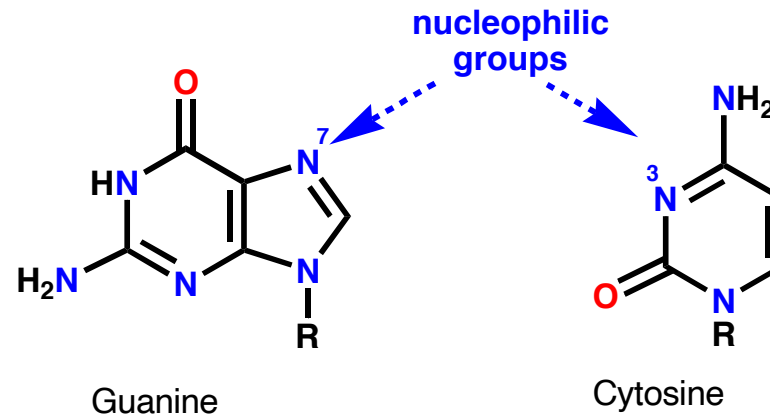
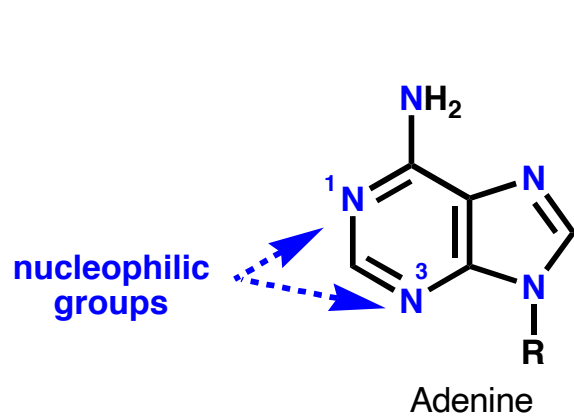
Agenti alchilanti



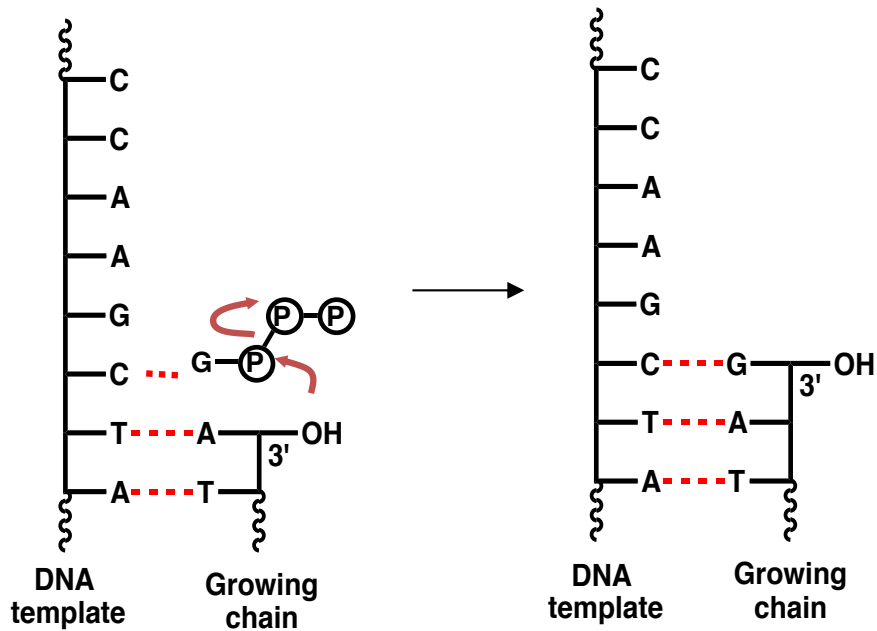
Intra-strand cross linking



Inter-strand cross linking

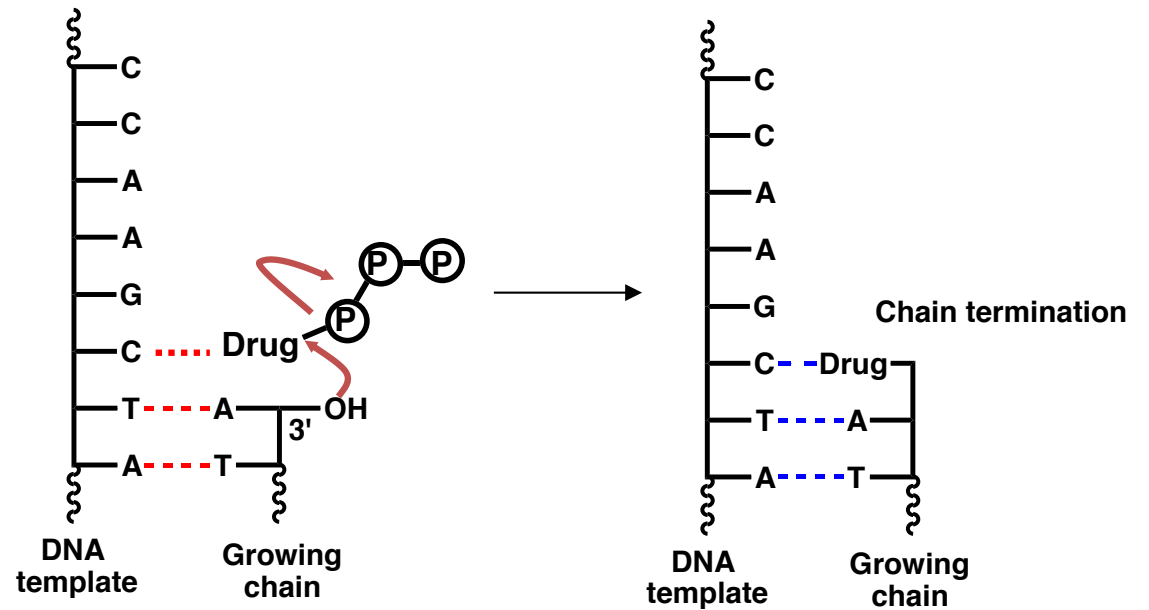


a) Normale replicazione



Chain terminators

b) Blocco della catena



# Target di farmaci

## Lipidi

Lipidi della membrana cellulare

## Carboidrati

Carboidrati della superficie cellulare  
Antigeni e molecole di riconoscimento

## Acidi Nucleici

DNA  
RNA

## Proteine

**Proteine di trasporto**  
**Proteine strutturali (tubulina)**  
**Enzimi**  
**Recettori**

# Target di farmaci: PROTEINE di TRASPORTO e STRUTTURALI

## Proteine di Trasporto

Molti farmaci attraversano le membrane biologiche mediante **diffusione passiva**: le molecole si muovono spontaneamente da una zona di maggiore concentrazione a una con concentrazione inferiore, con una velocità che dipende dal gradiente di concentrazione attraverso la membrana.

Alcune sostanze **endogene** invece utilizzano i **sistemi di trasporto** e il processo è definito come **attivo**. Per questo tipo di trasporto, le membrane hanno sistemi proteici specifici che "riconoscono" il prodotto da trasportare.

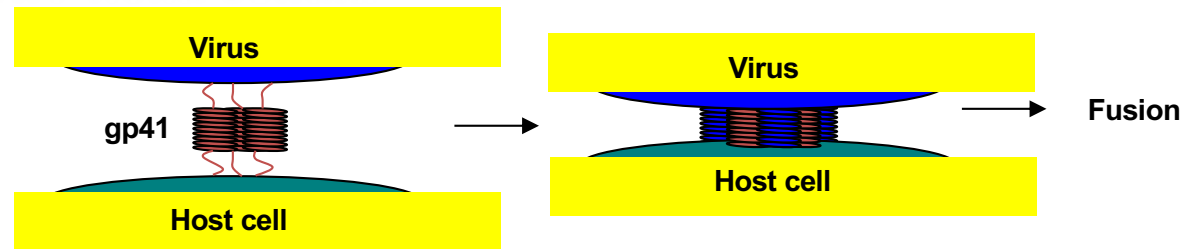
Il **trasporto attivo** differisce dalla diffusione passiva poiché può avvenire **contro gradiente di concentrazione**; tuttavia, il sistema di trasporto presenta limite di carico e specifica affinità strutturale per le sostanze da trasportare: sostanze esogene, strutturalmente simili a quelle endogene, possono legarsi al trasportatore, causando fenomeni di competizione che possono ridurre la sua efficacia.

Sfruttando questa competizione, un farmaco può esercitare la sua azione influenzando il trasporto di molecole endogene attraverso la membrana cellulare. La proteina di trasporto diventa allora il **bersaglio farmacologico**.

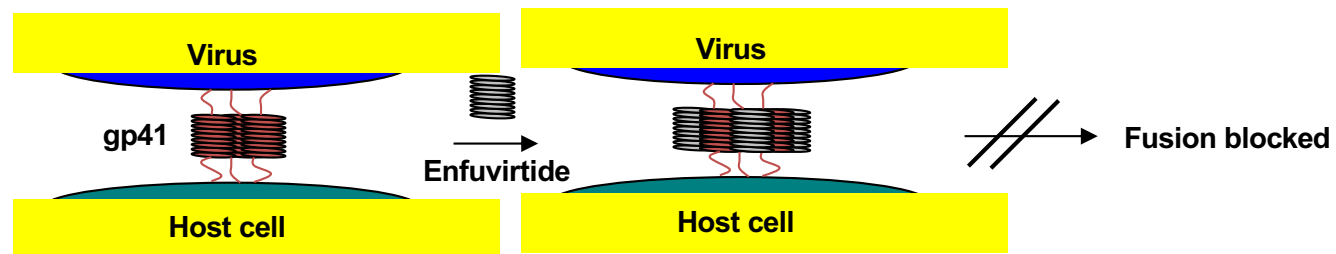
# Proteine Strutturali

## Proteine strutturali virali

### Ingresso dell'HIV nella cellula



### Blocco della fusione



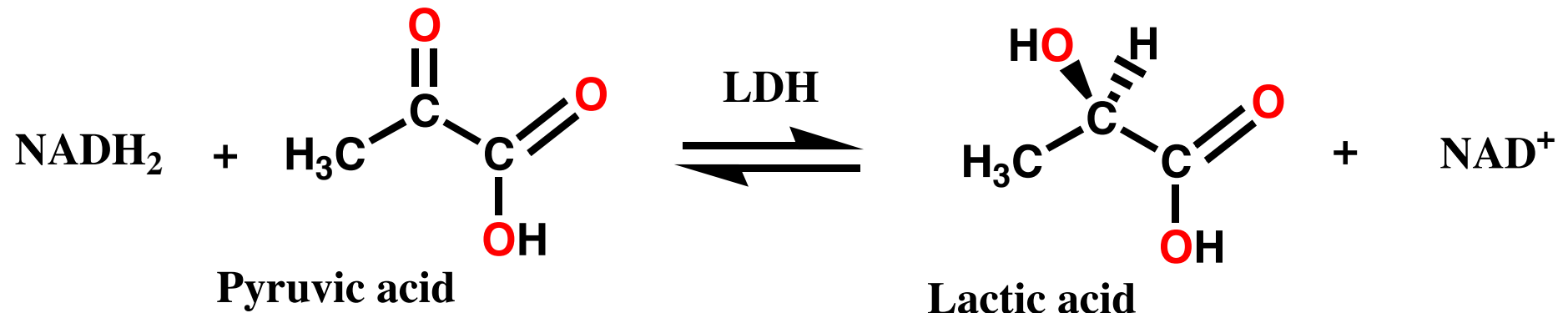
Enfuvirtide: polipeptide di 36 amminoacidi

- Usato vs. HIV dal 2003
- Agisce come inibitore della fusione
- Interagisce con parte della **proteina virale** (gp41)
- Lega la gp41 e impedisce il processo di fusione

# Target di farmaci: Enzimi

# Struttura e funzione degli Enzimi

- Proteine globulari che fungono da catalizzatori
- Più veloce raggiungimento dell'equilibrio della reazione
- Minore energia di attivazione



LDH = Lattato deidrogenasi (enzime)

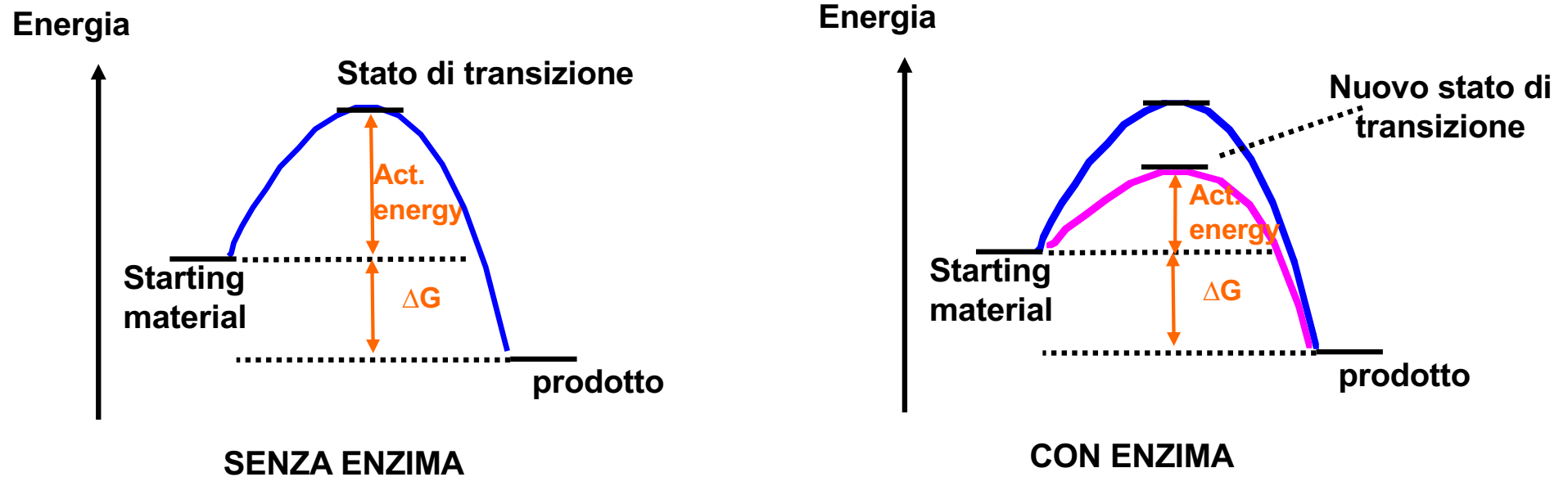
NADH<sub>2</sub> = Nicotinamide adenosine dinucleotide (agente riducente & cofattore)

Acido piruvico = Substrate



# Struttura e funzione degli Enzimi

Diminuzione dell'energia di attivazione di una reazione



**Enzimi: abbassano l'energia di attivazione della reazione ma il  $\Delta G$  resta uguale**

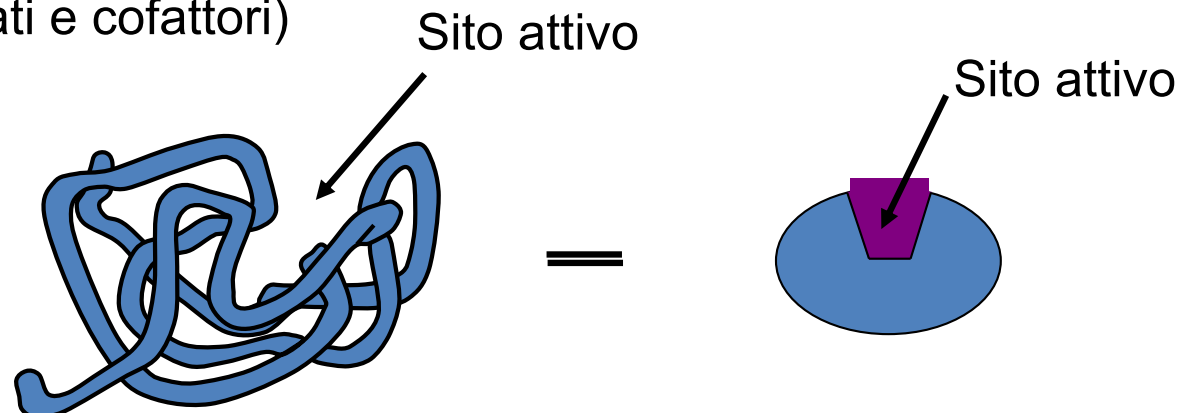
# Struttura e funzione degli Enzimi

## Caratteristiche degli enzimi

- Presentano una superficie “di reazione” (il sito attivo)
- Forniscono un ambiente idoneo (idrofobico)
- Posizionano i reagenti correttamente affinché possa avvenire la reazione
- Indeboliscono i legami nei reagenti
- Portano a catalisi acida / basica
- Forniscono gruppi nucleofili

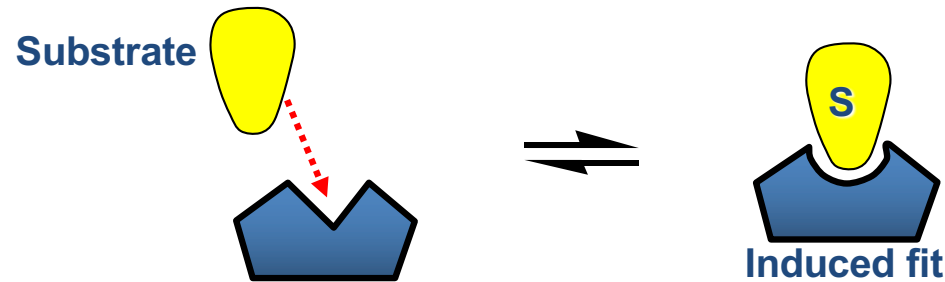
## Sito attivo

- Cavità o fessura idrofobica sulla superficie dell'enzima
- Accetta reagenti (substrati e cofattori)
- Contiene amminoacidi che
  - legano i reagenti (substrati e cofattori)
  - catalizzano la reazione



# Legame del substrato

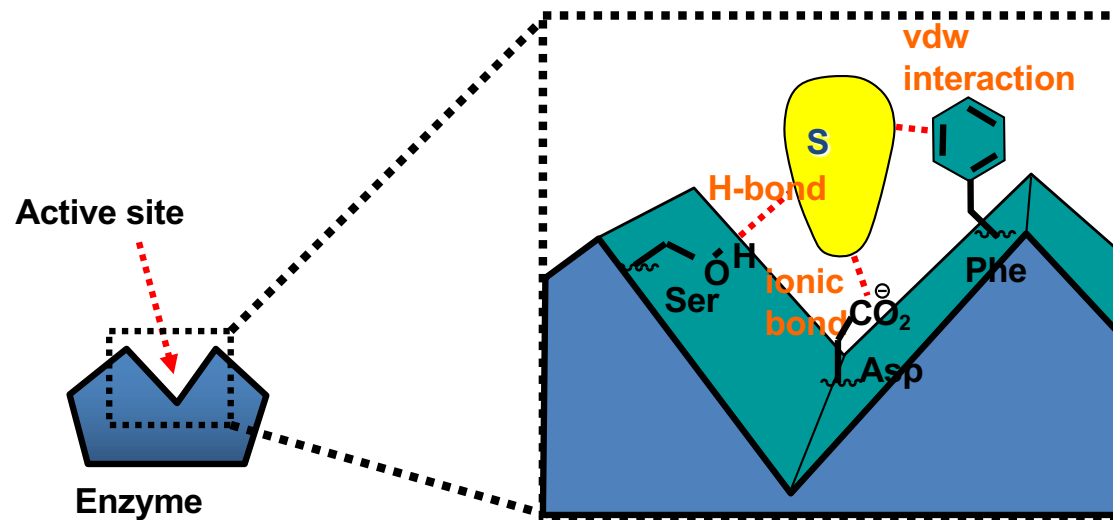
## Induced fit



- Il sito attivo presenta una forma adatta per interagire con il substrato
- Il binding altera la forma dell'enzima (induced fit)
- Il binding varia la lunghezza dei legami del substrato
- Il binding coinvolge legami intermolecolari tra gruppi funzionali del substrato e del sito attivo

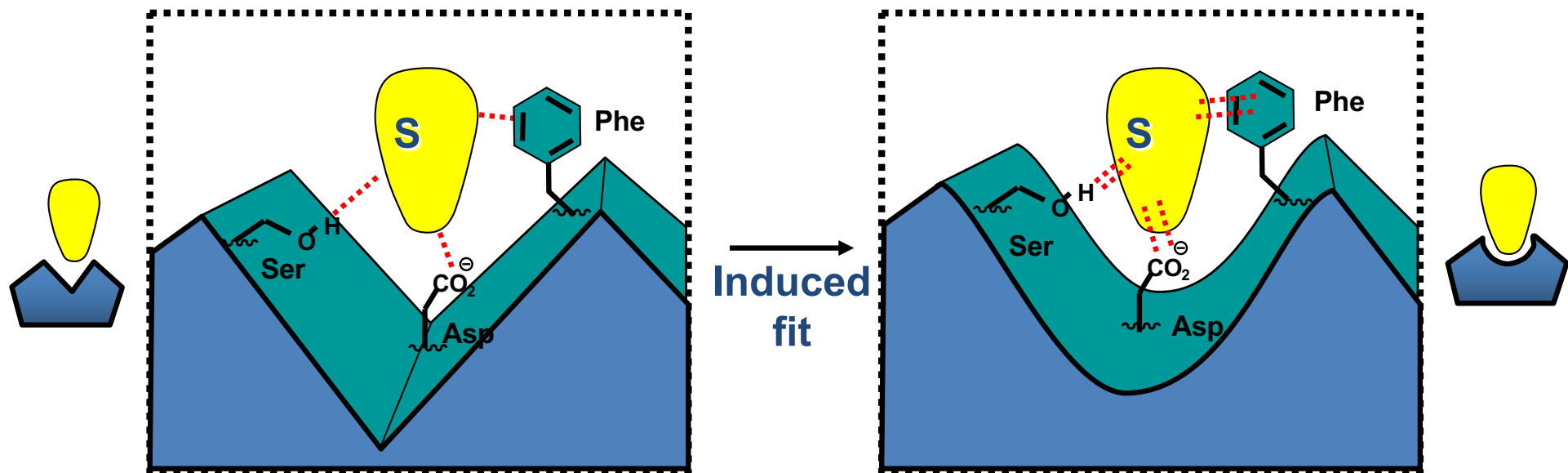
## Forze di legame

- Ioniche
- Legami H
- van der Waals



# Legame del substrato

- Induced fit – Il sito attivo altera la struttura per massimizzare le interazioni intermolecolari



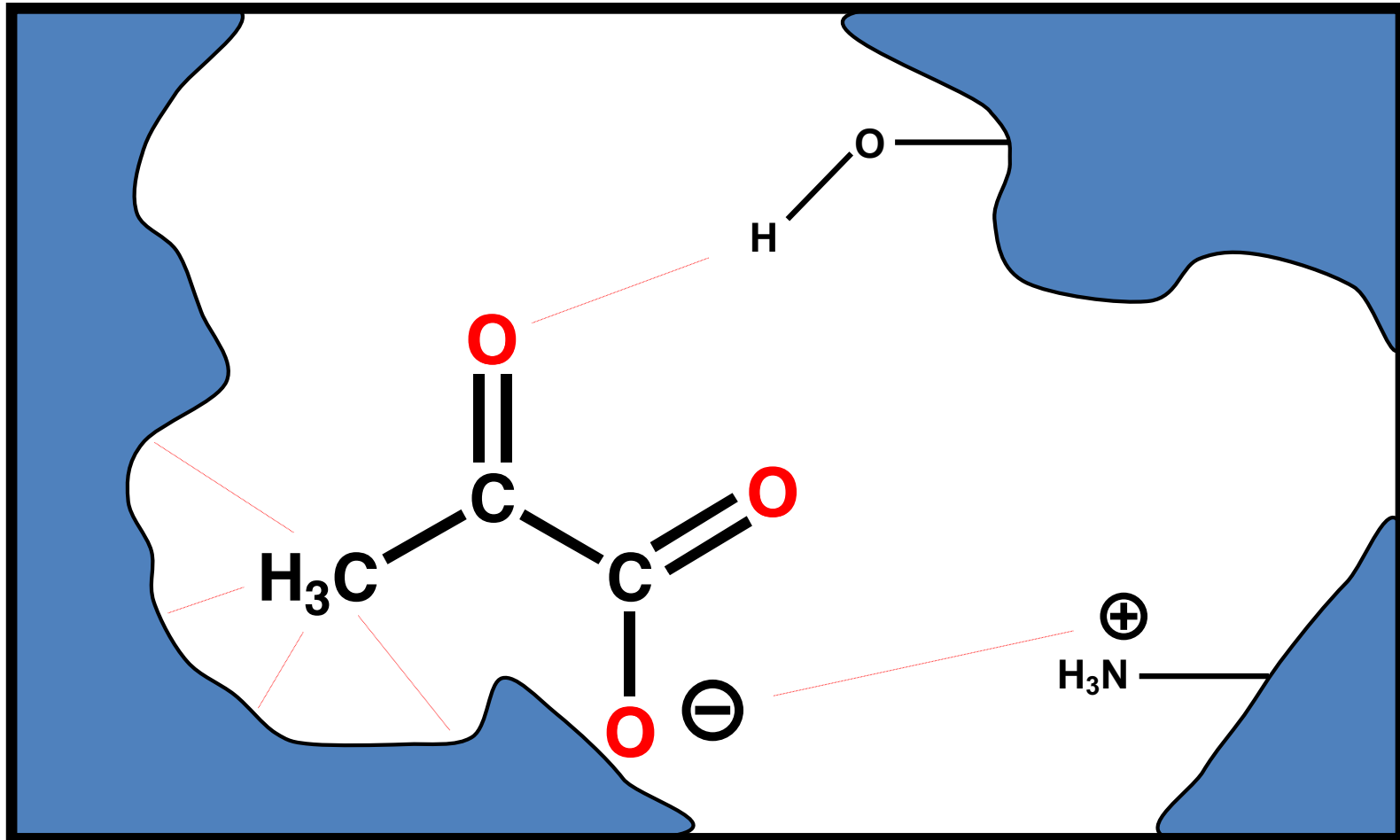
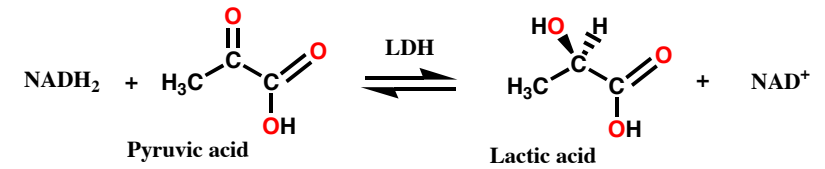
Legami intermolecolari di lunghezza non ottimale per il legame

Lunghezze di legame intermolecolare ottimizzate

Variazione della lunghezza dei legami nel substrato, che possono essere facilmente scissi

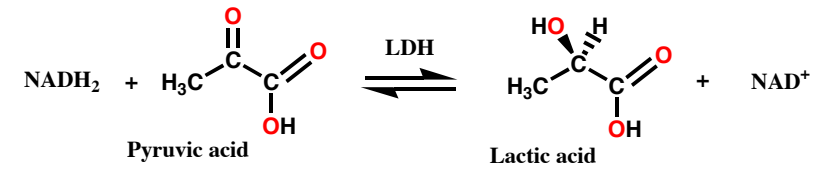
# Legame del substrato

Acido piruvico nella LDH

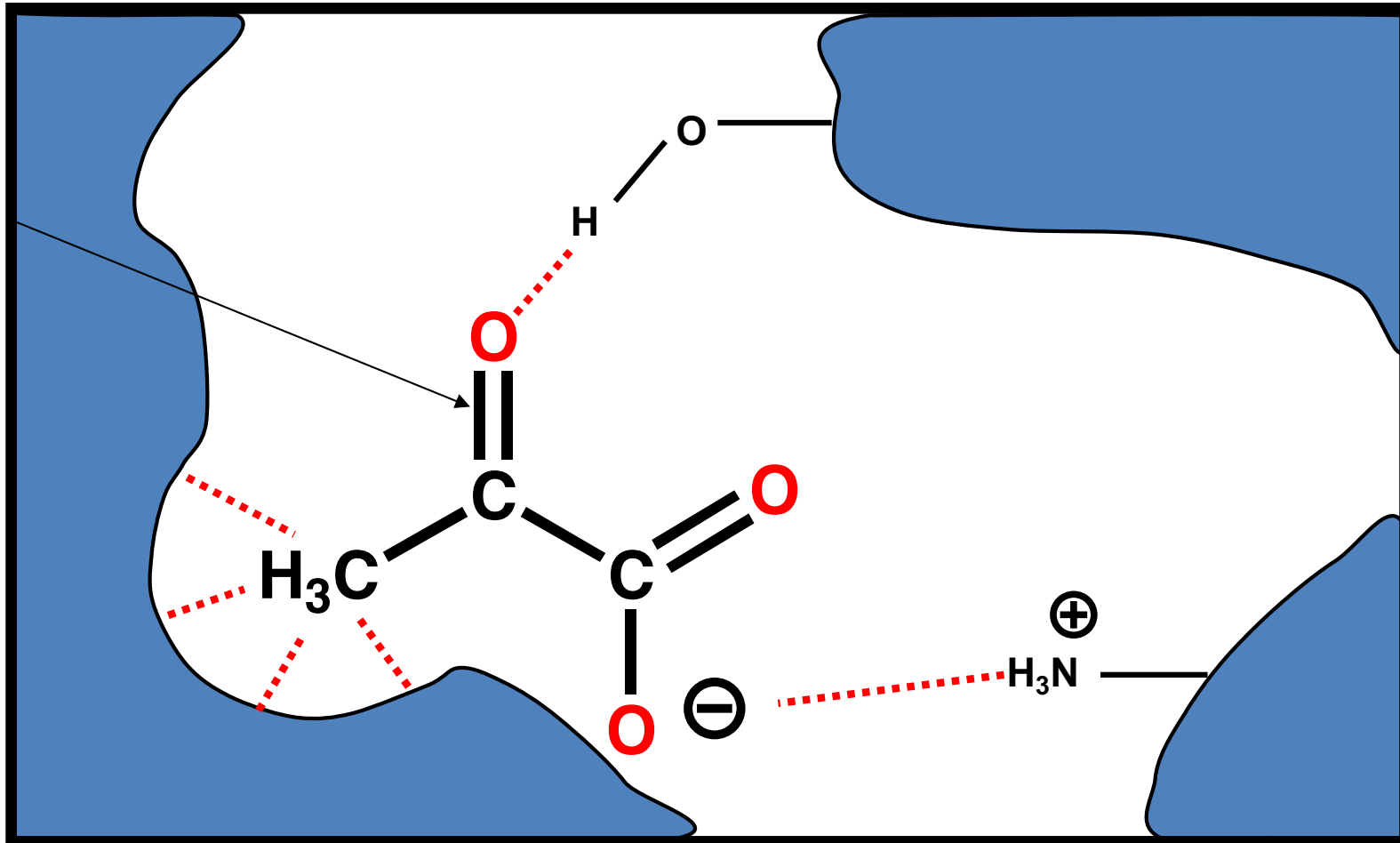


# Legame del substrato

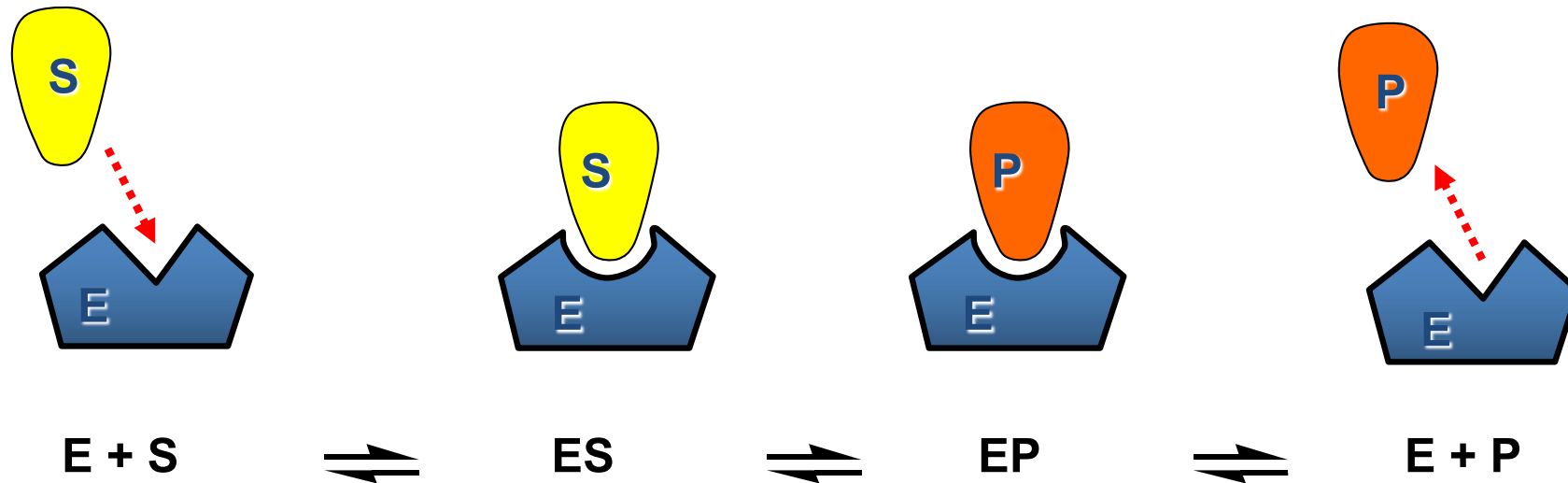
Acido piruvico nella LDH



Legame  $\pi$   
indebolito



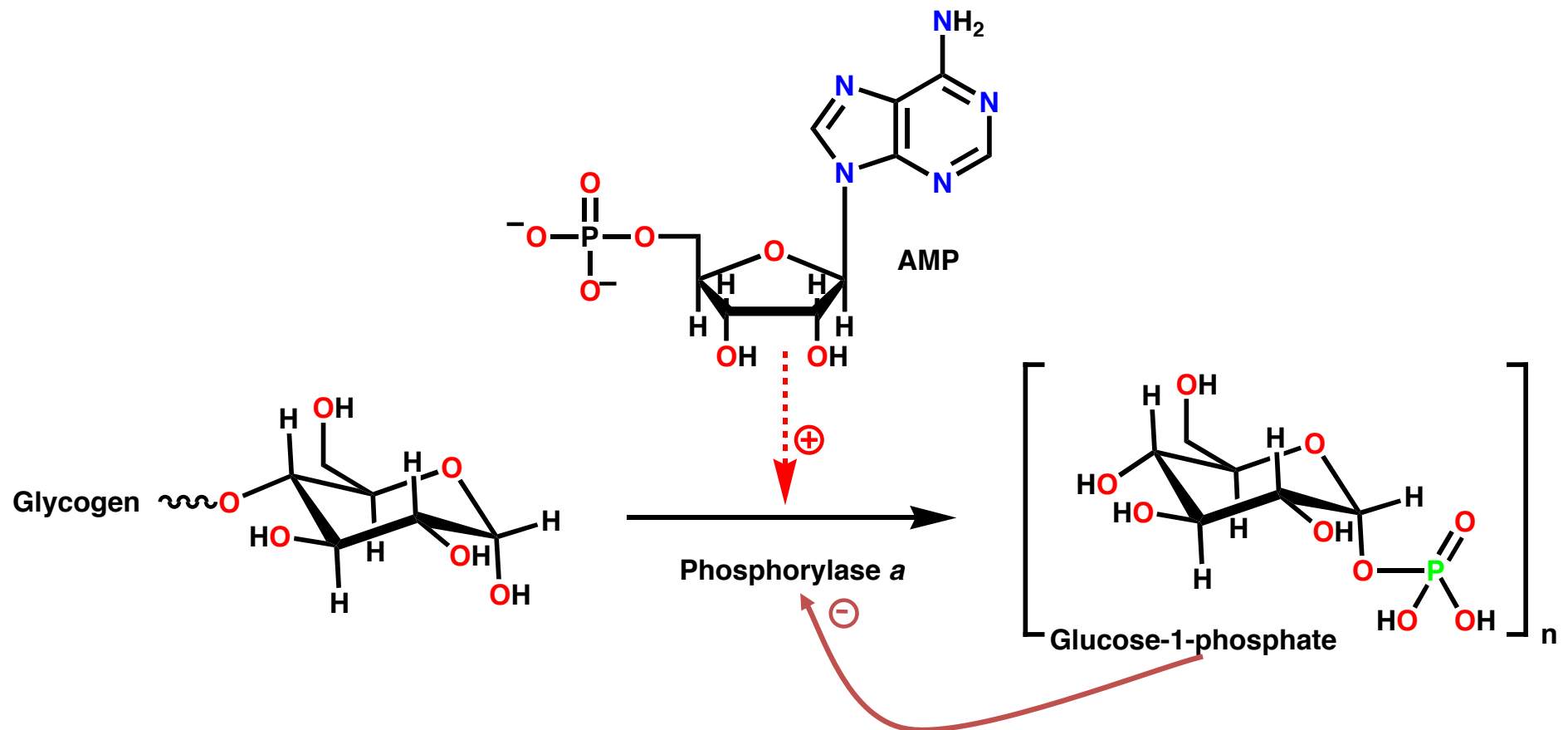
# Processo di catalisi enzimatica



- Interazioni di legame abbastanza forti per legare il substrato sufficientemente a lungo affinché la reazione avvenga
- Interazioni sufficientemente deboli da consentire al prodotto di staccarsi
- Delicato equilibrio
- La progettazione di molecole con forti interazioni di legame risulta nella preparazione di inibitori enzimatici che bloccano il sito attivo

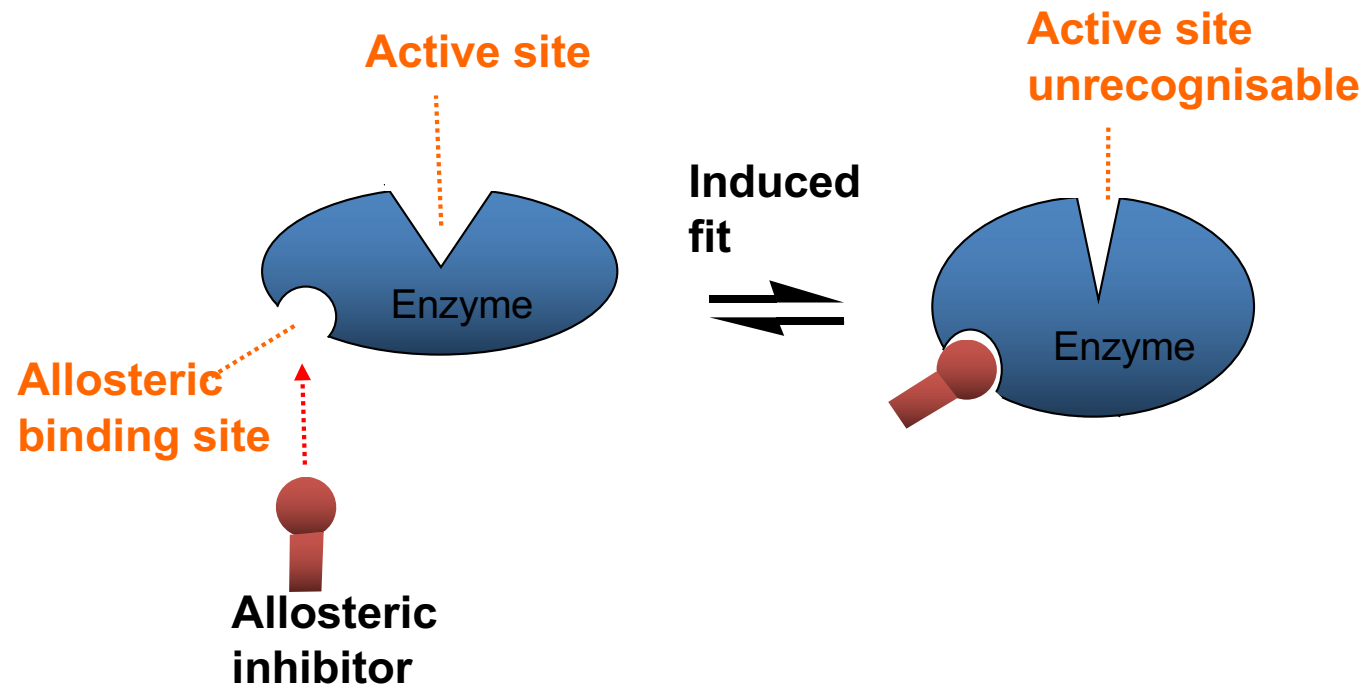
# Regolazione enzimatica

- Molti enzimi sono regolati da agenti presenti nella cellula
- La regolazione può incrementare o inibire l'attività dell'enzima
- I prodotti di alcuni enzimi possono agire quali inibitori
- Questi in genere si legano a un sito detto sito allosterico



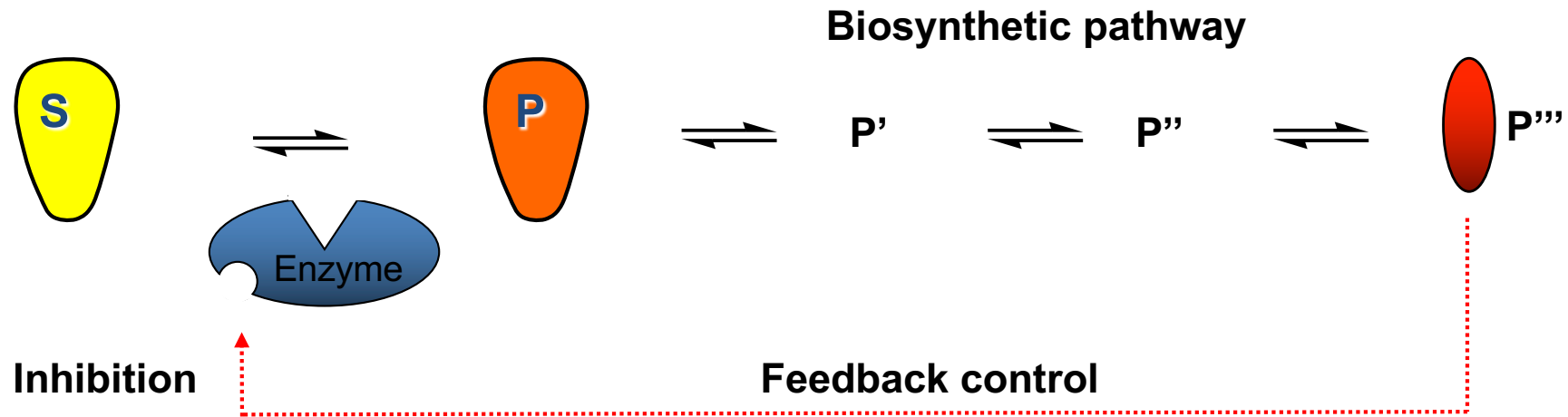


# Regolazione enzimatica



- **Inibitore allosterico**: si lega reversibilmente a un sito di legame allosterico
- Si formano legami intermolecolari
- L'induced fit altera la struttura dell'enzima
- Il sito attivo è distorto e non viene riconosciuto dal substrato
- Una crescente concentrazione del substrato non elimina l'inibizione
- La struttura dell'inibitore allosterico non è simile a quella del substrato

# Regolazione enzimatica



- Enzimi con siti allosterici spesso sono i primi nella catena di un processo biosintetico che coinvolge più passaggi (e più enzimi)
- L'enzima è controllato dal prodotto finale del processo
- Il prodotto finale lega il sito allosterico dell'enzima, inibendolo
- ISOenzimi

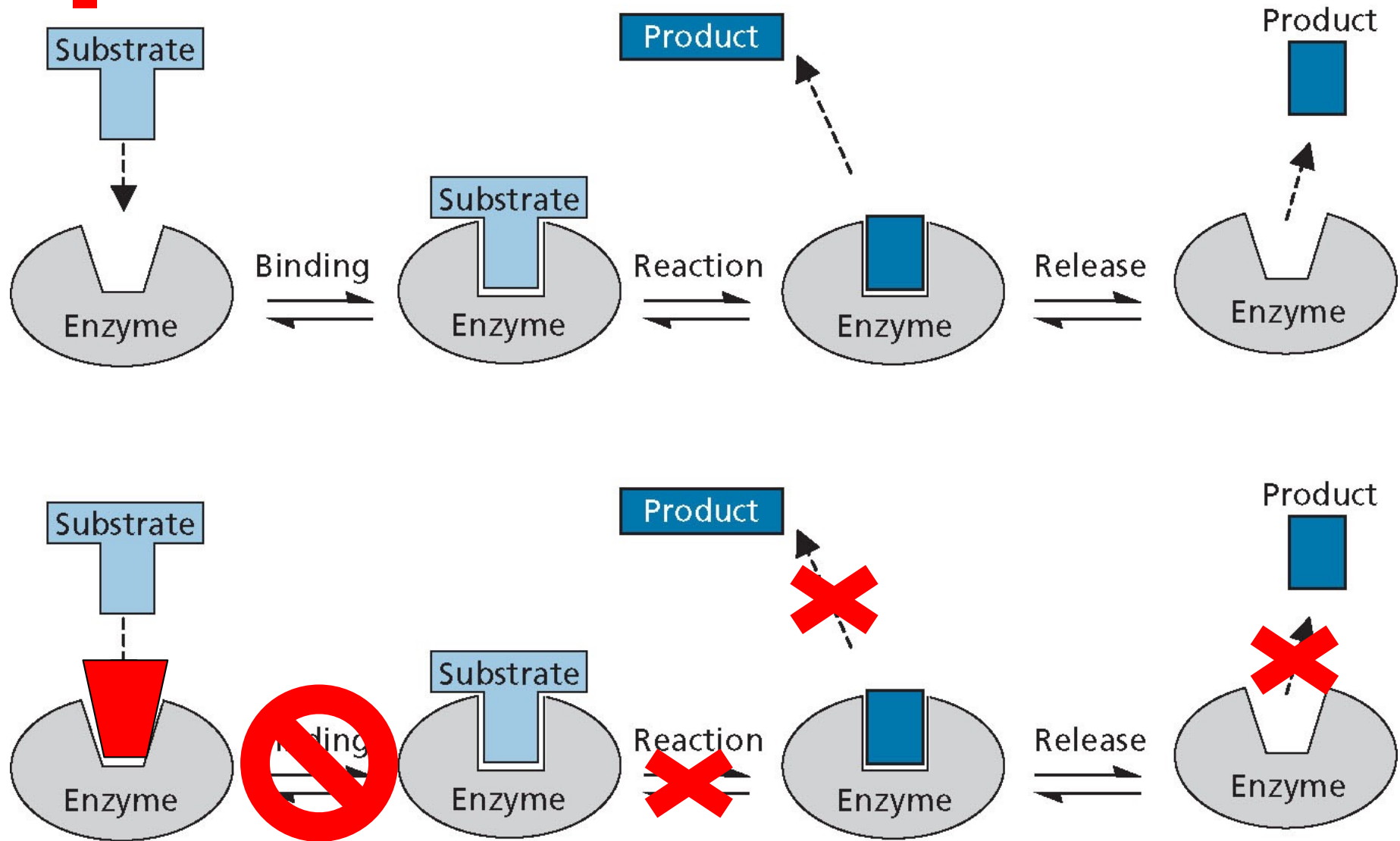
# Inibitori

## Competitivi

Gli inibitori competitivi si legano al sito attivo dell'enzima mediante legami intermolecolari e il binding è reversibile, permettendo un equilibrio tra il composto legato e quello libero – una specie di effetto 'yoyo' in cui il composto si lega al sito attivo, viene rilasciato, si rilega.

Questo significa che l'inibizione causata dal composto è reversibile.

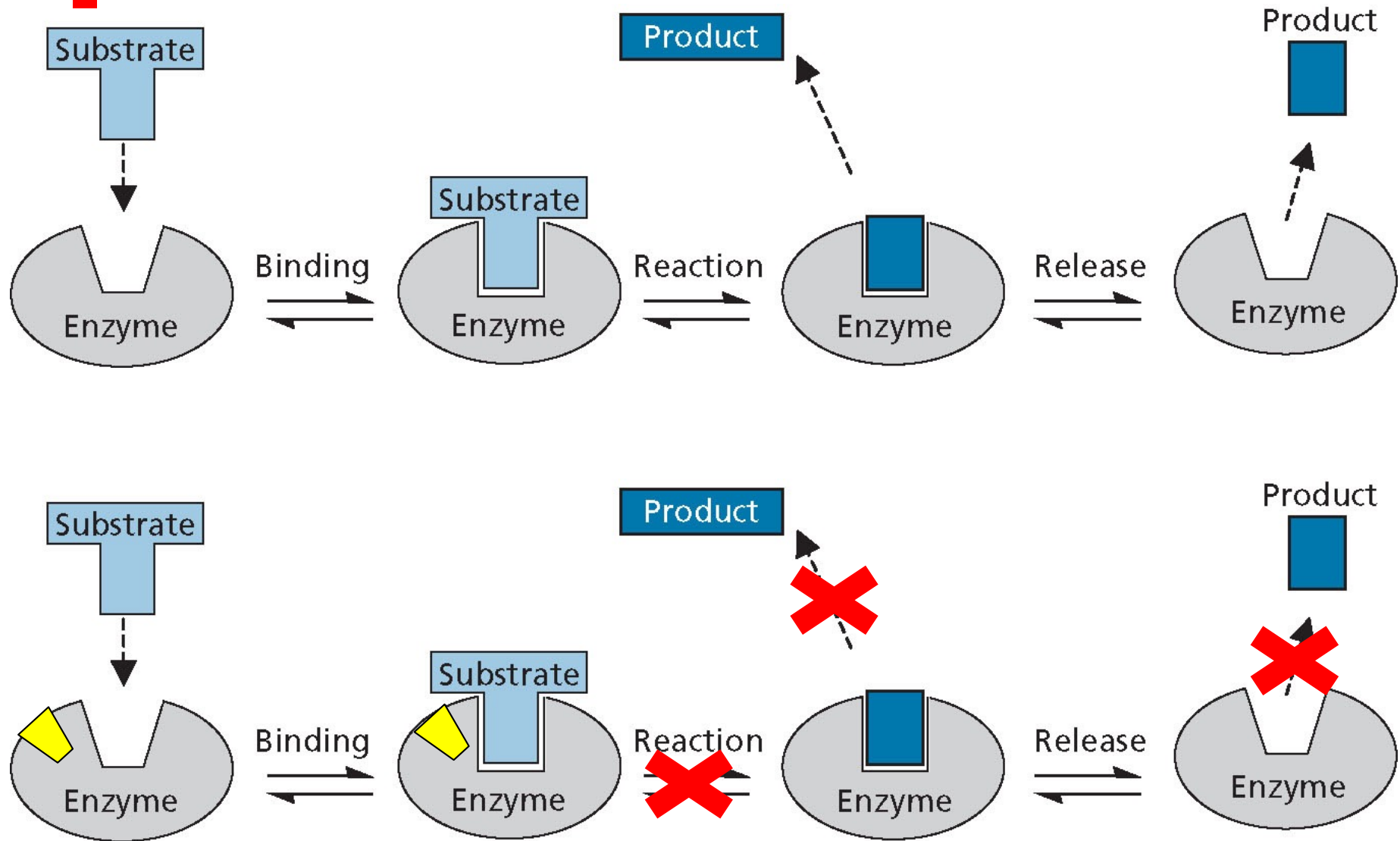
Se la concentrazione del substrato aumenta, quest'ultimo compete per il sito attivo con maggiore efficacia con l'inibitore e l'inibizione del farmaco è meno efficace.



# Inibitori

Alcuni inibitori legano il sito attivo, ma non sono in concorrenza con il substrato: il sito attivo di qualche enzima può legare, oltre al substrato, un cofattore enzimatico.

Pertanto, è possibile avere inibitori che si legano alla regione del sito attivo occupato dal cofattore e competere con esso, piuttosto che con il substrato.



# Inibitori

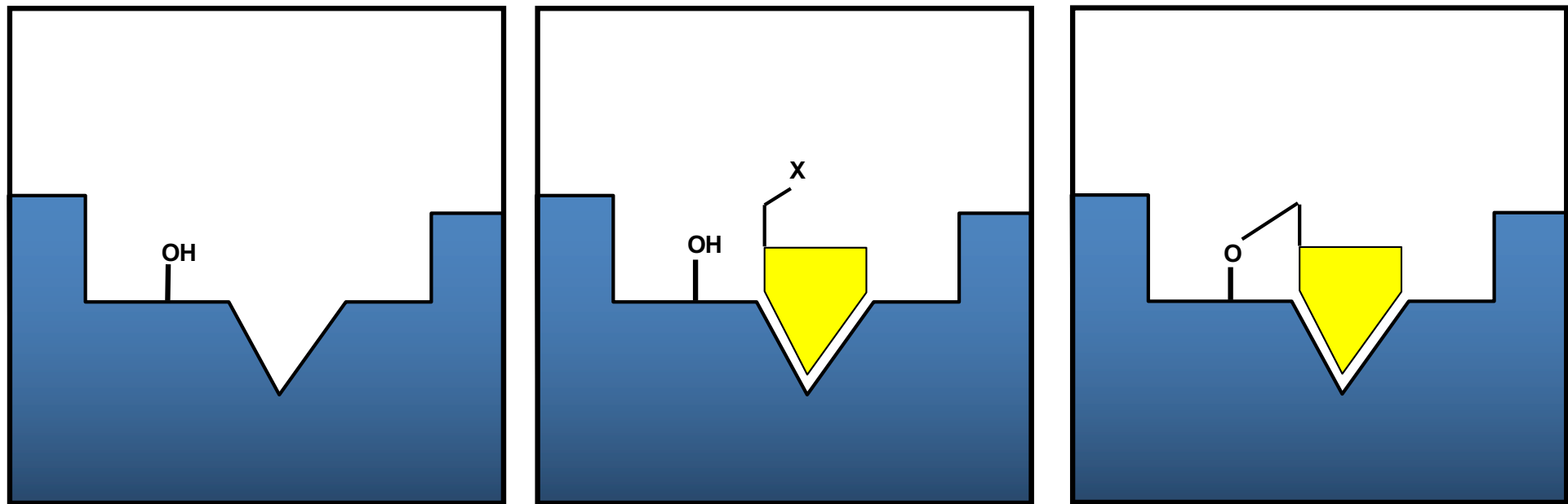
## Irreversibili

Ci sono alcuni inibitori enzimatici che **legano irreversibilmente il sito attivo** dell'enzima e lo bloccano permanentemente.

Gli inibitori irreversibili più efficaci sono quelli che possono reagire con un amminoacido nel sito attivo formando un legame covalente.

Gli inibitori irreversibili **non** sono competitivi!

**L'aumento della concentrazione di substrato non porta al ripristino dell'attività, poiché essi non possono essere spiazzati dal sito attivo.**



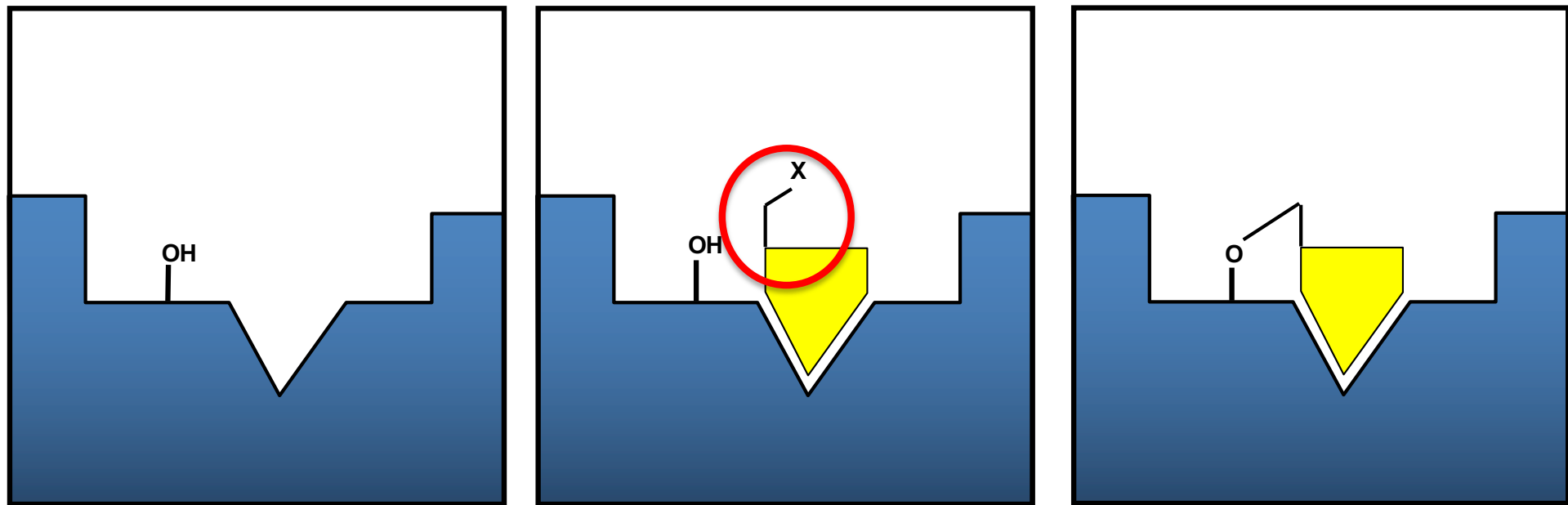
# Inibitori

## Suicidi

Gli inibitori suicidi sono agenti che vengono **convertiti a specie altamente reattive** quando subiscono **una reazione catalizzata dall'enzima**.

Essi formano legami covalenti con l'enzima e lo inibiscono irreversibilmente. Tali agenti sono progettati per subire una **trasformazione enzimatica catalizzata che li converte in una specie altamente reattiva che forma un legame covalente al sito attivo**.

Quando questo legame covalente si forma formata il sito attivo non è in grado di legarsi al substrato. Come risultato, **l'enzima viene inibito irreversibilmente**.





# Modulatori

## Allosterici

I farmaci possono essere progettati per mimare il controllo naturale dell'enzima.

Se il farmaco si lega attraverso **interazioni intermolecolari**, l'inibizione è **reversibile**. Se il farmaco contiene un gruppo reattivo che consente di formare un **legame covalente** al sito di legame allosterico, l'inibizione è **irreversibile**.

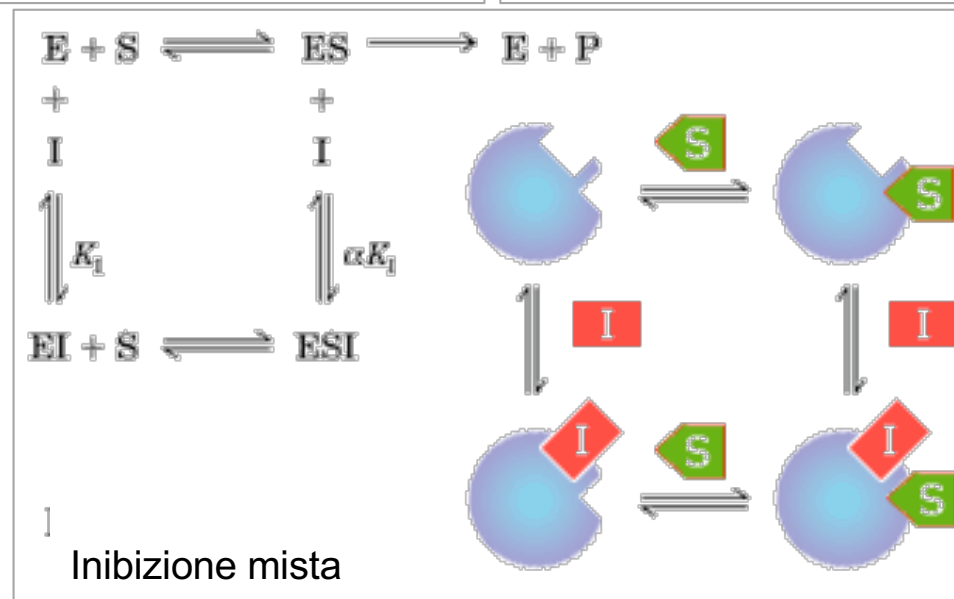
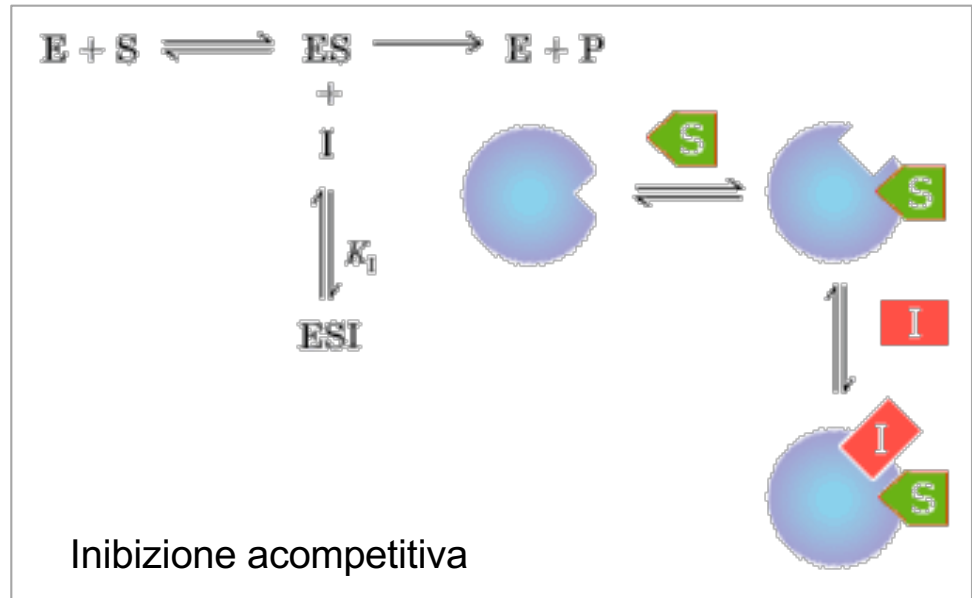
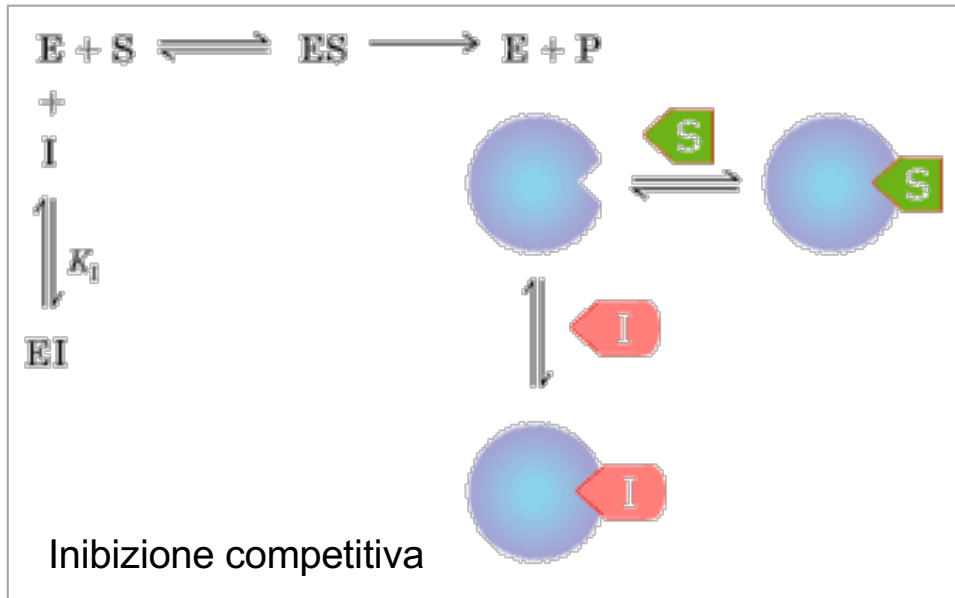
## Acompetitivi

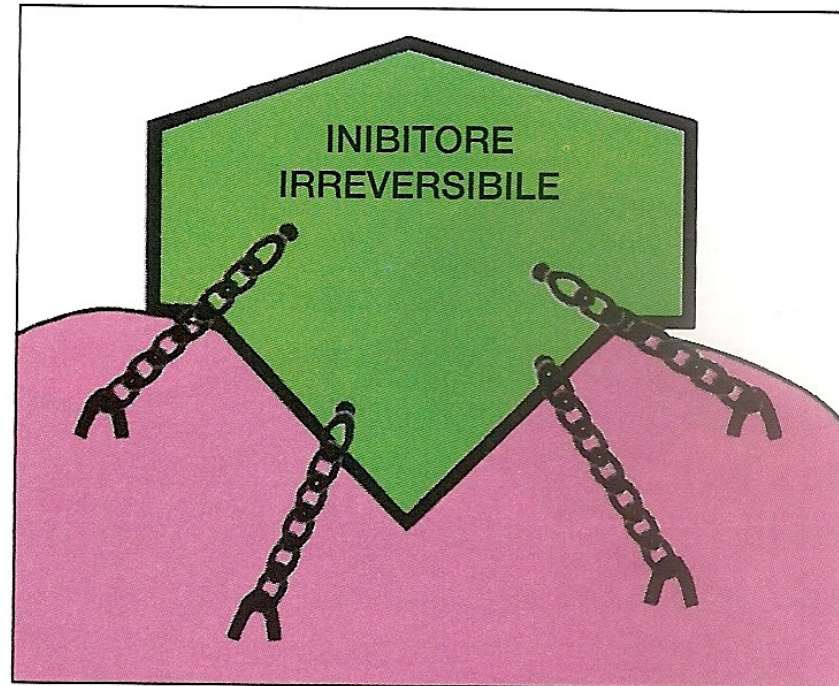
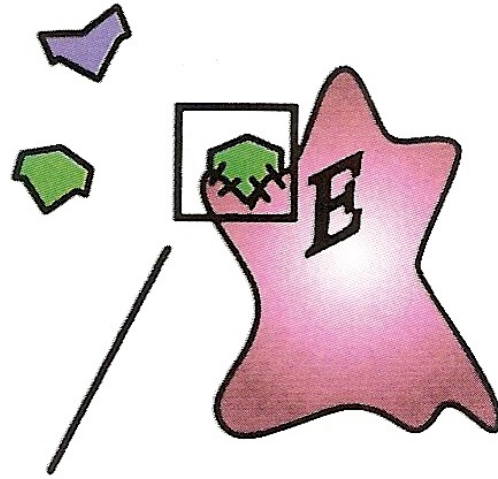
Gli inibitori incompetitivi sono inibitori che possono legarsi solo **reversibilmente** all'enzima quando il substrato è già legato al sito attivo: **si legano al complesso enzima-substrato**.

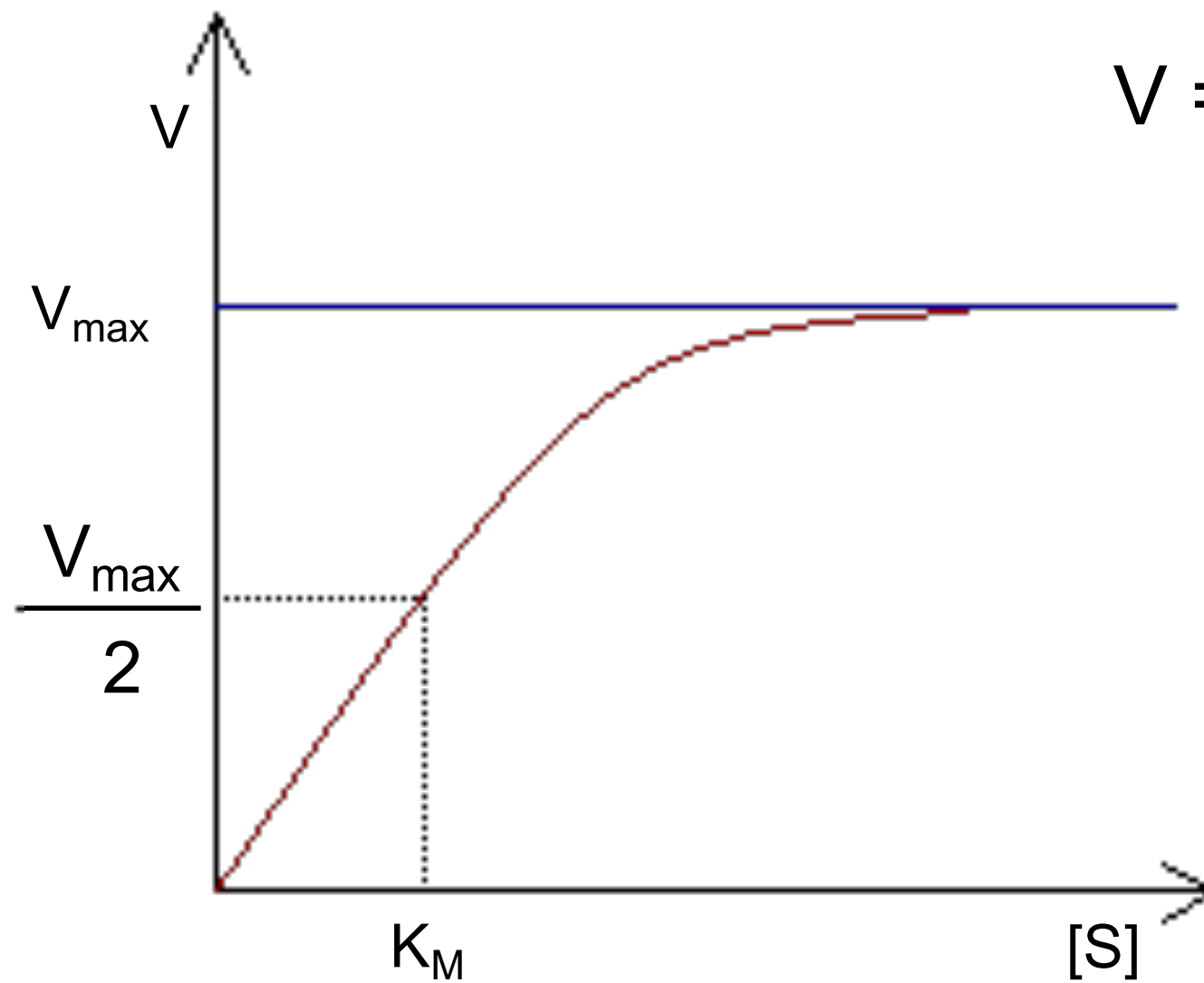
L'aumento della concentrazione del substrato non evita l'inibizione come accade nel caso degli inibitori competitivi.

Il livello di inibizione dipende dalla presenza di una concentrazione di substrato presente per formare il complesso enzima-substrato. Quindi gli **inibitori incompetitivi sono meno efficaci a basse concentrazioni di substrato**. Gli inibitori incompetitivi non sono molto comuni.

# Inibitori





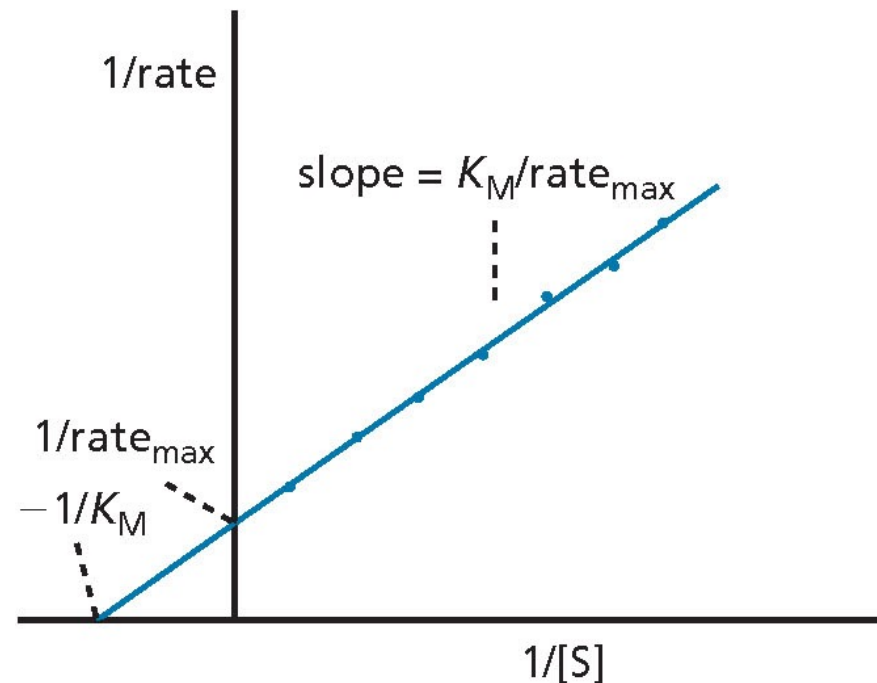


$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

## *Plot dei doppi reciproci* (o Plot di Lineweaver-Burk)

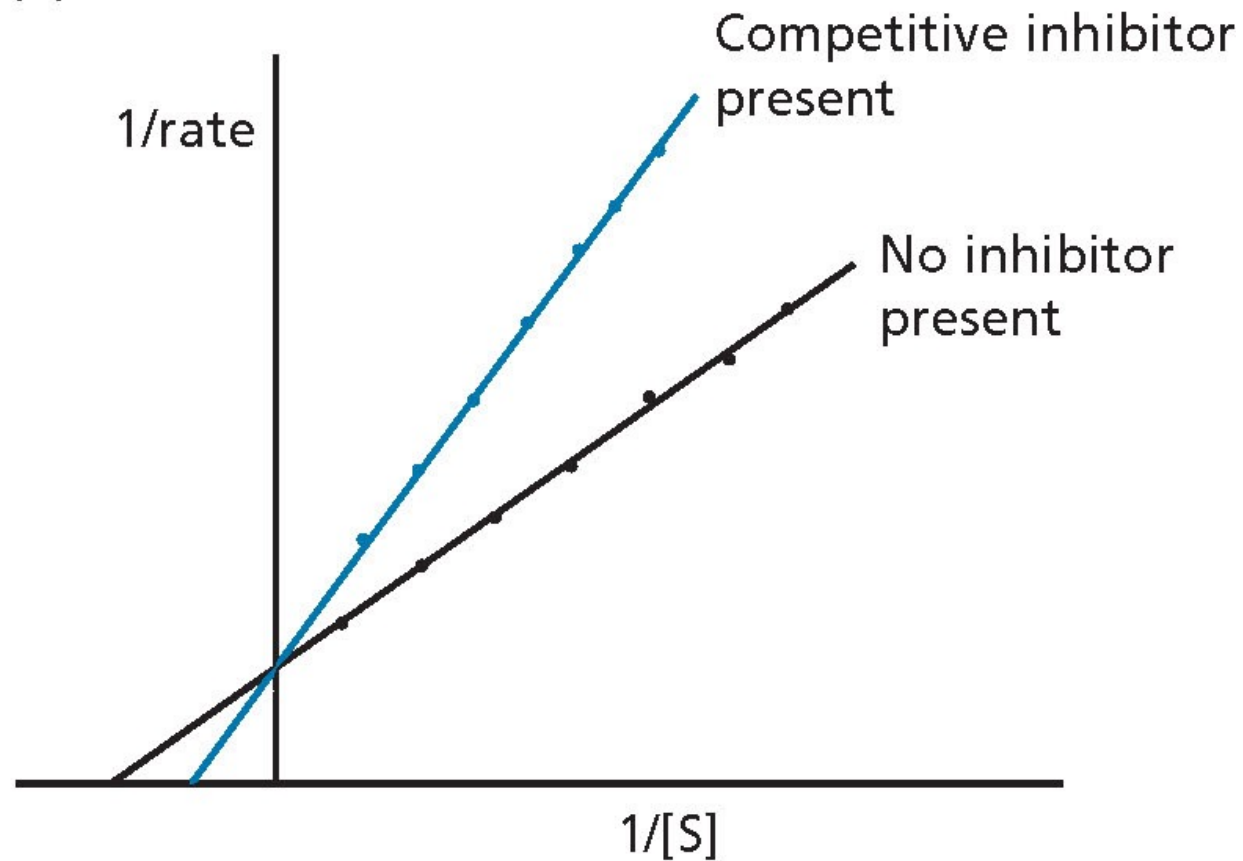
$$\frac{1}{\text{Vel}} = \frac{1}{\text{Vel}_{\text{max}}} + \frac{K_m}{\text{Vel}_{\text{max}} [S]}$$

(a)

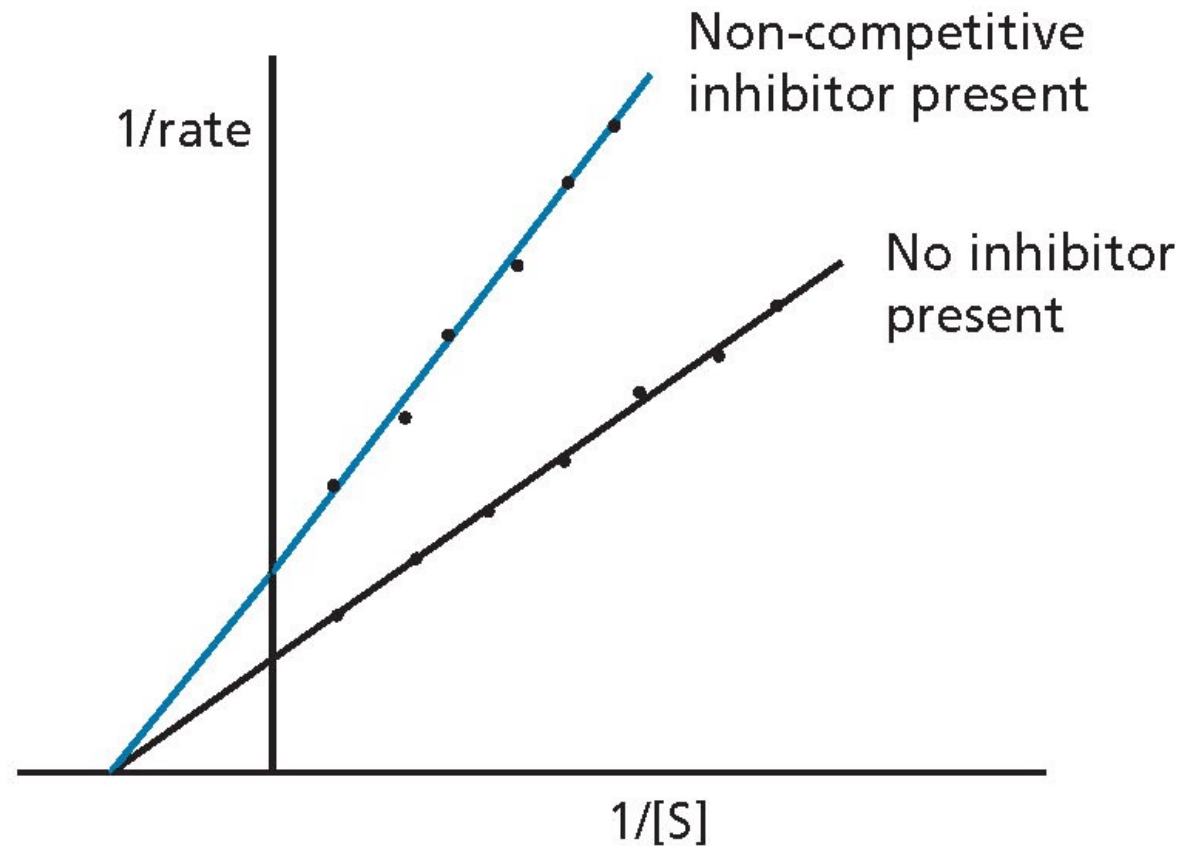


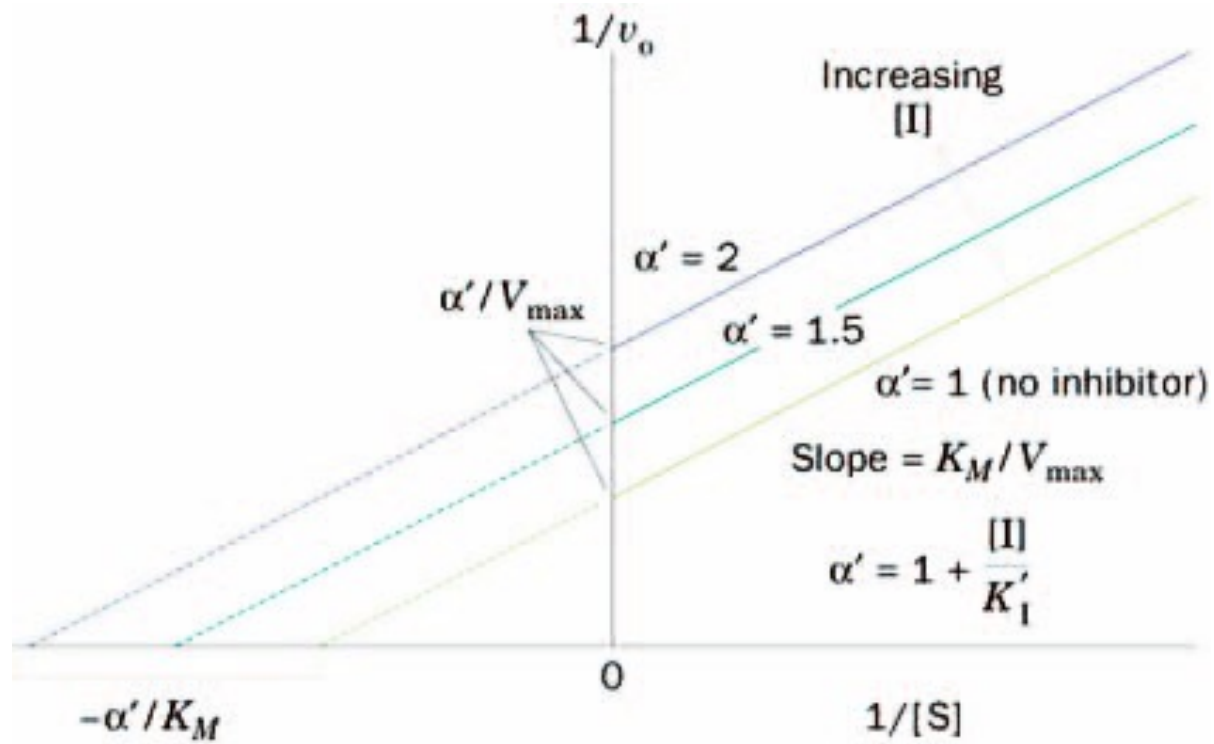
$$\frac{1}{Vel} = \frac{1}{Vel_{max}} + \frac{K_m}{Vel_{max} [S]}$$

(b)



$$\frac{1}{Vel} = \frac{1}{Vel_{max}} + \frac{K_m}{Vel_{max} [S]}$$





Uncompetitive inhibition