

METABOLISMO



ENTITÀ CHIMICHE TRASFERITE AI E/O DAI SUBSTRATI

Funzionalizzazioni (Fase I)		Coniugazioni (Fase II)
Reazioni redox	Idrolisi	Metile
O^\cdot	H_2O	Acido solforico o fosforico
O_2	OH^-	Acido glucuronico e alcuni zuccheri
e^-		Gruppo acetile o altri acili
$2 e^-$		Glicina o altri amminoacidi
H^- (idruro)		Digliceridi o altri lipidi
		Colesterolo o altri steroli
		Gruppo etilico o altri piccoli gruppi alchilici
		<i>β ossidazione</i>
		Allungamento della catena di due atomi di carbonio
		<i>Inversione chirale</i>
		Glutazione
		Composti carbonilici, CO_2

Successiva coniugazione
con il Coenzima A



METABOLISMO

MODALITA' FONDAMENTALI DI METABOLISMO DEI FARMACI (FASE I)

OSSIDAZIONI

- Ossidazione di alcoli ed aldeidi ad acidi
- Ossidazione di catene laterali
- Ossidazione deaminativa
- Fissione ossidativa
- Ossidazione di sistemi aromatici ed eterociclici
- Ossidazione di sistemi aliciclici
- N-ossidrilazione
- Dealchilazione ossidativa
- S-ossidrilazione

RIDUZIONI

- Nitro e Azoriduzione
- Riduzione di aldeidi

IDROLISI

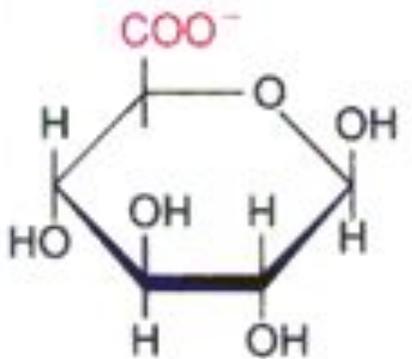
- Idrolisi di esteri
- Idrolisi di ammidi

METABOLISMO

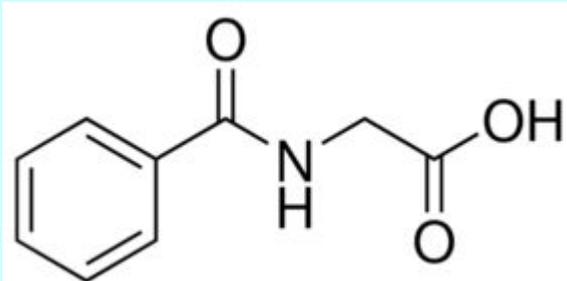
MODALITA' FONDAMENTALI DI METABOLISMO DEI FARMACI (FASE II)

SINTESI

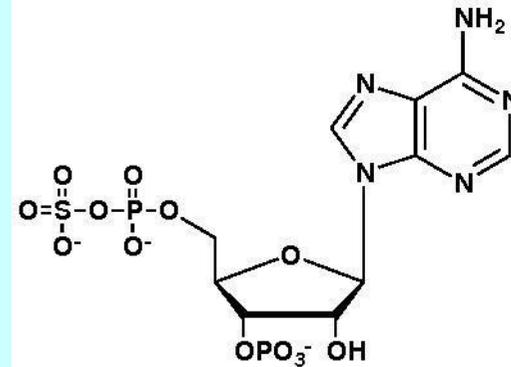
- Glucuroconiugazione
- Sintesi ippurica
- Solfoconiugazione
- Sintesi mercapturica (Glutatione)
- Reazioni varie (metilazioni, acetilazioni)



β -D-Glucuronic acid



Acido ippurico

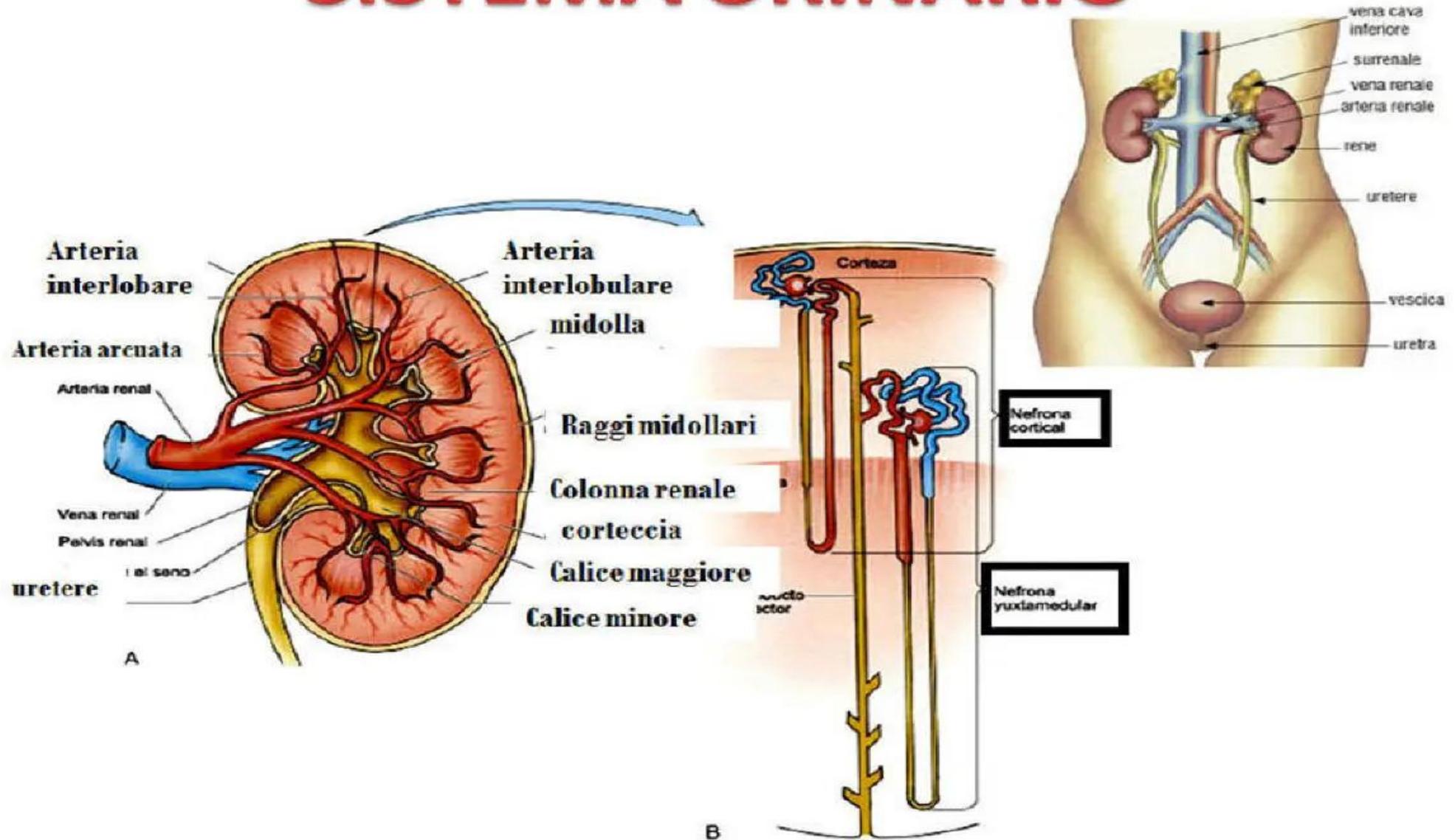


PAPS



GLUTATHIONE (GSH)
gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine

SISTEMA URINARIO



Rimozione di acqua, elettroliti, prodotti del metabolismo, farmaci e altre piccole molecole dal sangue

Funzioni endocrine (secerne eritropoietina, renina, ecc.)

Riassorbimento dell'acqua, elettroliti e elementi nutritivi dalle urine

Ogni rene contiene circa 1.200.000 unità strutturali: i nefroni, che sono composti da glomeruli e tubuli.

180 L di filtrato glomerulare al giorno, cioè circa 60 volte il volume totale di plasma.

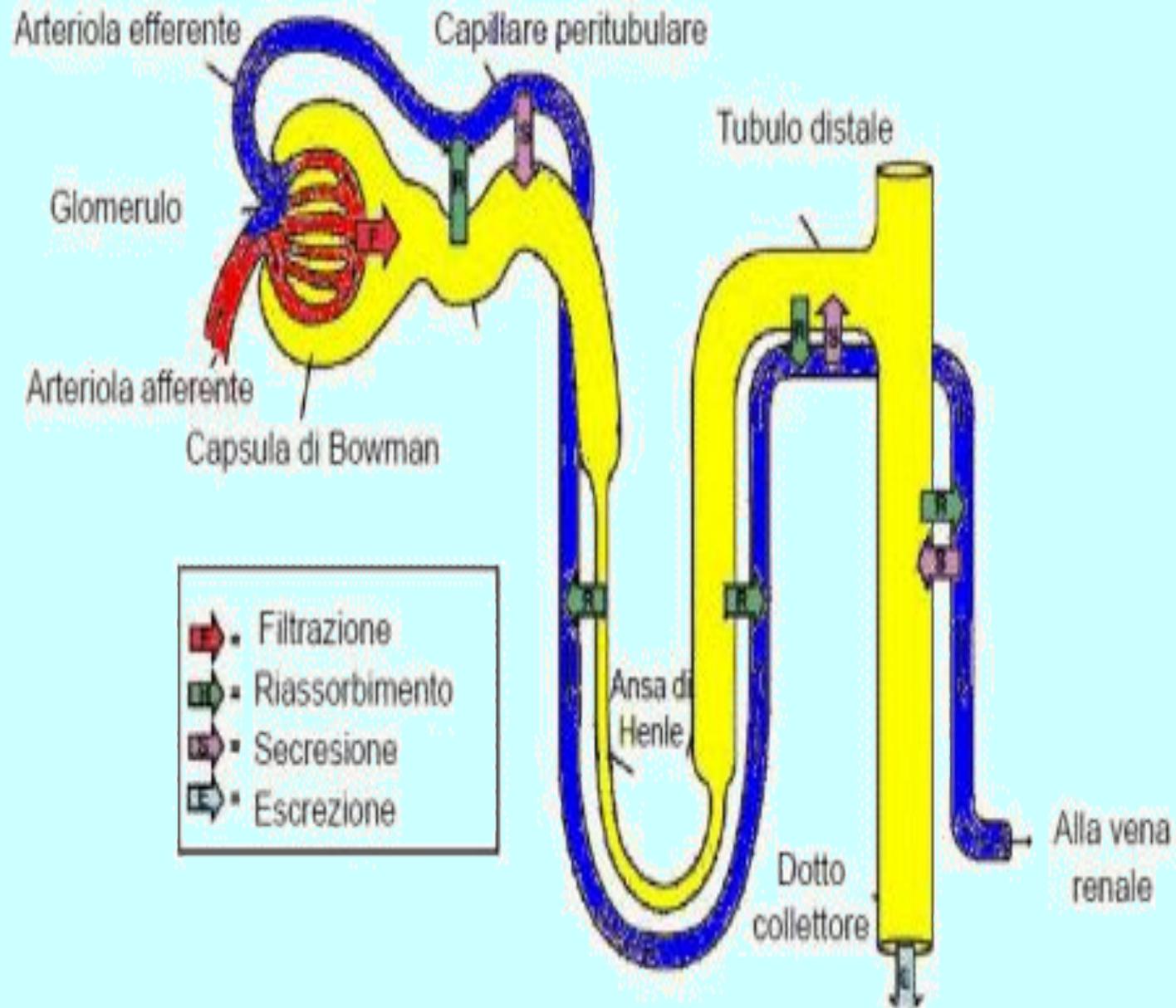
FUNZIONALITÀ RENALE

Il glomerulo è circondato da una fitta rete di capillari (arteriole) che hanno un diametro maggiore di quelli efferenti.

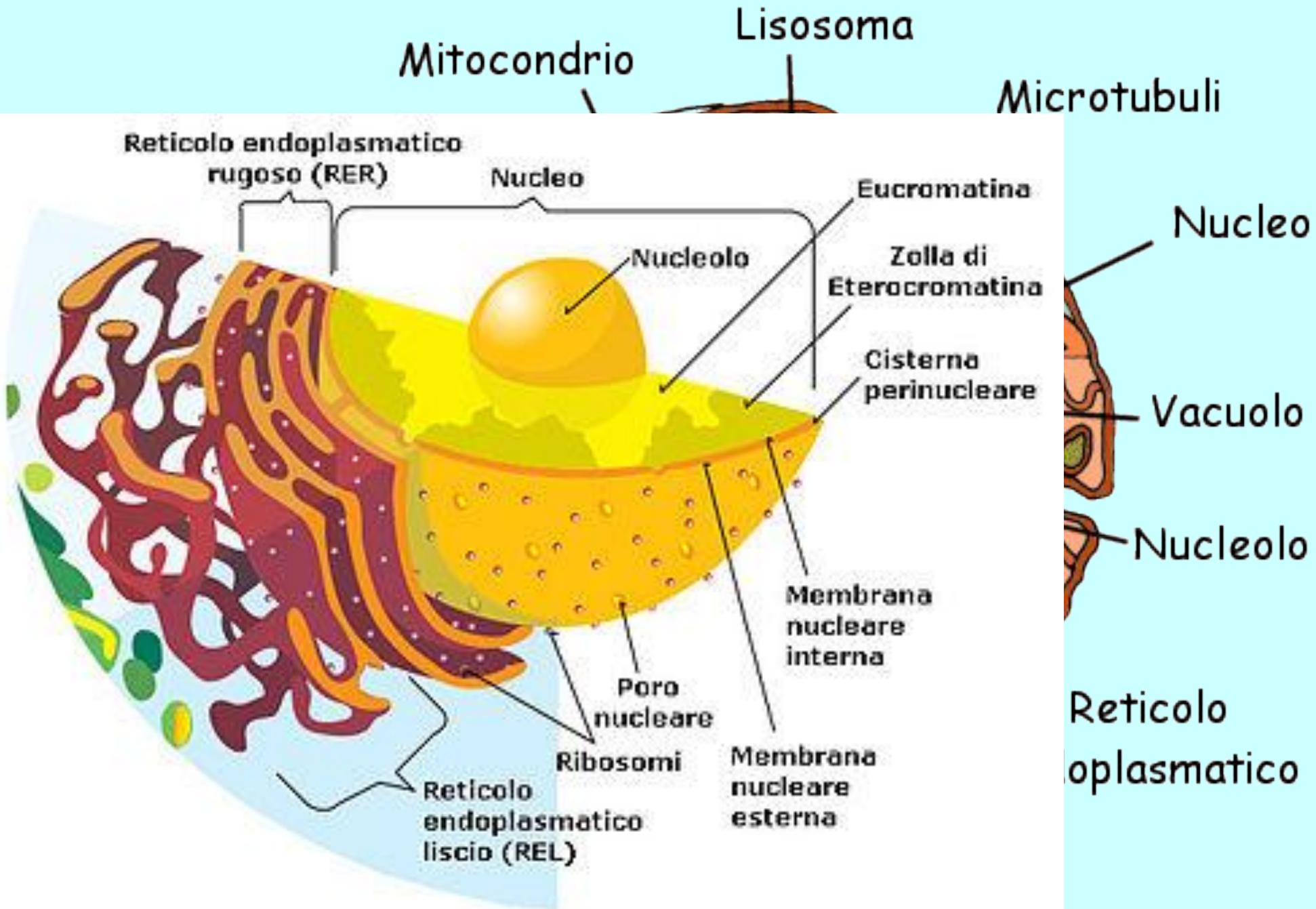
La forza di filtrazione è la pressione idrostatica del sangue che deriva dal lavoro del cuore. La pressione della filtrazione glomerulare è di circa 50 mm Hg, e facilita il rapido scambio di acqua ed una varietà di molecole a basso e medio peso molecolare.

La capsula di Bowman, composta da un singolo strato di cellule squamose, circonda il glomerulo e raccoglie il filtrato.

Tubulo prossimale, ansa di Henle, tubulo distale, dotti di raccolta.

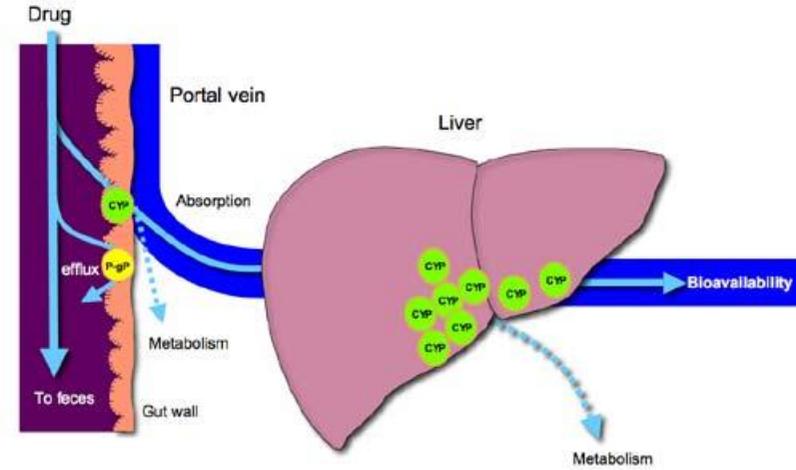
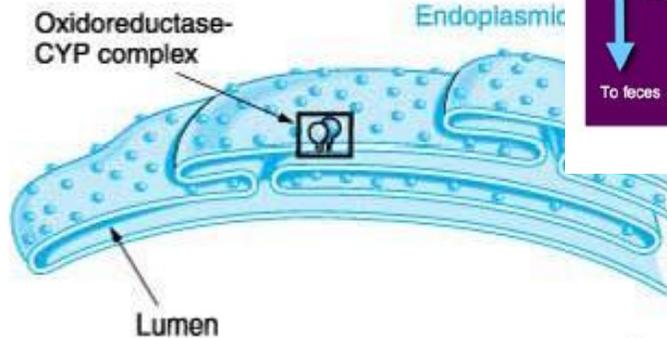
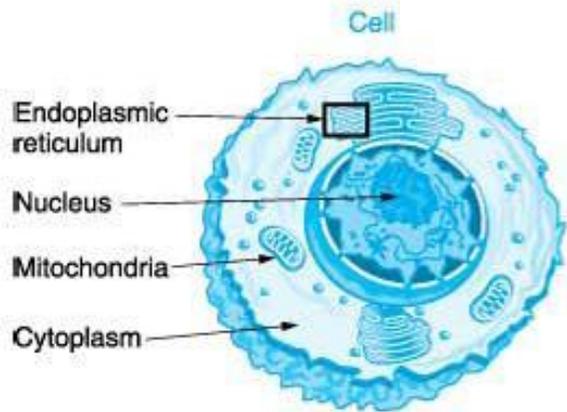


CELLULA ANIMALE

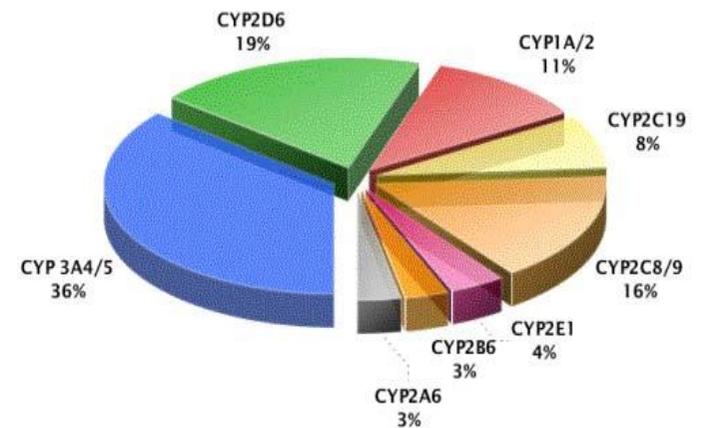
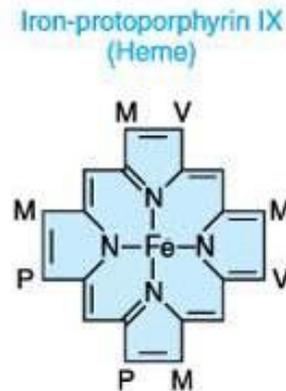
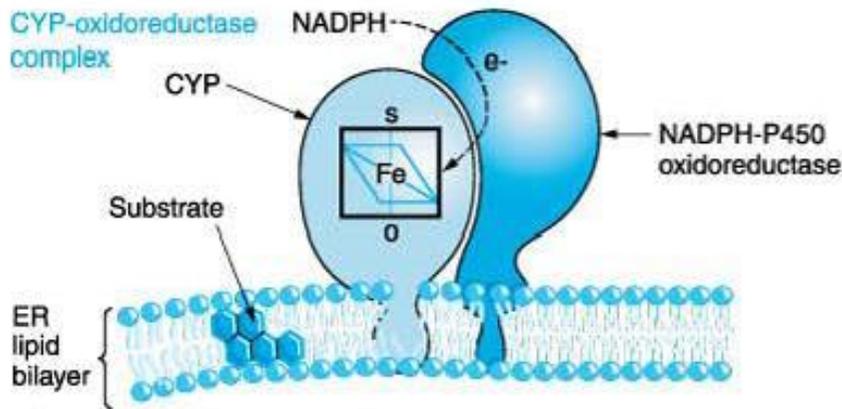


CITOCROMO P450

Figure 3-2



Proportion of Drugs Metabolized by P450 Enzymes



Copyright ©2006 by The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Adapted from: Wrighton SA et al. Crit Review Toxicology 1992;22:1-22. Kashuba and Bertino. Mechanisms of drug interaction. In Drug Interactions in Infections Diseases. Humana Press. 2001.

Location of CYPs in the cell.

The figure shows increasingly microscopic levels of detail, sequentially expanding the areas within the black boxes. CYPs are embedded in the phospholipid bilayer of the endoplasmic reticulum (ER). Most of the enzyme is located on the cytosolic surface of the ER. A second enzyme, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, transfers electrons to the CYP where it can, in the presence of O₂, oxidize xenobiotic substrates, many of which are hydrophobic and dissolved in the ER. A single NADPH-CYP oxidoreductase species transfers electrons to all CYP isoforms in the ER. Each CYP contains a molecule of iron-protoporphyrin IX that functions to bind and activate O₂. Substituents on the porphyrin ring are methyl (M), propionyl (P), and vinyl (V) groups.

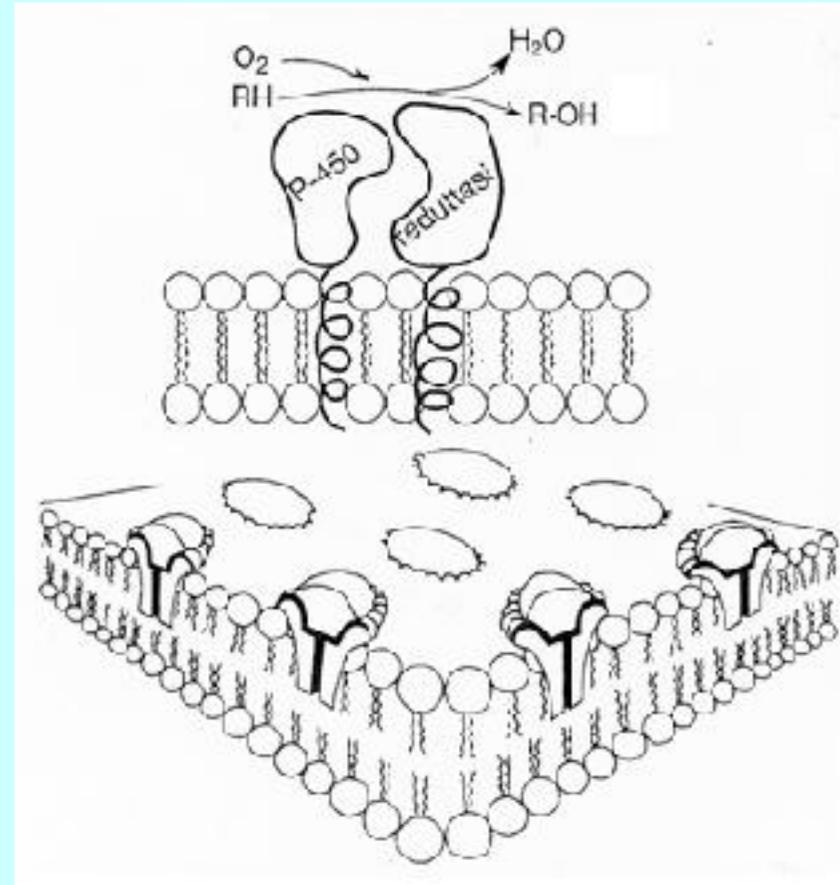
OSSIDAZIONI

Le reazioni di ossidazione sono legate alle **ossidasi a funzione mista** che sono presenti nei **microsomi del fegato, del rene, del polmone, dell'intestino**, e a una famiglia di **ossidasi mitocondriale** che partecipa anche alla sintesi degli steroidi. Queste ultime ossidasi hanno come punto di arrivo il **CYP450** che è un sistema ubiquitario di proteine contenenti ferro localizzate nella catena di trasporto degli elettroni necessario nei processi ossido-riduttivi.

Un terzo gruppo di ossidasi (**ossidasi extramicrosomiali**) non microsomiali e non mitocondriali si trovano nel **reticolo endoplasmatico** e pur essendo coinvolte nell'ossidazione dei composti endogeni sono capaci anche di metabolizzare diversi farmaci.

Tra queste vanno annoverate **alcol deidrogenasi**, **aldeide deidrogenasi**, **xantina ossidasi**, **monoamino ossidasi**, e altre.

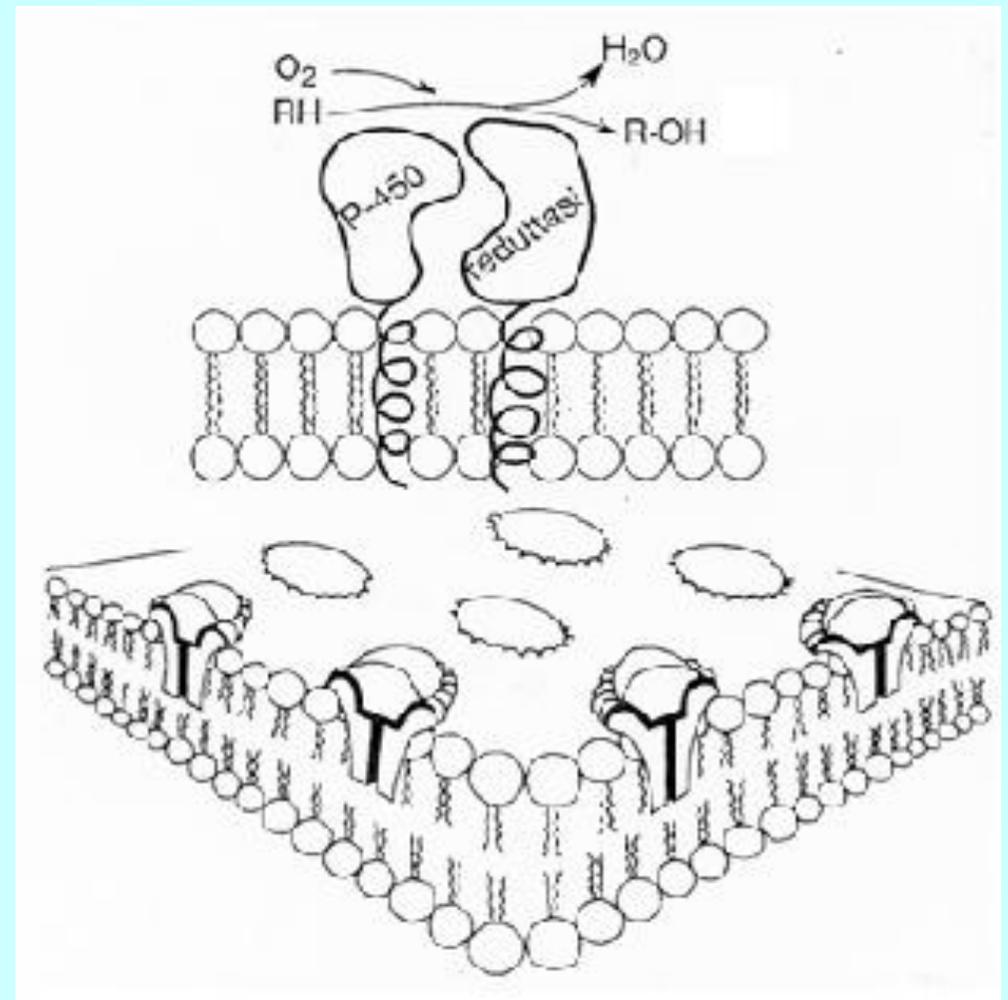
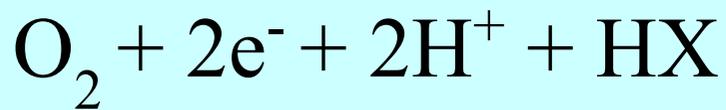
Disposizione del sistema di ossidasi miste microsomiali sul reticolo endoplasmatico liscio



CITOCROMO P450

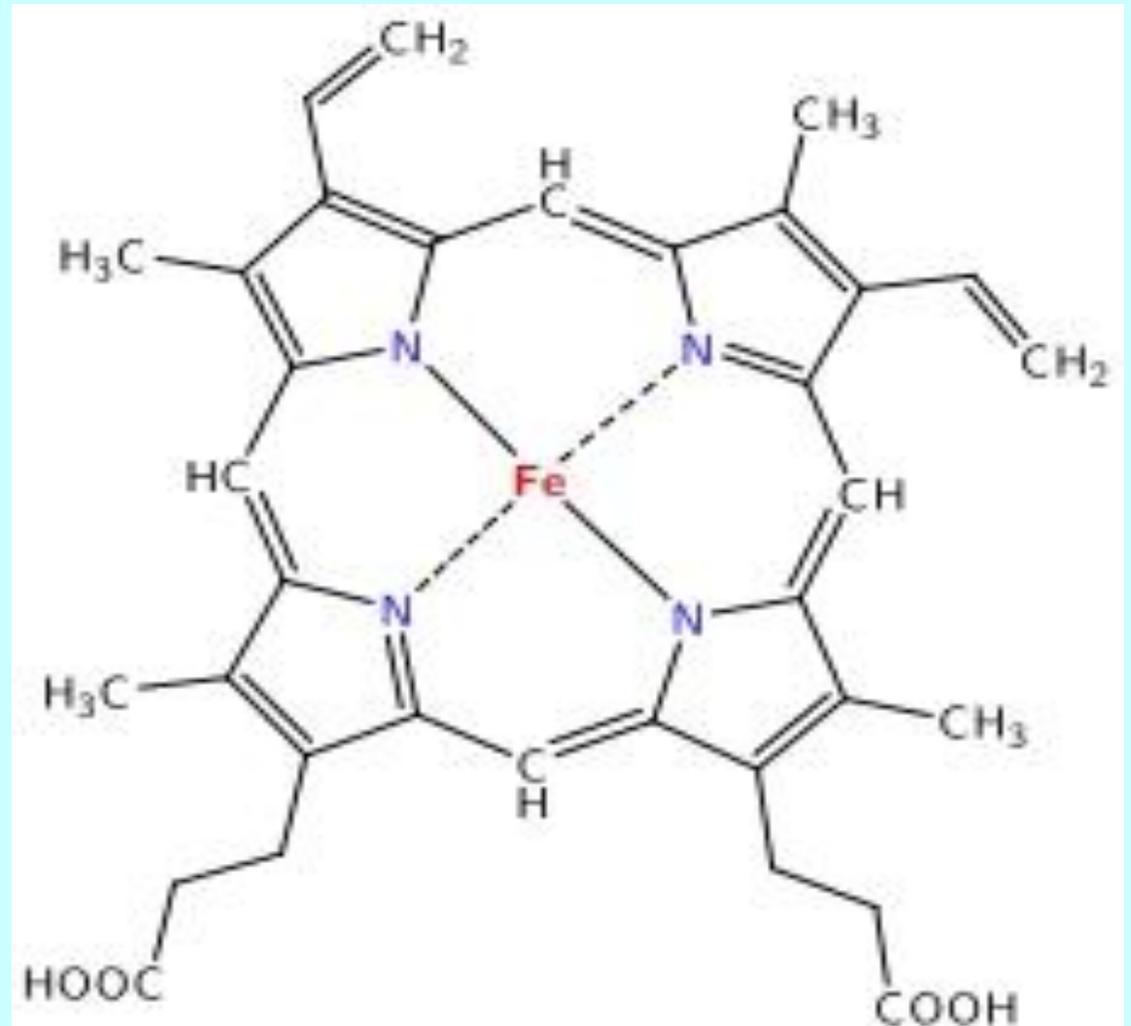
Strutturalmente si tratta di emoproteine composte da una parte costante che è un coenzima (protoporfirina IX) e da una parte variabile che è una proteina di circa 50kDa

Funzionalmente si tratta di monoossigenasi che scindono l'O₂ e determinano il legame dell'atomo di ossigeno al substrato XH

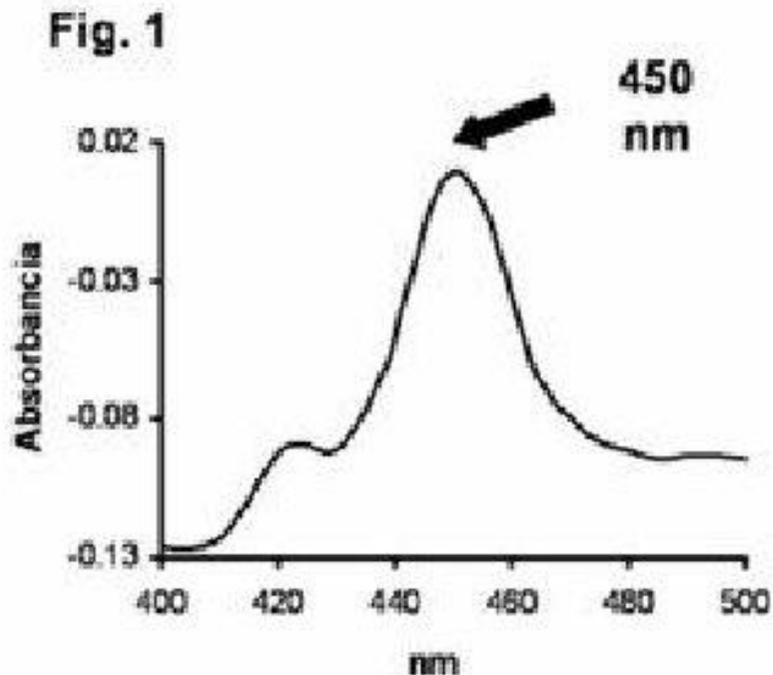


CITOCROMO P450

L'atomo di ferro è localizzato in un gruppo prostetico detto **eme** formato da un nucleo tetrapirrolico in cui i 4 anelli pirrolici sono legati da ponti metilenici e sostituiti con gruppi metilici e vinilici e infine due catene di acido propionico.



Il loro nome deriva dal fatto che il Fe^{2+} del gruppo eme legando il monossido di carbonio forma un complesso con un picco di assorbimento nello spettro visibile a **450 nm**.

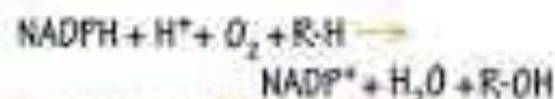


CYTOCHROME P450 CATALYTIC CYCLE

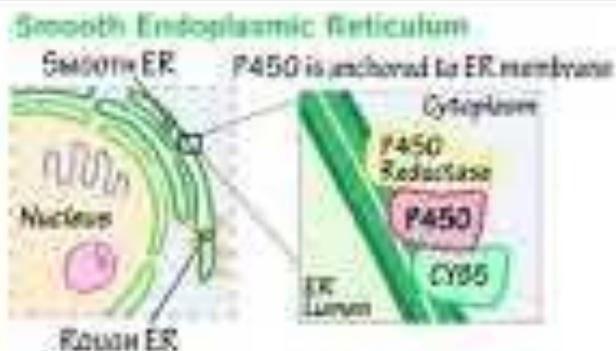
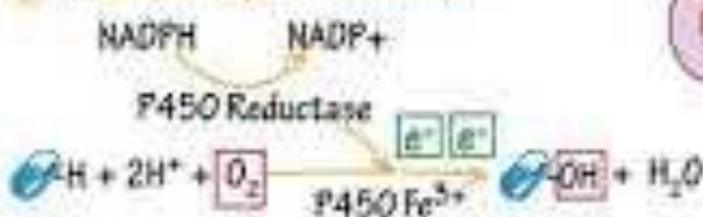
➤ P450 Metabolism

- **Exogenous P450 Metabolism**
P450 is fundamental for conversion of lipophilic foreign substances into polar entities that can be readily excreted.
P450 intermediaries can be beneficial -
Phenoxazone: cocaine → morphine
Or it can be deleterious -
Strengthening of a carcinogen, such as benzo[a]pyrene.
- **Endogenous P450 Metabolism**
Includes the biosynthesis of key endogenous compounds -
Steroid hormones, cholesterol, bile acids, amino, and lipid-soluble vitamins.
Generation of toxic mediators from endogenous precursors -
arachidonic acids → eicosanoids

📐 Basic Stoichiometry

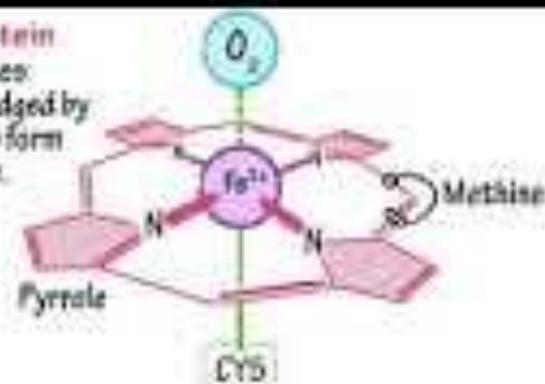


🔄 Catalytic Cycle Overview

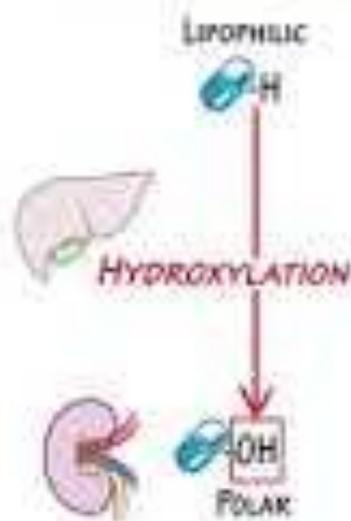


P450 Heme Protein

Porphyrin comprises 4 pyrrole rings bridged by methine groups to form a planar structure.

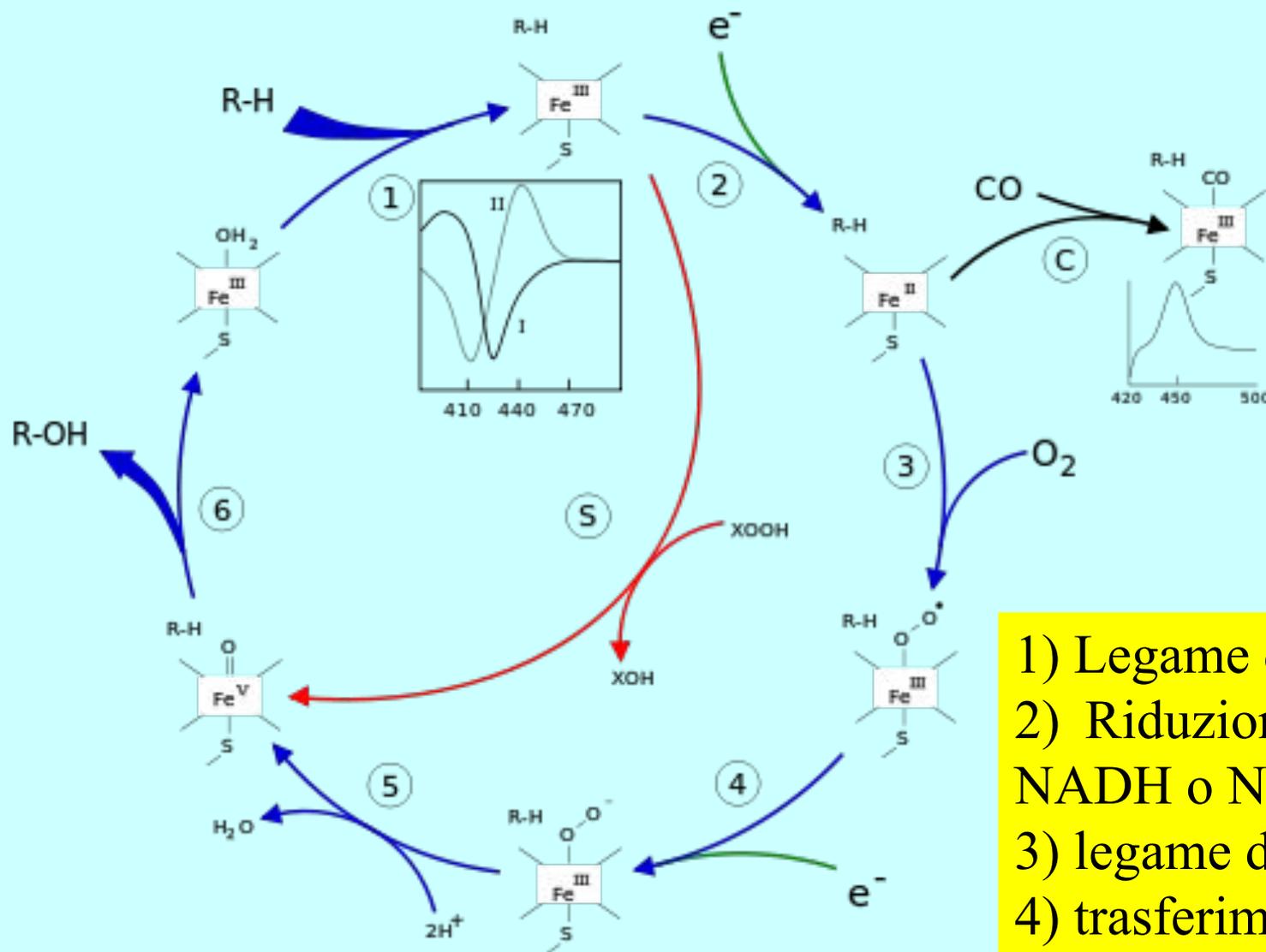


P450 Catalytic Cycle



Key P450 Reactions

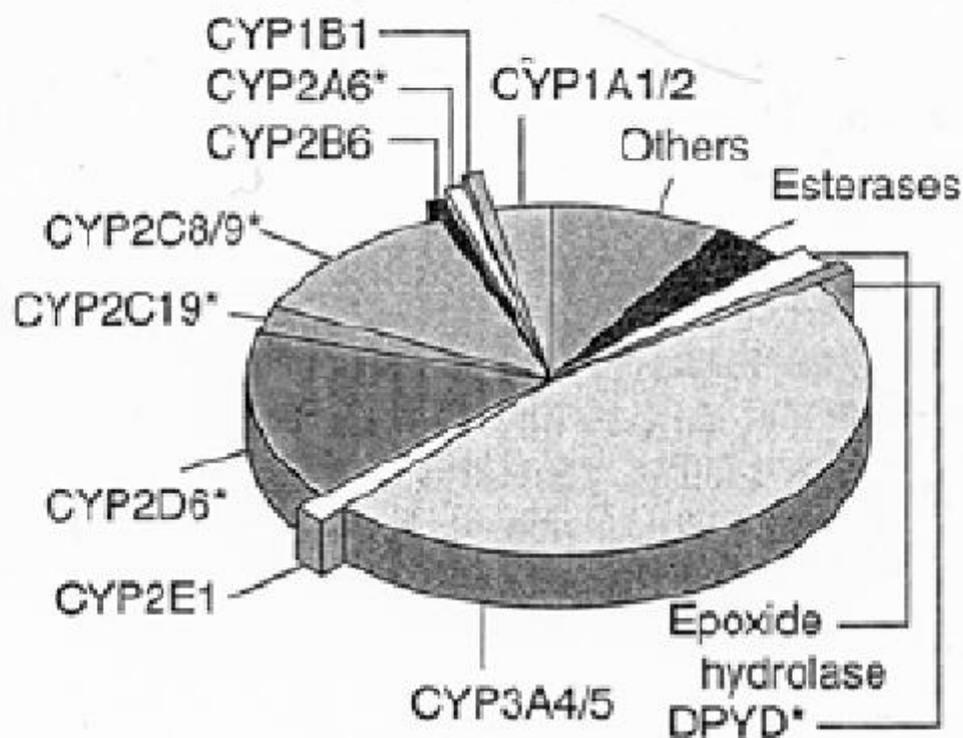
CITOCROMO P450



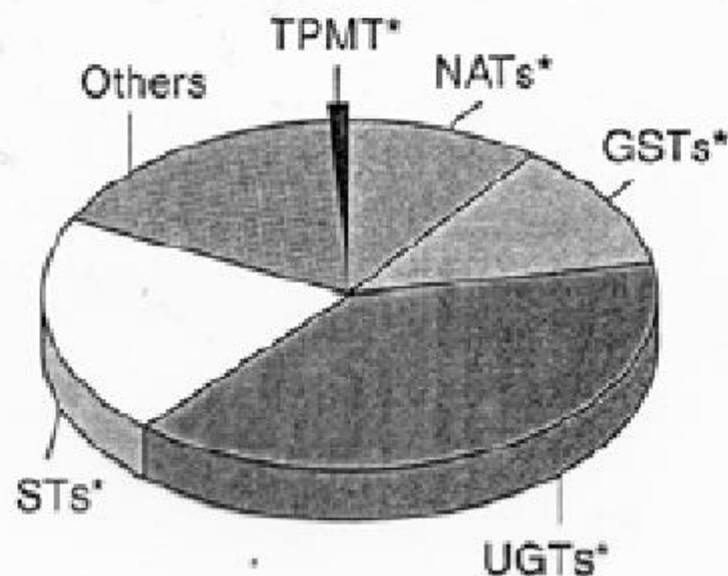
- 1) Legame del substrato
- 2) Riduzione del Fe III a Fe II (con NADH o NADPH)
- 3) legame di O₂ al citocromo
- 4) trasferimento del secondo elettrone
- 5) Formazione H₂O
- 6) Formazione del prodotto ossidrilato

Proporzioni dei più comuni farmaci metabolizzati dai principali enzimi della fase 1 e 2

FASE 1



FASE 2



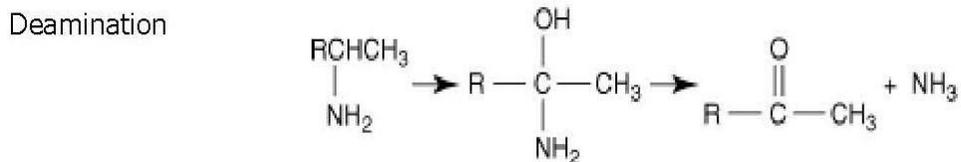
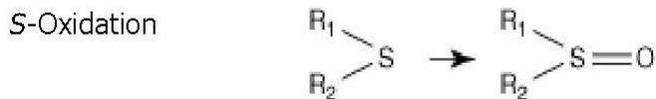
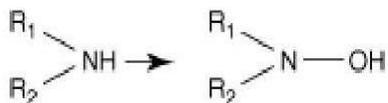
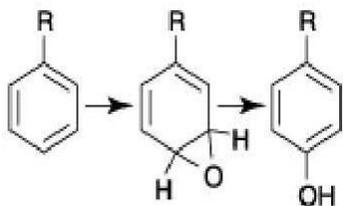
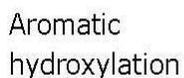
CYP = citocromo P450; DPYD = diidropirimidina deidrogenasi; GST = glutatione S-transferasi; NAT = N-acetiltransferasi; ST = Sulfotransferasi; TPMT = tiopurina metiltransferasi; UGT = UDP-glucuroniltransferasi.

METABOLISMO

Table 3-2 Major Reactions Involved in Drug Metabolism

REACTION

I. Oxidative reactions



II. Hydrolysis reactions

EXAMPLES

Imipramine, diazepam, codeine, erythromycin, morphine, tamoxifen, theophylline, caffeine

Codeine, indomethacin, dextromethorphan

Tolbutamide, ibuprofen, phenobarbital, meprobamate, cyclosporine, midazolam

Phenytoin, phenobarbital, propranolol, ethinyl estradiol, amphetamine, warfarin

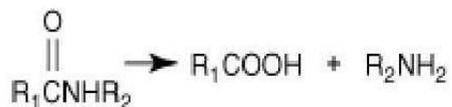
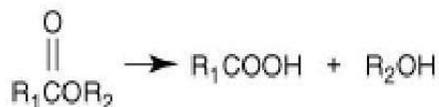
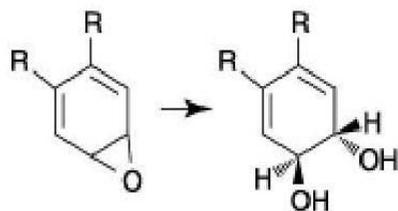
Chlorpheniramine, dapsone, meperidine

Cimetidine, chlorpromazine, thioridazine, omeprazole

Diazepam, amphetamine

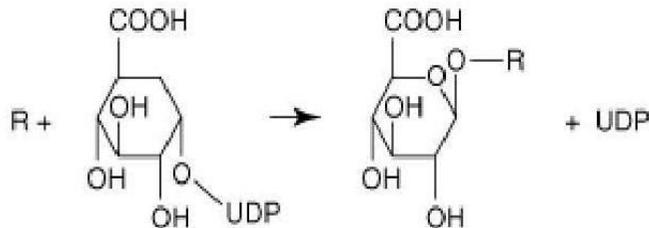
METABOLISMO

REACTION



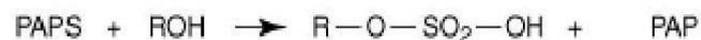
III. Conjugation reactions

Glucuronidation



UDP-glucuronic acid

Sulfation



3'-phosphoadenosine-5'

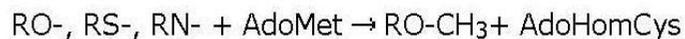
3'-phosphoadenosine-5'-phosphate

phosphosulfate

Acetylation



Methylation



Glutathione conjugation



EXAMPLES

Carbamazepine

Procaine, aspirin, clofibrate, meperidine, enalapril, cocaine

Lidocaine, procainamide, indomethacin

Acetaminophen, morphine, oxazepam, lorazepam

Acetaminophen, steroids, methyl dopa

Sulfonamides, isoniazid, dapsone, clonazepam (see Table 3-3)

L-Dopa, methyl dopa, mercaptopurine, captopril

Adriamycin, fosfomycin, busulfan

METABOLISMO

Table 3-1 Xenobiotic Metabolizing Enzymes

ENZYMES

Phase 1 "oxygenases"

Cytochrome P450s (P450 or CYP)

Flavin-containing monooxygenases (FMO)

Epoxide hydrolases (mEH, sEH)

Phase 2 "transferases"

Sulfotransferases (SULT)

UDP-glucuronosyltransferases (UGT)

Glutathione-S-transferases (GST)

N-acetyltransferases (NAT)

Methyltransferases (MT)

Other enzymes

Alcohol dehydrogenases

Aldehyde dehydrogenases

NADPH-quinone oxidoreductase (NQO)

REACTIONS

C and O oxidation, dealkylation, others

N, S, and P oxidation

Hydrolysis of epoxides

Addition of sulfate

Addition of glucuronic acid

Addition of glutathione

Addition of acetyl group

Addition of methyl group

Reduction of alcohols

Reduction of aldehydes

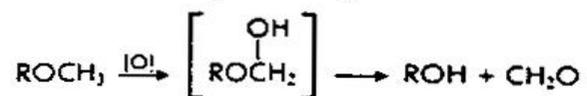
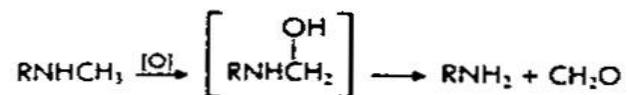
Reduction of quinones

mEH and sEH are microsomal and soluble epoxide hydrolase. UDP, uridine diphosphate; NADPH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

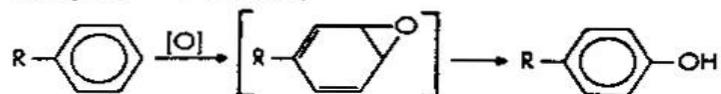
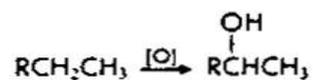
METABOLISMO

I. Oxidative Reactions

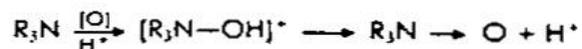
(1) N- and O-Dealkylation



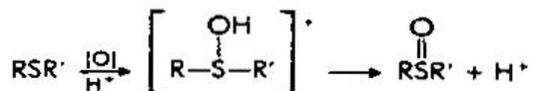
(2) Side-Chain (Aliphatic) and Aromatic Hydroxylation



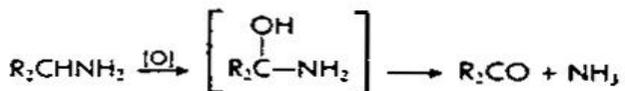
(3) N-Oxidation



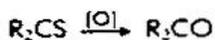
(4) Sulfoxide Formation



(5) Deamination of Amines



(6) Desulfuration



II. Hydrolysis of Esters and Amides



Ossidazioni e idrolisi

METABOLISMO

Riduzioni e coniugazioni

III. Reduction

(1) Azo Reduction

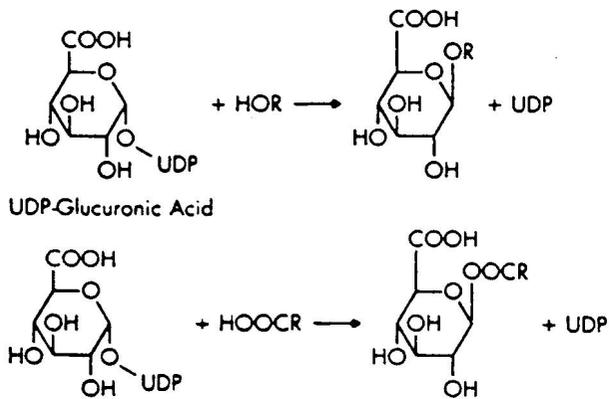


(2) Nitro Reduction

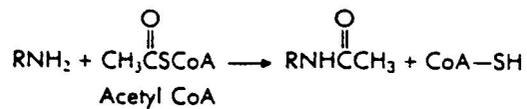


IV. Conjugation Reactions

(1) Glucuronidation (Ether and Ester)



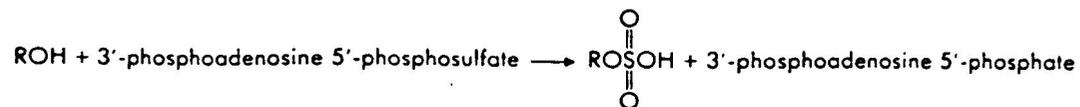
(2) Acetylation



(3) Conjugation with Glycine



(4) Conjugation with Sulfate



(5) O-, S-, and N-Methylation

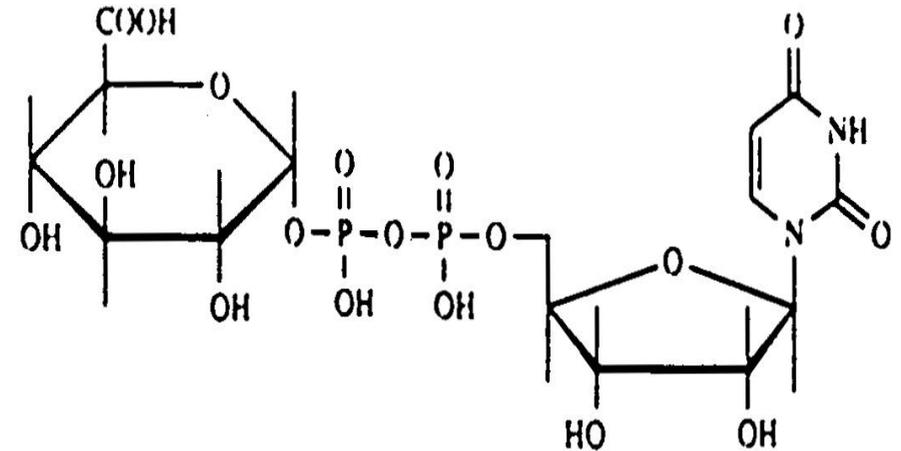
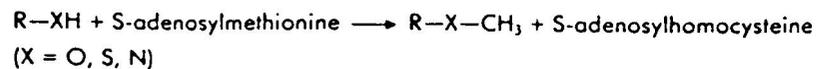
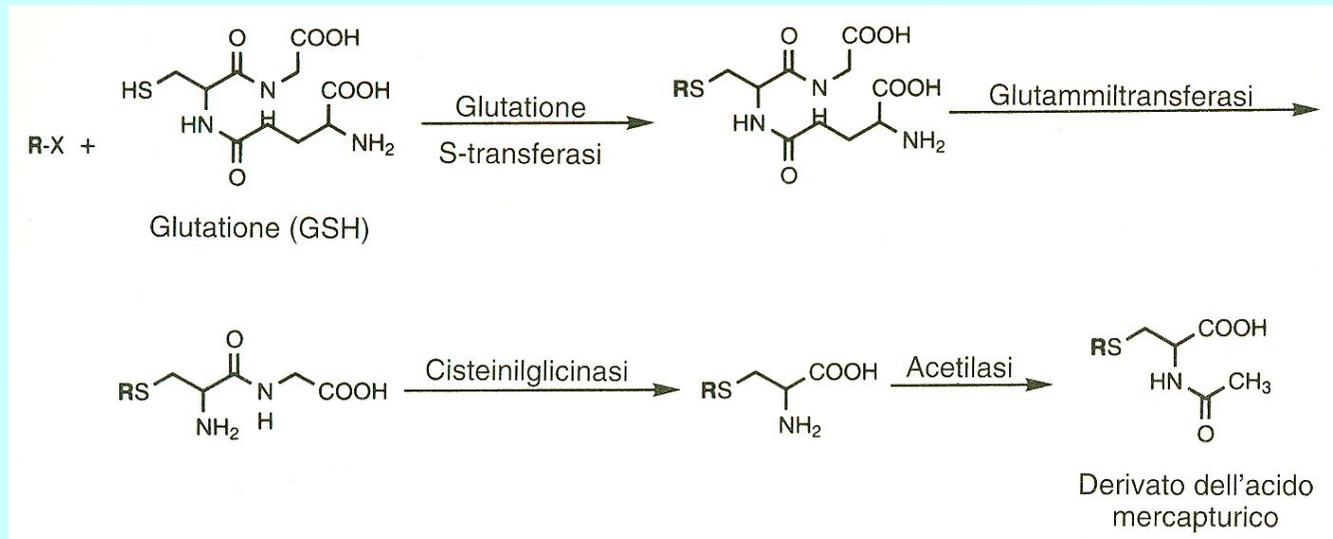


Fig. 6.19 Uridine-5'-diphospho- α -D-glucuronic acid.

CONIUGAZIONE CON GLUTATIONE E SINTESI MERCAPTURICA

Gli acidi mercapturici sono gli *S*-derivati dell'acetilcisteina prodotti a partire dal glutathione (GSH)



Il **GSH**, più nucleofilo, è in grado di reagire con elettrofili più dannosi per l'organismo, proteggendo i centri nucleofili presenti sugli acidi nucleici e sulle proteine cellulari

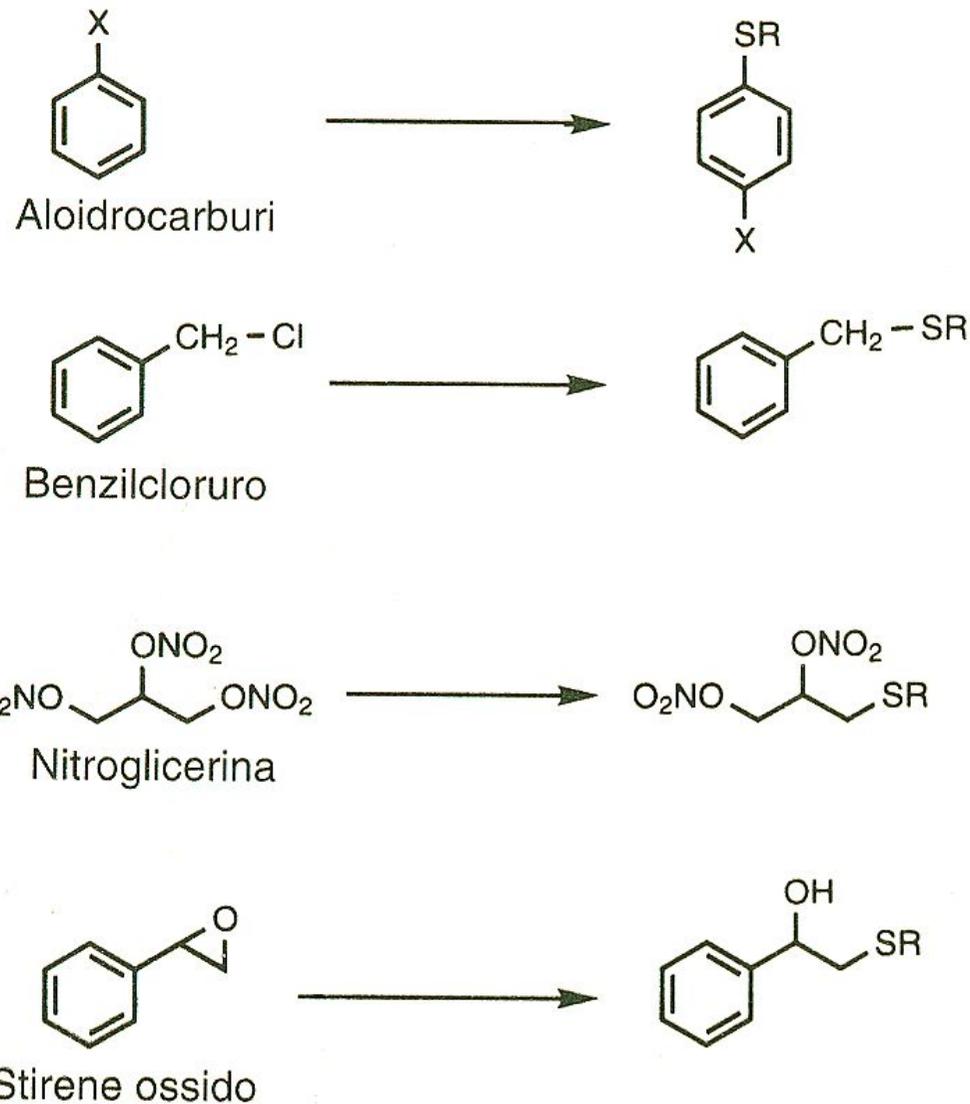
Il **GSH**, nucleofilo, attacca **C elettrofilo** che supporta gruppi uscenti: alogeni, solfati, gruppi nitrici e su piccoli cicli quali epossidi, β -lattoni,

La coniugazione con GSH porta a **detossificazione**

METABOLISMO

Reazioni di coniugazione con glutatione

Esempi



METILAZIONE

La **O- ed N-metilazione** è una reazione che viene utilizzata soprattutto per **composti endogeni**

Differisce dalle altre coniugazioni perché può dare origine a **prodotti più attivi** (epinefrina > norepinefrina)

La **O-metilazione** è catalizzata da un enzima Mg-dipendente, **catecolo O-metiltransferasi (COMT)**, che metila l'OH catecolico in **meta**

Substrati specifici sono: catecolammine (epinefrina, norepinefrina dopamina), amminoacidi, L-DOPA, α -metil-DOPA, 2- e 4-idrossiderivati dell'estradiolo, la metilazione porta ad **inattivazione**

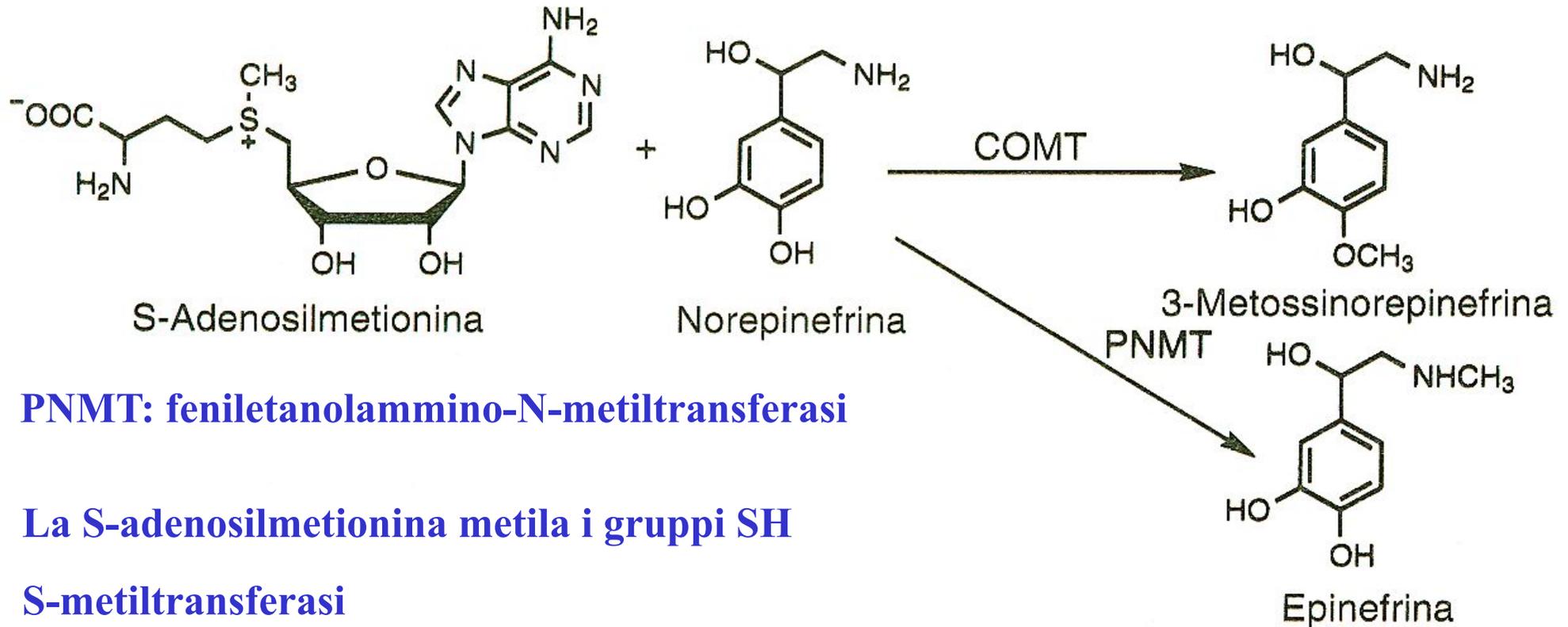
La **COMT** è presente nel fegato, nei reni, nel tessuto nervoso ed altri tessuti

L'**idrossindolo O-metiltransferasi** metila solo i derivati diidrossiindolici (N-acetilserotonina, serotonina) ed è presente nella ghiandola pineale dove partecipa alla sintesi della melatonina

METILAZIONE



dove Z = O, NH, S



PNMT: feniletanolammino-N-metiltransferasi

La S-adenosilmetionina metila i gruppi SH

S-metiltransferasi

Fig. 8-24. Vie di metilazione.

METABOLISMO

Metilazioni

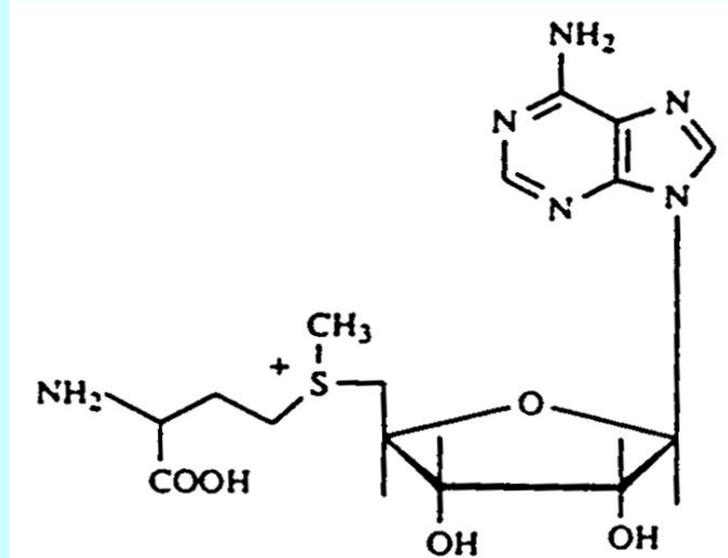
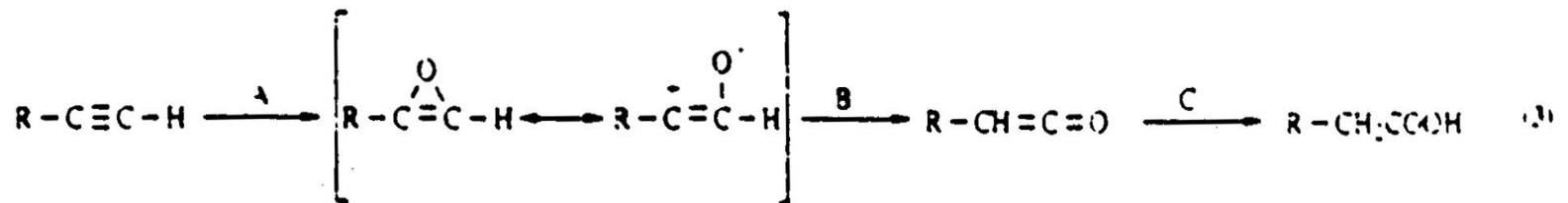
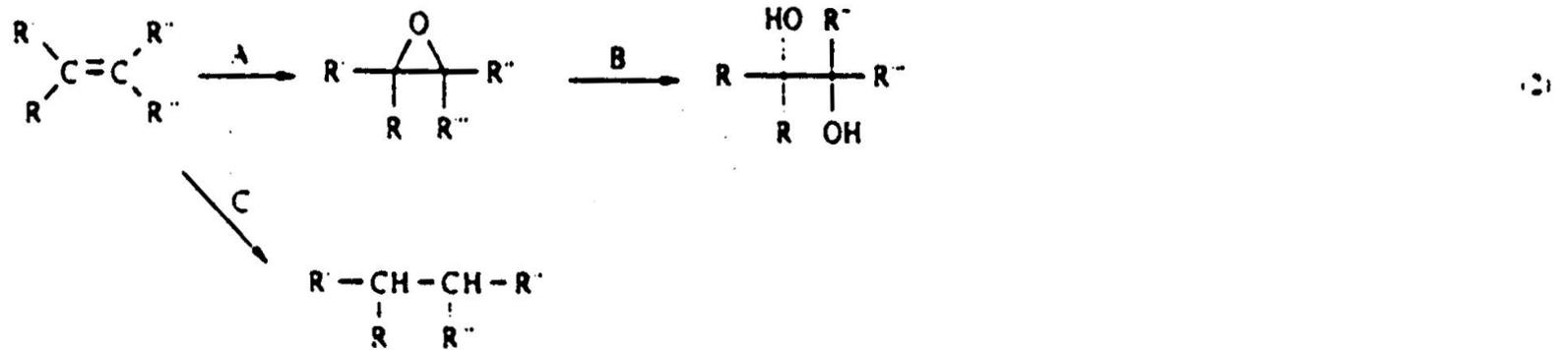
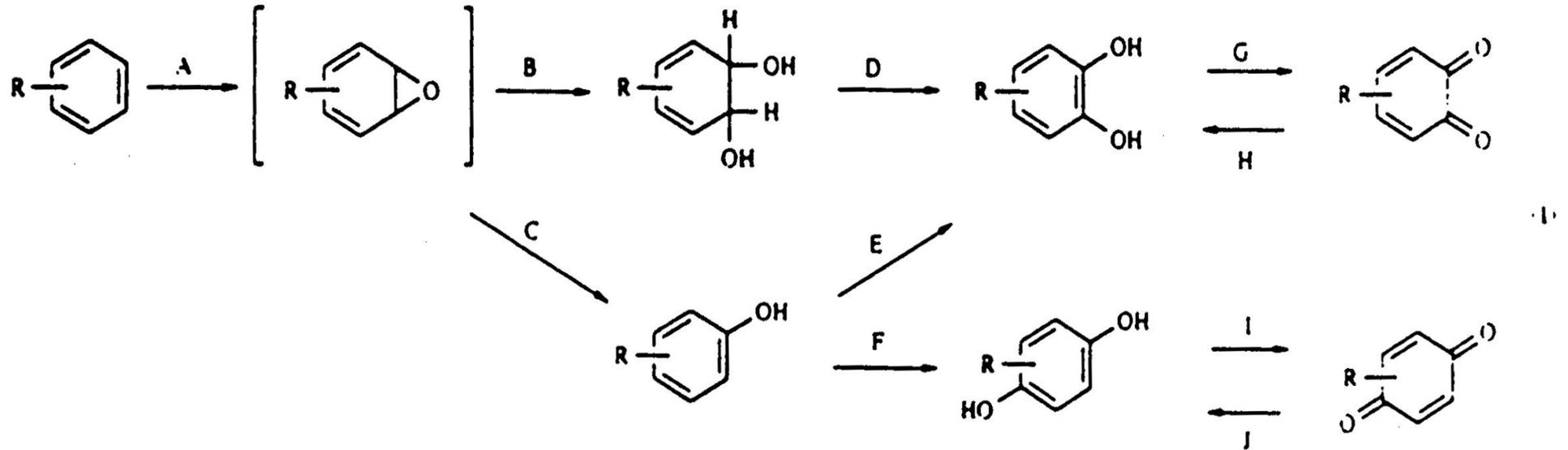
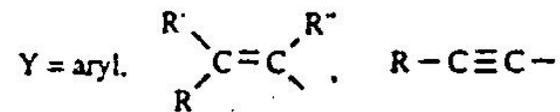
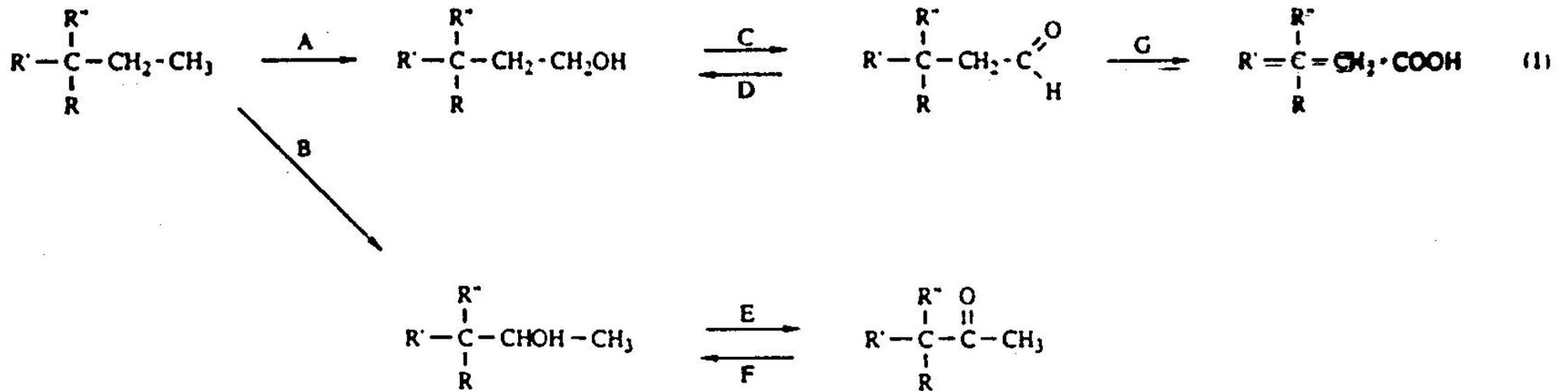


Fig. 6.13 S-Adenosyl-L-methionine.

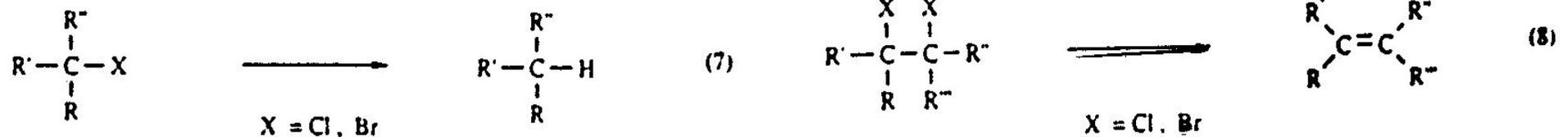
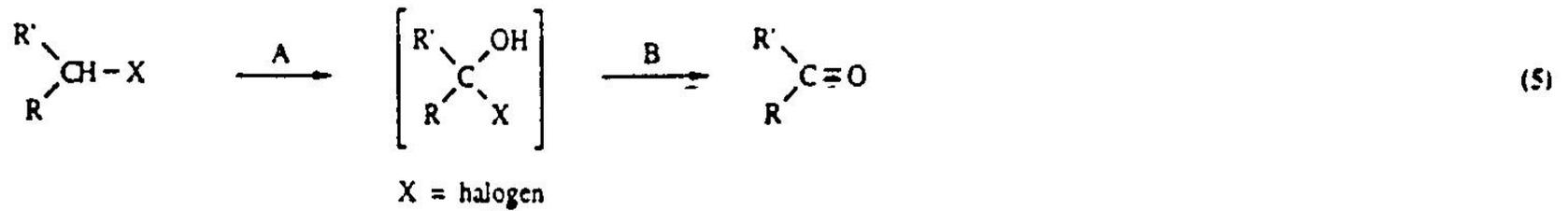
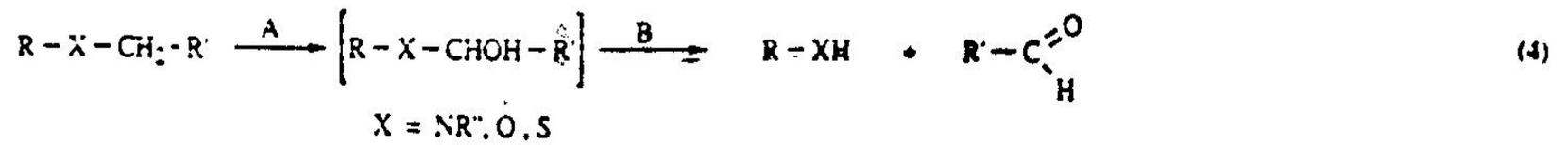
METABOLISMO



METABOLISMO



METABOLISMO



METABOLISMO

Metabolismo dell'isobutile (100 mg/Kg) nel ratto

Sesso	Tempo del sonno (min)	Conc. Plasmatica dopo 60' (γ/ml)	Attività enzimatica (γ/ml*h)
Femmine	90±15	65±8	134±51
Maschi	22±5	23±9	682±102

Formazione di p- ed o-aminofenolo nell'anilina in varie specie animali

Animale	Rapporto p/o
Ratto deserto	15
Cavia	11
Criceto	10
Coniglio	7
Ratto	6
Topo	4
Furetto	1
Gatto	0,5
Cane	0,5

Velocità del metabolismo in diverse specie animali (diminuzione oraria % del liv. ematico)

	Uomo	Animali
Fenazone	6	50-70 (cane, cavia)
Aminofenazone	1/10	50 (cane)
Pentobarbitale	10-30	15 (cane)
Tiopentale	15	5
Fenilbutazone	15 (pro die)	Più rapidamente

QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

Sono le relazioni matematiche che correlano l'attività biologica alle proprietà chimico-fisiche di un composto o di una serie di composti analoghi aventi la stessa struttura di base e sostituenti diversi.

Le QSAR possono essere espresse dall'equazione:

$$\text{Attività biologica} = f(\text{parametri chimico-fisici e/o strutturali})$$

QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

Trovare parametri che diano una buona correlazione struttura/attività che potrà essere utilizzata anche in termini predittivi

EQUAZIONE DI HANSCH

E' il nome dato all'equazione QSAR, che comprende tutte le proprietà chimico-fisiche di un composto e le correla alla sua attività.
Un tipico esempio di equazione di Hansch è:

$$\log (1/C) = -k_1 \pi^2 + k_2 \pi + k_3 \sigma + k_4 \text{Es} + k_5$$

dove k_1 - k_5 costanti, C è la concentrazione di farmaco necessaria per ottenere un effetto specifico (es: ottenere il 50% di inibizione enzimatica)

> attività = > $1/C$

QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

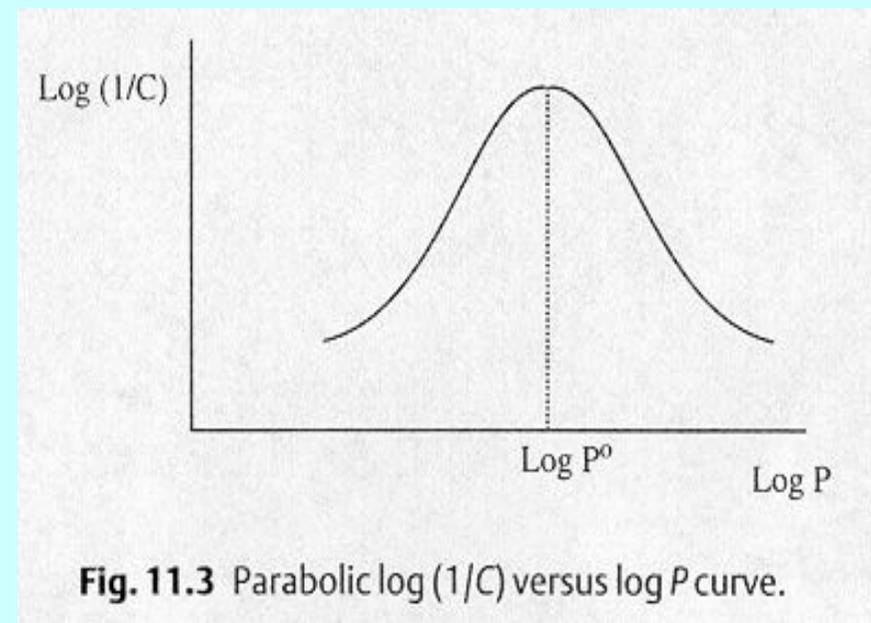
IDROFOBICITA'

Indica la facilità con cui il farmaco attraversa le membrane.
Viene misurata tramite il suo $\log P$, dove P = coefficiente di ripartizione

$$P = \frac{\text{Concentrazione del farmaco in ottanolo}}{\text{Concentrazione del farmaco in acqua}}$$

Farmaci lipofili → elevata P

Farmaci idrofili → bassa P



QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

A seconda del tipo di impiego il farmaco dovrà superare numerose membrane compartimentali per raggiungere il recettore

Se il farmaco è troppo lipofilo non abbandona la membrana facilmente.

Esiste evidentemente un valore ottimale di lipofilia per un gruppo di molecole espressa da una curva fra probabilità di accesso al recettore e lipofilia o $\log P$:

$$\log p_a = k_1 \log P - k_2 (\log P)^2 + k_3$$

Equazione di una parabola in funzione di $\log P$, per cui l'optimum di lipofilia può essere calcolata come derivata prima rispetto a $\log P$:

$$\log P = k_1 / 2 k_2$$

QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

COSTANTE DI IDROFOBICITA' (π) DEL SOSTITUENTE (X)

Consente di calcolare il contributo di un sostituente alla lipofilia totale del composto.

Sono valori tabulati ed esistono due diverse scale: una per sostituenti aromatici ed una per sostituenti alifatici.

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H$$

$\log P_X$ = coefficiente di ripartizione del composto standard in presenza del sostituente

$\log P_H$ = coefficiente di ripartizione del composto standard

$\pi > 0$ il sostituente è piu' idrofobico dell'H

$\pi < 0$ □ il sostituente è piu' idrofilo dell'H

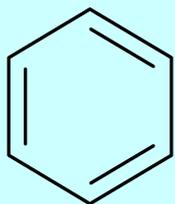
QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

Esempio: $\log P$ (clorobenzamide) = $\log P$ (benzene) + π Cl + π CONH₂

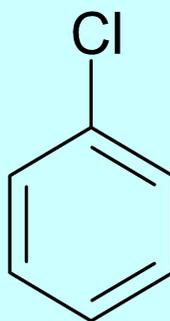
$$= 2.13 + 0.71 + (-1.49)$$
$$= 1.35$$

molinspiration

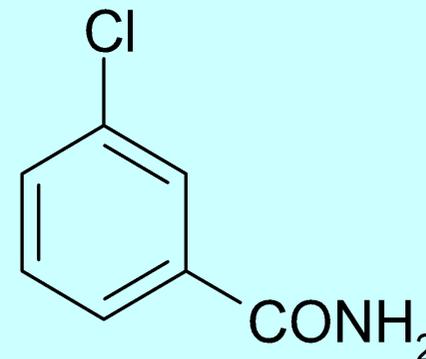
ALOGPS 2.1



benzene
(log P= 2.13)



clorobenzene
(log P= 2.84)



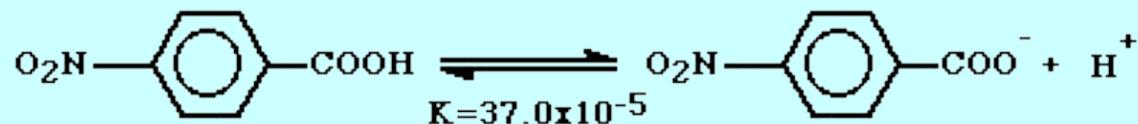
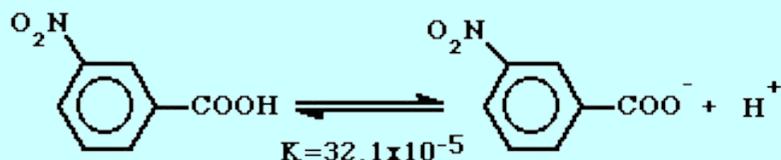
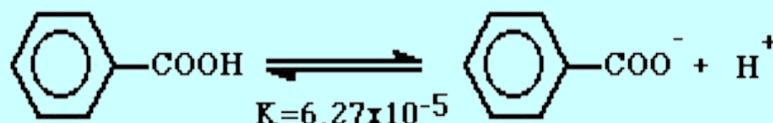
clorobenzamide
(log P= 1.35)

QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

EFFETTI ELETTRONICI

Hammett ha dato un contributo decisivo alla correlazione Struttura/Attività, trovando un modello con il quale è possibile prevedere alcune costanti chimico fisiche e il comportamento chimico alla variazione di energia libera indotta da determinati sostituenti nella struttura di riferimento.

Era già noto che la forza acida (misurata dalla K_{diss}) dell'acido benzoico può essere più o meno sensibilmente influenzata da sostituenti: sostituenti che attirano elettroni stabilizzano l'anione carbossilato spostando l'equilibrio verso destra e quindi aumentando la forza acida, viceversa i sostituenti elettronepulsori.



QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

EFFETTI ELETTRONICI

Gli effetti elettronici dei sostituenti aromatici possono influenzare la ionizzazione e la polarità della molecola in toto. Questo si può tradurre in un'alterata permeabilità delle membrane, interazione con il sito d'azione o con il recettore.

La costante di Hammett (σ), che è la misura delle proprietà elettroniche dei sostituenti aromatici, viene calcolata sperimentalmente valutando la variazione che si registra nella ionizzazione dell'acido benzoico in presenza del sostituente:

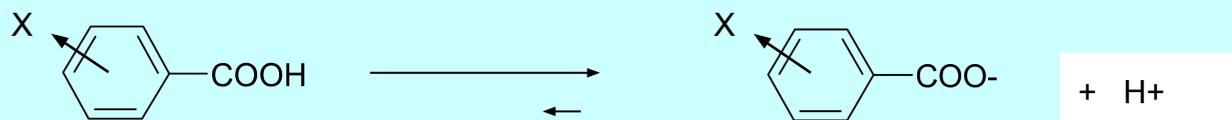
$$K_H = [\text{PhCOO}^-] / [\text{PhCOOH}]$$

QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

La costante di Hammett per un determinato sostituente (σ_x) è definita dall'equazione:

$$\sigma_x = \log K_x - \log K_H$$

Sostituenti aventi valori di σ positivi sono ELETTRONATTRATTORI: favoriscono la ionizzazione



mentre sostituenti aventi valori di σ negativi sono ELETTRONDONATORI: favoriscono la forma indissociata



QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS (QSAR)

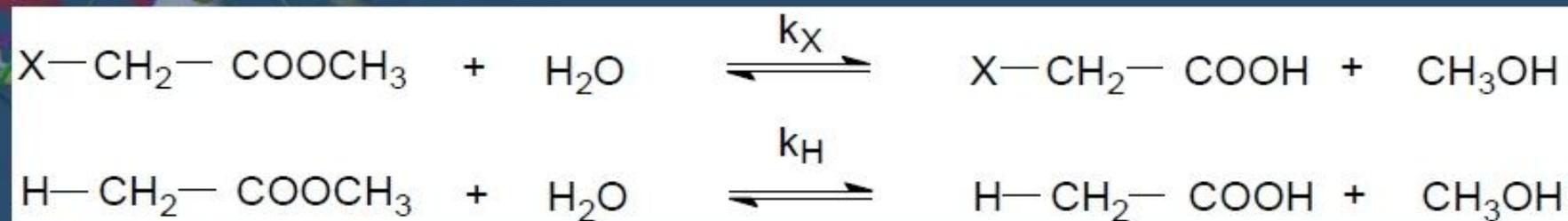
FATTORE STERICO (E_s)

La dimensione dei sostituenti, indicata come **fattore sterico di Taft (E_s)**, può influenzare l'attività di un composto:

- Ostacolando/migliorando l'interazione con il sito attivo
- Ostacolando l'azione di enzimi predisposti alla sua inattivazione
- Inducendo variazioni conformazionali che portano all'attivazione della molecola

Fattore Sterico (Hansch, Taft, Verloop)

E' stato valutato per ciascun gruppo sostituyente 'X' misurando la velocità relativa di idrolisi acida di metilesteri di acidi acetici α -sostituiti (correggendo eventuali effetti induttivi o iperconiugativi del sostituyente stesso):



L'effetto sterico si ricava dal rapporto della velocità di idrolisi delle due reazioni:

$$E_s = \log \frac{k_X}{k_H}$$

Quindi l'Equ. di Hansch diventa:

$$\log \frac{1}{[F_i]} = -a' \cdot \pi^2 + a \cdot \pi + \rho \cdot \sigma + b \cdot E_s + c$$

Rifrazione Molare

Il parametro sterico può essere corretto o sostituito in alcuni casi con la Rifrazione Molare 'R_M':

$$R_M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d}$$

dove n: indice di rifrazione; M: peso molecolare; d: densità.

R_M ha le dimensioni di un volume (Massa/Densità = Volume) perciò si presta bene a correggere e convalidare E_s e, talvolta, anche il parametro idrofobico π.

R_M, come π ed E_s, ha proprietà additive cioè si può considerare come somma dei contributi degli atomi o radicali presenti nella molecola:

$$\Delta_{RM} = R_X = \log \frac{R_{MX}}{R_{MH}}$$

dove ΔR_M rappresenta il contributo del sostituito X alla rifrazione molare

EQUAZIONE DI HANSCH

Si possono incorporare altre proprietà molecolari (descrittori), sia calcolati, come:

Area superficiale, volume molecolare, polarizzabilità, area della superficie accessibile al solvente, area della superficie vdW, energia di idratazione

Oppure anche proprietà fisiche misurabili, come:

Densità, pK_a , energia di ionizzazione, punto di ebollizione

Si utilizza un'analisi statistica per trovare i parametri che sono meglio correlati con l'attività biologica eliminando quelli troppo correlati tra di loro. L'equazione finale includerà solo i 3 - 5 descrittori più importanti.

Substituent	H	Me	Et	n-Pr	n-Bu
π	0.00	0.56	1.02	1.50	2.13
MR	0.10	0.56	1.03	1.55	1.96

} Correlated values.
Are any differences
due to π or MR?

Substituent	H	Me	OMe	NHCONH ₂	I	CN
π	0.00	0.56	-0.02	-1.30	1.12	-0.57
MR	0.10	0.56	0.79	1.37	1.39	0.63

} No correlation in values
Valid for analysing effects
of π and MR.

EQUAZIONE DI HANSCH

Il data set dovrebbe contenere almeno 5 molecole per ogni descrittore presente nell'equazione. Un numero troppo basso di molecole rispetto al numero dei descrittori darebbe una correlazione falsamente alta.

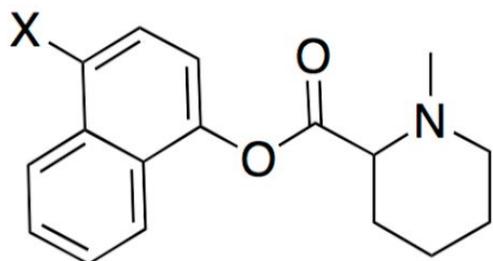
$$\log (1/C) = -k_1 \pi^2 + k_2 \pi + k_3 \sigma + k_4 \text{Es} + k_5$$

Con la **regressione lineare multipla** si determinano le costanti k_1-k_5 , mentre C è la concentrazione di farmaco necessaria per ottenere un effetto specifico (es: ottenere il 50% di inibizione enzimatica)

EQUAZIONE DI HANSCH

Conventional QSAR Study

A series of enzyme inhibitors gave the following results below.



X	π	σ	IC ₅₀ (nM)
H	0	0	300
F	+0.14	+0.062	489
Cl	+0.71	+0.71	3,400
CH ₃	+0.56	-0.17	115
OCH ₃	-0.02	-0.27	26
NH ₂	-1.23	-0.66	0.3

From the data above the following Hansch Equation was determined:

$$\log 1/C = -0.5\pi - 3.6\sigma + 6.6$$

$$V(r) = 4\varepsilon \cdot \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

3D QSAR

L'acronimo 3D-QSAR o 3-D QSAR si riferisce all'applicazione di calcoli del campo di forza che richiede strutture tridimensionali di un dato insieme di piccole molecole con attività note (training set). Il training set deve essere sovrapposto (allineato) sia con dati sperimentali (ad es. basato sulla cristallografia di proteine ligando) che da software di sovrapposizione di molecole. Si utilizzano potenziali calcolati, ad es. il potenziale di Lennard-Jones, o le costanti sperimentali e riguarda la molecola complessiva piuttosto che di un singolo sostituente.

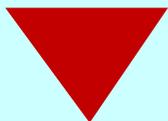
Il primo QSAR 3-D è stato denominato Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) da Cramer et al. (*J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959–5967) che ha esaminato i campi sterici (forma della molecola) e i campi elettrostatici che sono stati correlati mediante la regressione parziale dei minimi quadrati (PLS).

Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)

- Set di molecole correlate chimicamente
- Comune farmacoforo o sottostruttura
- Strutture 3D necessarie
- Molecole flessibili sono ripiegate secondo le caratteristiche dei farmacofori e riallineate

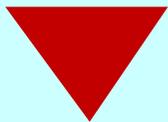
FARMACOFORO

- Set di caratteristiche strutturali in una molecola che interagisce con un recettore
- Esempi:
 - Donatori di legame idrogeno
 - carica
 - centri idrofobici
- Distanze, correlazioni 3D



Campi molecolari 3D

- Un campo molecolare è rappresentato da una griglia cubica 3D.
- Viene generato usando vari programmi
- Ciascun pixel (o nodo) della griglia rappresenta forze attrattive e repulsive tra una molecola target e un atomo sonda (*probe*) che simula, ad es., le proprietà idrofobiche o di donazione di legame H.
- Partner di interazione possono essere acqua, ottanolo o altri solventi.



Campi molecolari 3D

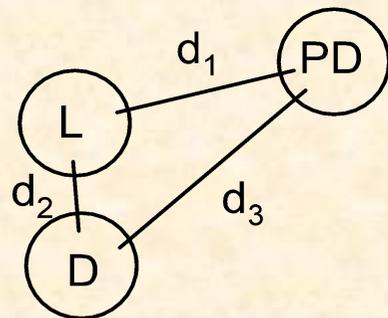
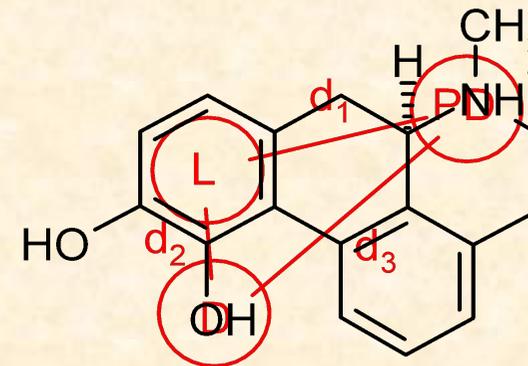
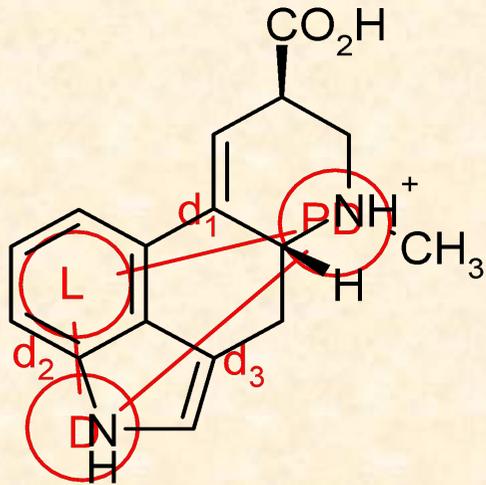
Premessa: la sovrapposizione sterica ed elettronica di molecole congeneriche che si legano allo stesso sito recettoriale non è sufficiente se si cerca una descrizione più dettagliata delle proprietà strutturali di un recettore.

Occorre anche definire le regioni idrofobiche, le **regioni di trasferimento di carica** e vari tipi di **interazioni polari**.

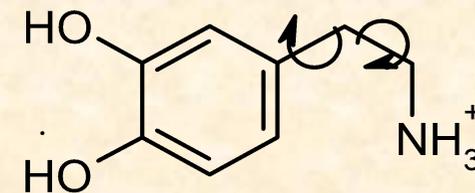
Una mappa del recettore con questo tipo di informazioni 3D è di aiuto nel comprendere i risultati sperimentali e, soprattutto, nel predire strutture nuove attive e ancora sconosciute.

Una mappa recettoriale può essere costruita mediante la generazione di **campi molecolari 3D**

Pharmacophore Selection



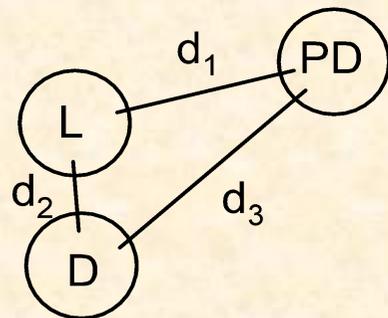
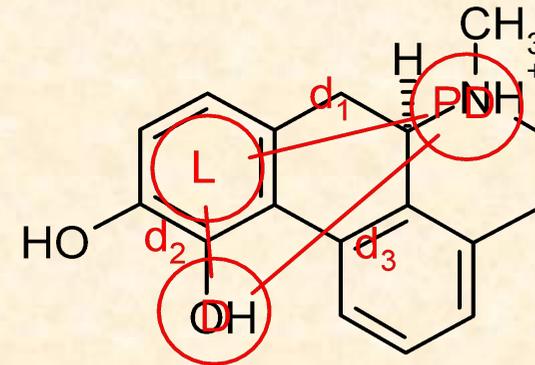
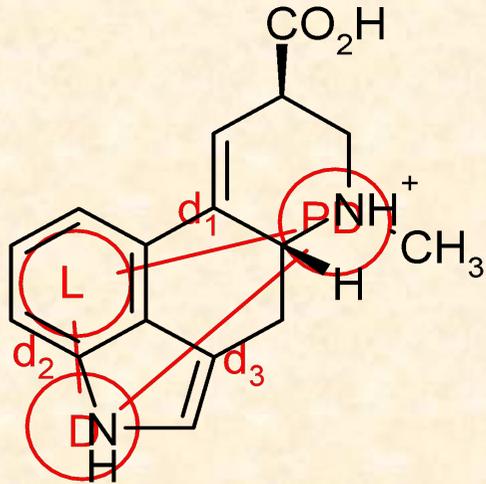
.Pharmacophore



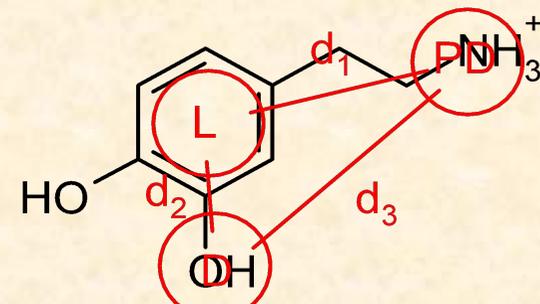
.Dopamine

.L = lipophilic site; A = H-bond acceptor;
 .D = H-bond donor; PD = protonated H-bond donor

Pharmacophore Selection



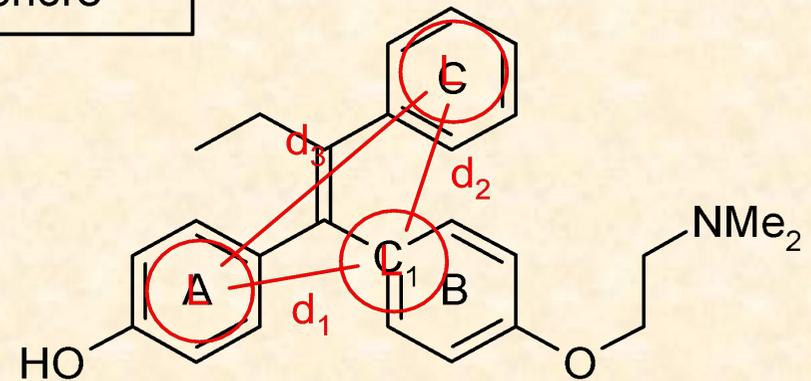
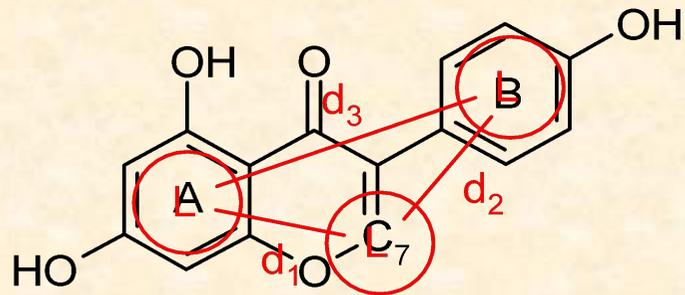
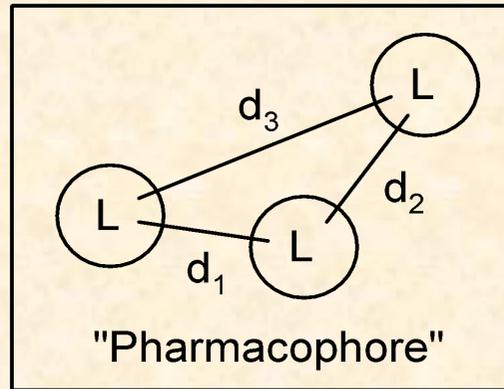
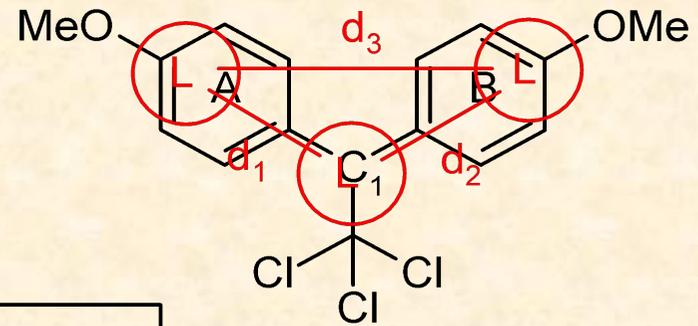
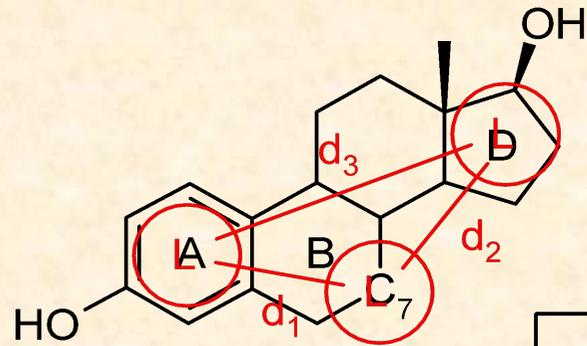
.Pharmacophore

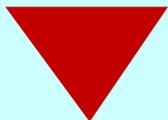


.Dopamine

- .L = lipophilic site; A = H-bond acceptor;
- .D = H-bond donor; PD = protonated H-bond donor

CoMFA Alignment





3D QSAR

Programmi usati per generare campi molecolari 3D

- **MEP** - Molecular Electrostatic Potential (unit positive charge probe).
- **MLP** - Molecular Lipophilicity Potential (no probe necessary).
- **GRID** - total energy of interaction: the sum of steric (Lennard-Jones), H-bonding and electrostatics (any probe can be used).
- **CoMFA** - standard: steric and electrostatic, additional: H-bonding, indicator, parabolic and others.

CoMFA Model Derivation

- Le molecole sono posizionate in una griglia regolare secondo l'allineamento ideale
- Vengono utilizzate "sonde" per determinare il campo molecolare:

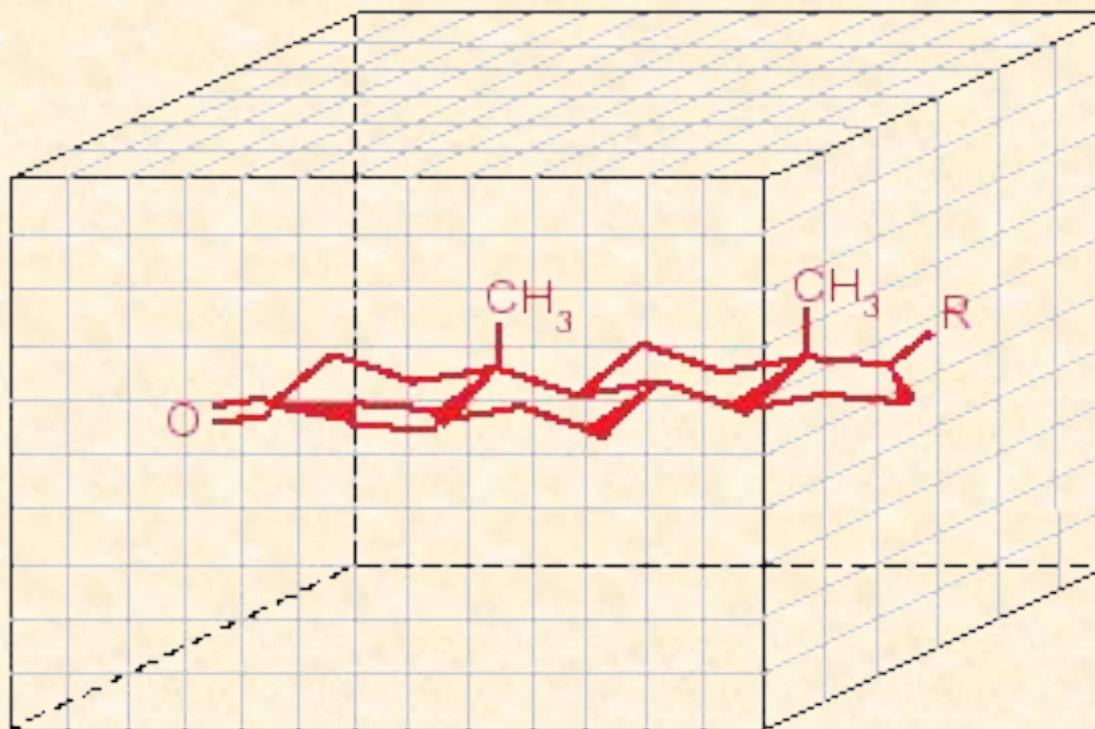
Campo elettrostatico
(la sonda è un atomo carico)

$$E_c = \sum \frac{q_i q_j}{Dr_{ij}}$$

Campo Van der Waals
(la sonda è un carbonio neutro)

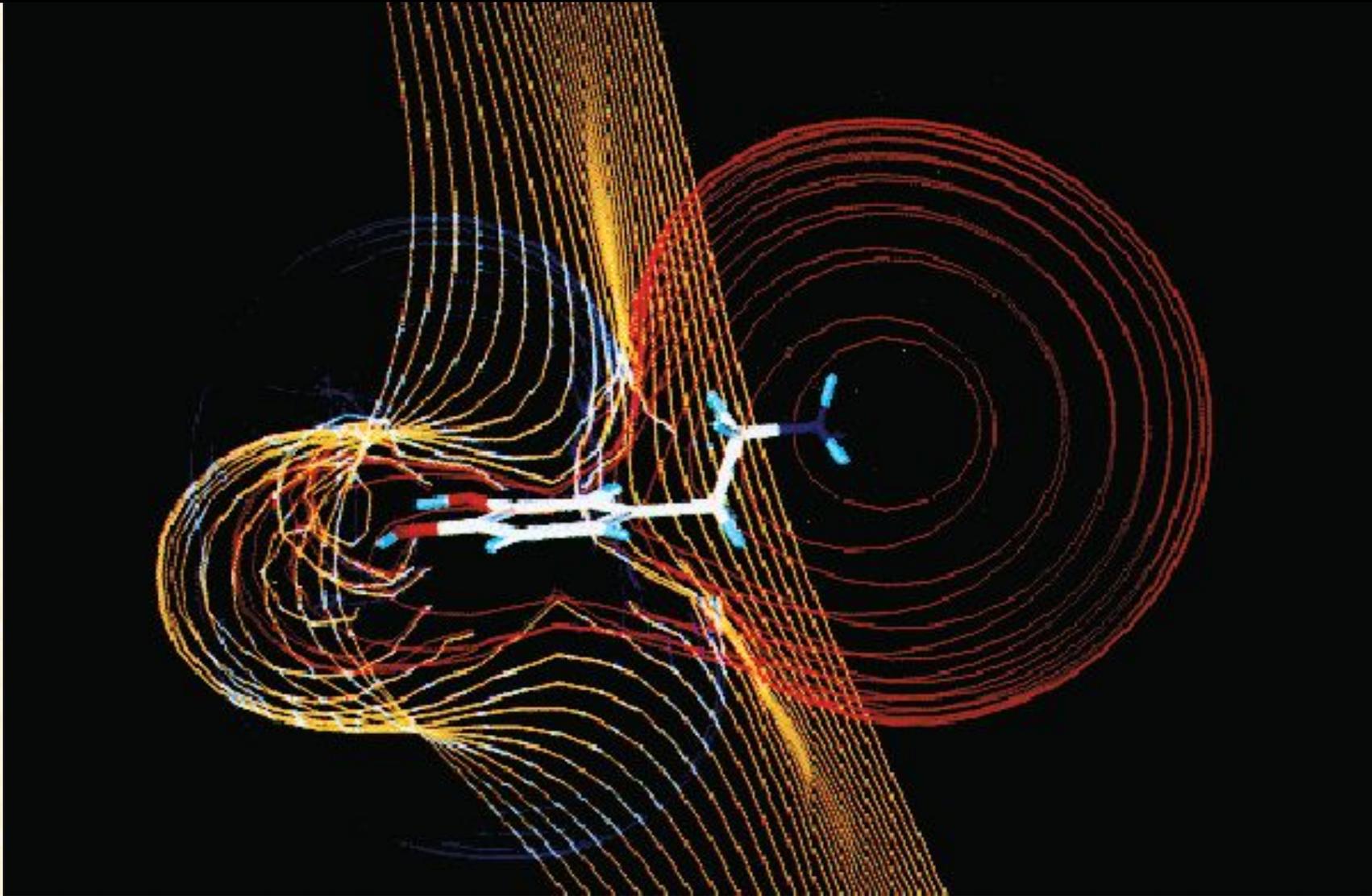
$$E_{vdw} = \sum (A_{ij} r_{ij}^{-12} - B_{ij} r_{ij}^{-6})$$

CoMFA Grid and Field Probe

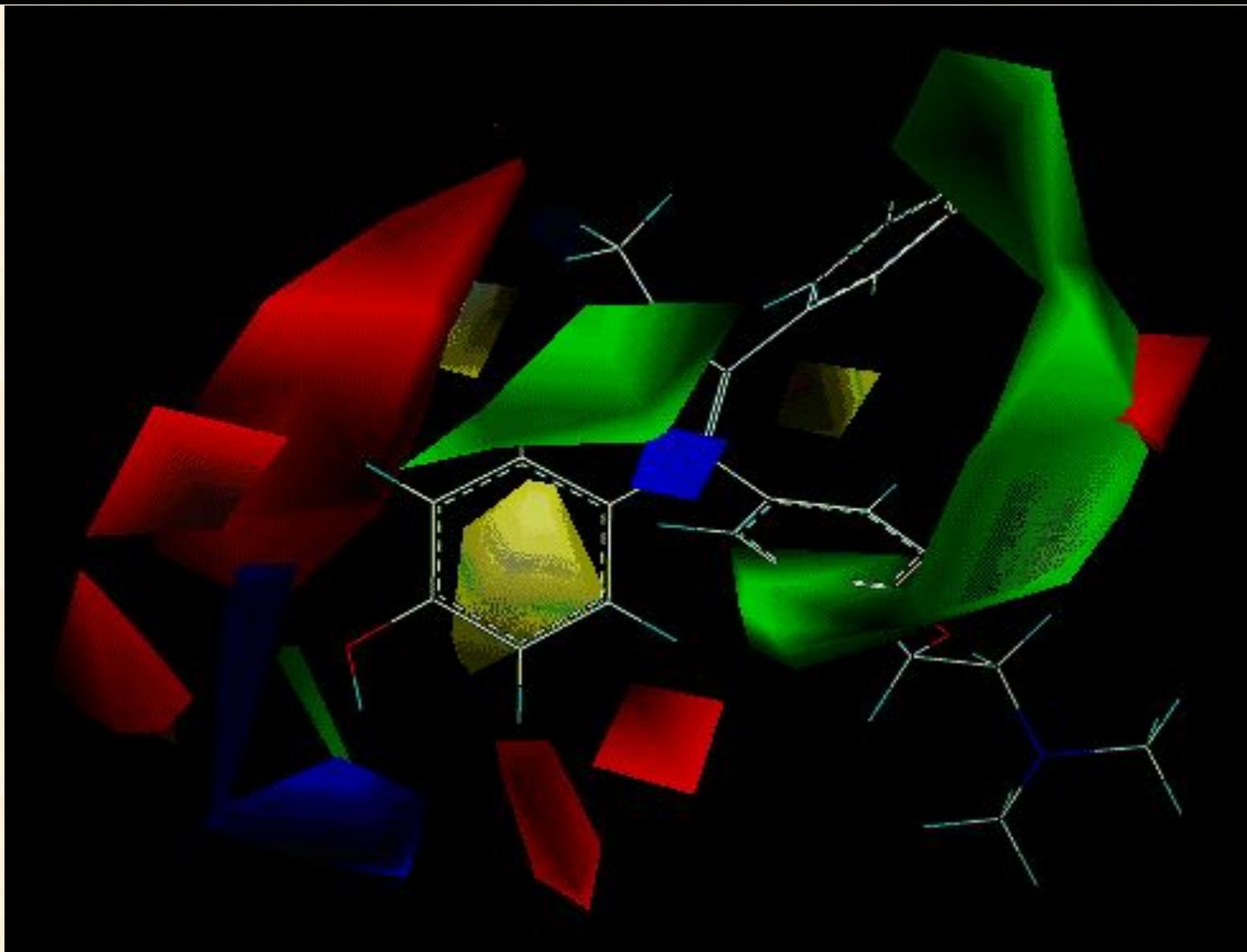


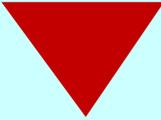
(Only one molecule shown for clarity)

Electrostatic Potential Contour Lines



3D Contour Map for Electronegativity





3D QSAR

- ✓ Il campo sterico descrive dove la molecola è collocata nello spazio.
- ✓ Il campo elettrostatico descrive l'influenza delle cariche atomiche parziali sulle caratteristiche elettroniche dello spazio circostante.
- ✓ Successivamente si calcolano le relazioni tra attività biologica e campi molecolari mediante una tecnica di analisi statistica multivariata (PLS).
- ✓ Infine viene calcolato il contributo all'attività biologica di ciascun valore di energia per ciascun punto della griglia e si disegna la superficie di contorno, a dare la visualizzazione 3D.

CoMFA Pro e Contro

- + Descrive le interazioni recettore-ligando
- + Visualizzazione 3D di caratteristiche importanti
- + Buona correlazione con set correlati
- + Potenza predittiva attraverso l'esplorazione della struttura
- Allineamento spesso difficile
- Richiede esperienza

www.3D-QSAR.com

Build predictive models
using a simple and intuitive
interface on any device.