

Un'ipotesi meccanicistica per l'inattivazione irreversibile dell'enzima cicloossigenasi da parte dell'Aspirina

Paolo Tosco

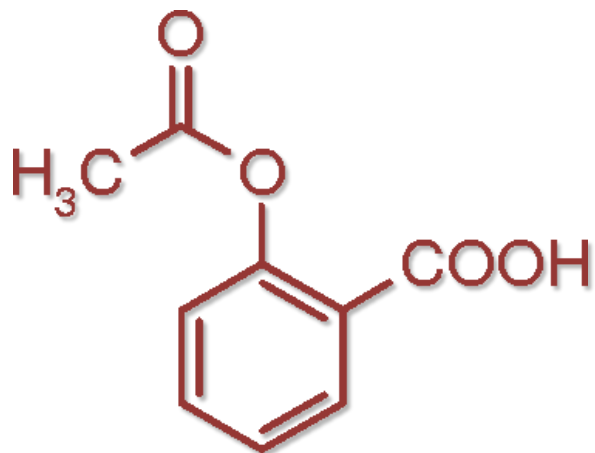
Università
degli Studi
di Torino



Dipartimento
di Scienza
e Tecnologia
del Farmaco



Aspirina: l'antenato di tutti I FANS



Acido acetilsalicilico

Sintetizzato da Felix Hoffmann nel 1897 per acetilazione dell'acido salicilico



Commercializzato nel 1899 dalla Bayer come Aspirina®

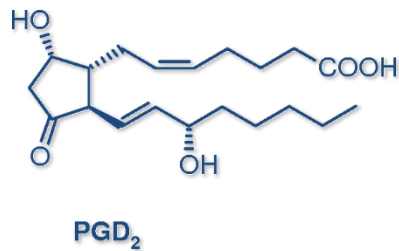
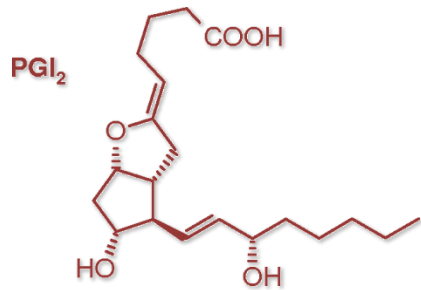


Aspirina® per tutti (?) I gusti

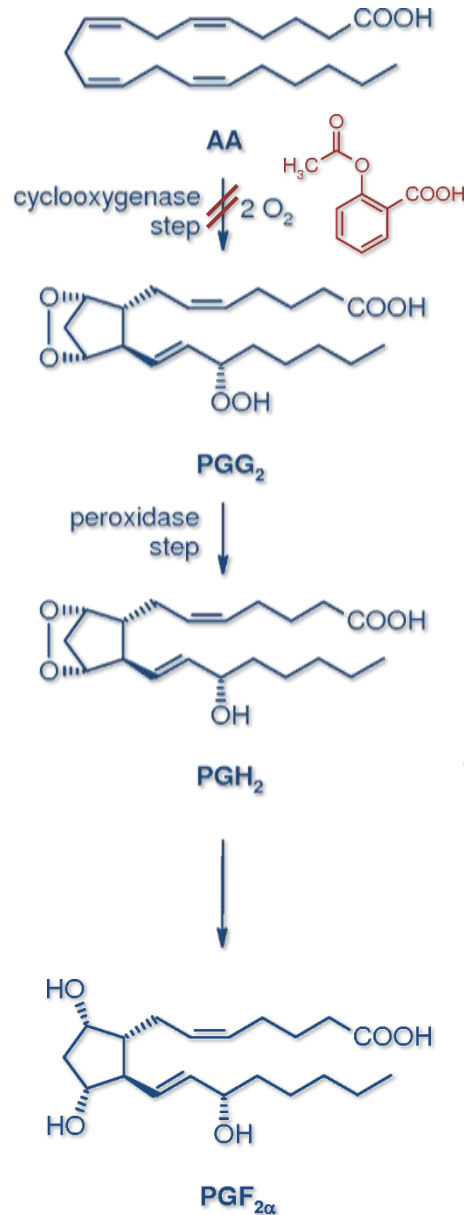




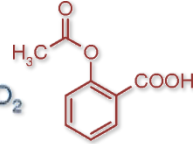
Gastroerosione
come effetto
collaterale
principale



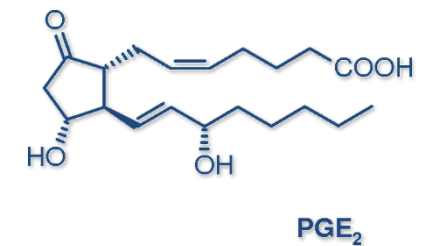
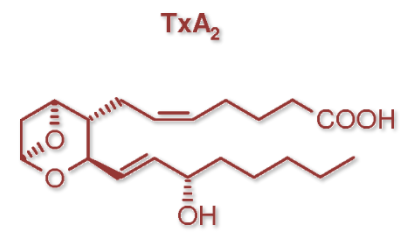
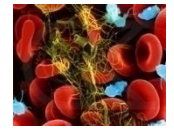
Analgesica



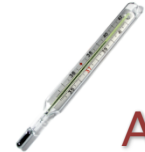
Aspirina:
un inibitore covalente,
irreversibile dell'enzima
cicloossigenasi



Azione
antiaggregante



Antipiretica

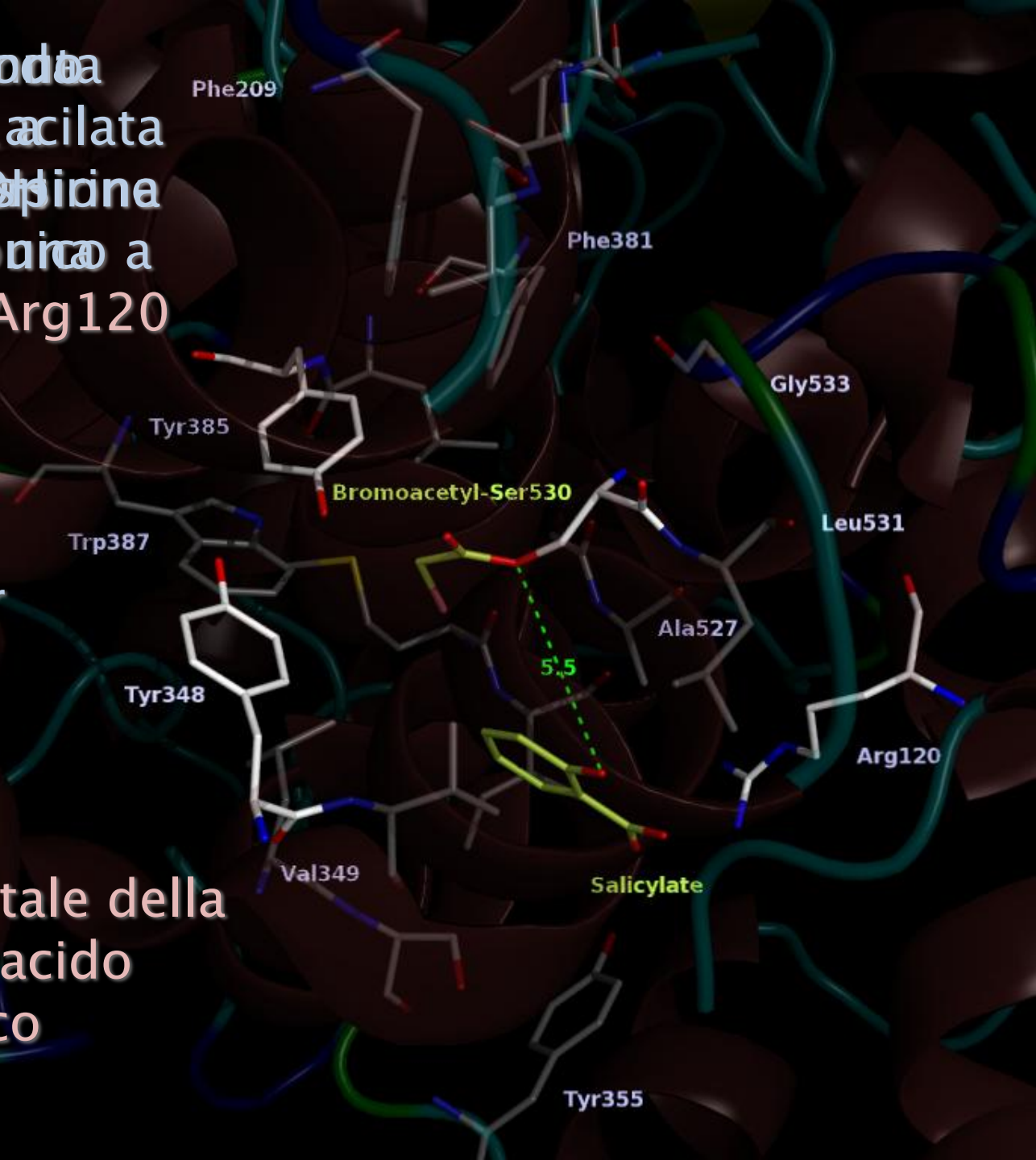


Allo stato libero perviene da
classi di coleptrosi 530 acilata
5.0 Å di distanza da Ser530
di 1.5 Å in un acido piridico a
proprietà ionica con Arg120



Poi l'Aspirina si
sposterebbe di
4 Å verso l'alto per
acetilare Ser530

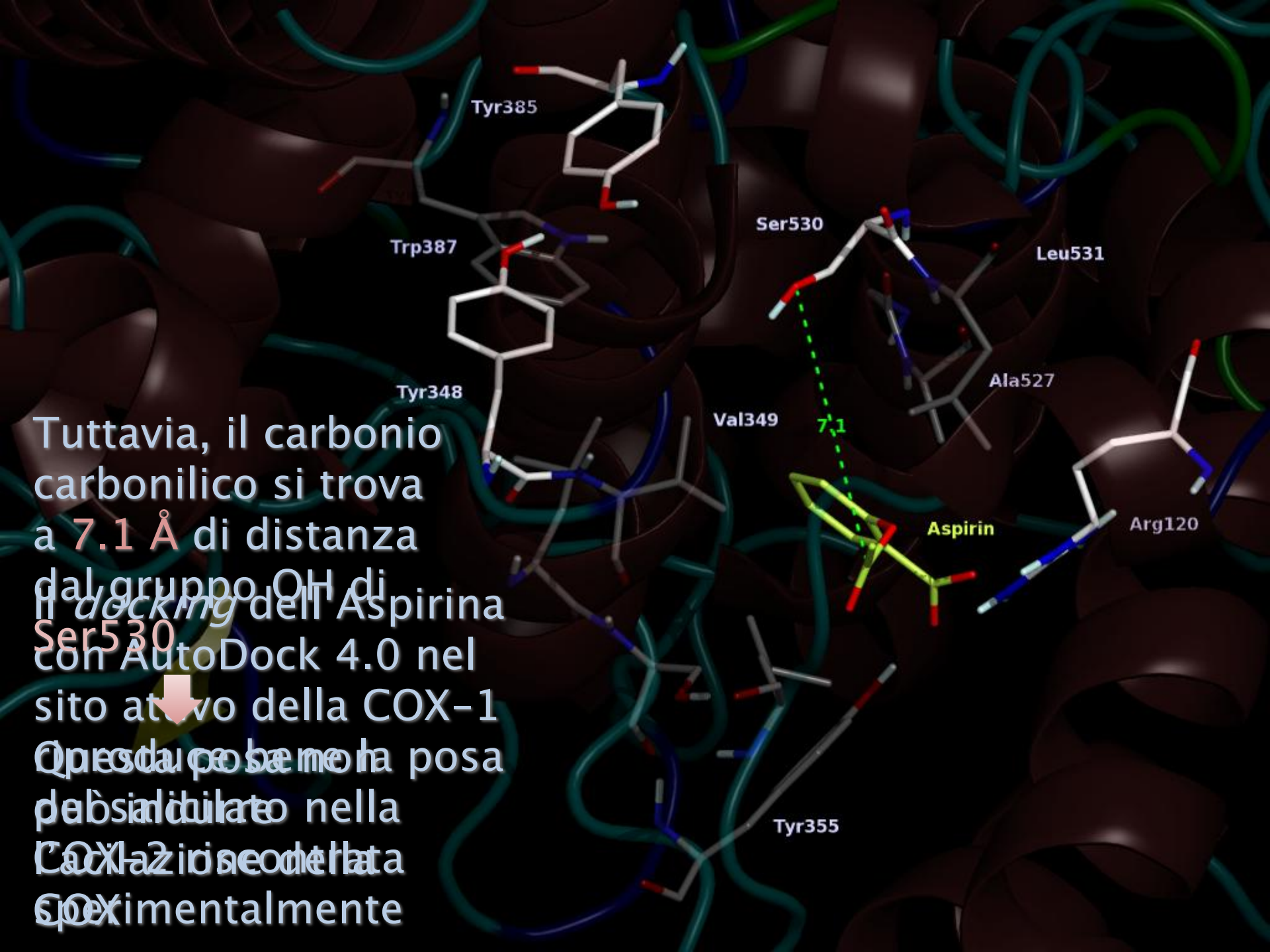
Struttura sperimentale della
COX-2 acilata dall'acido
bromoacetilsalicilico





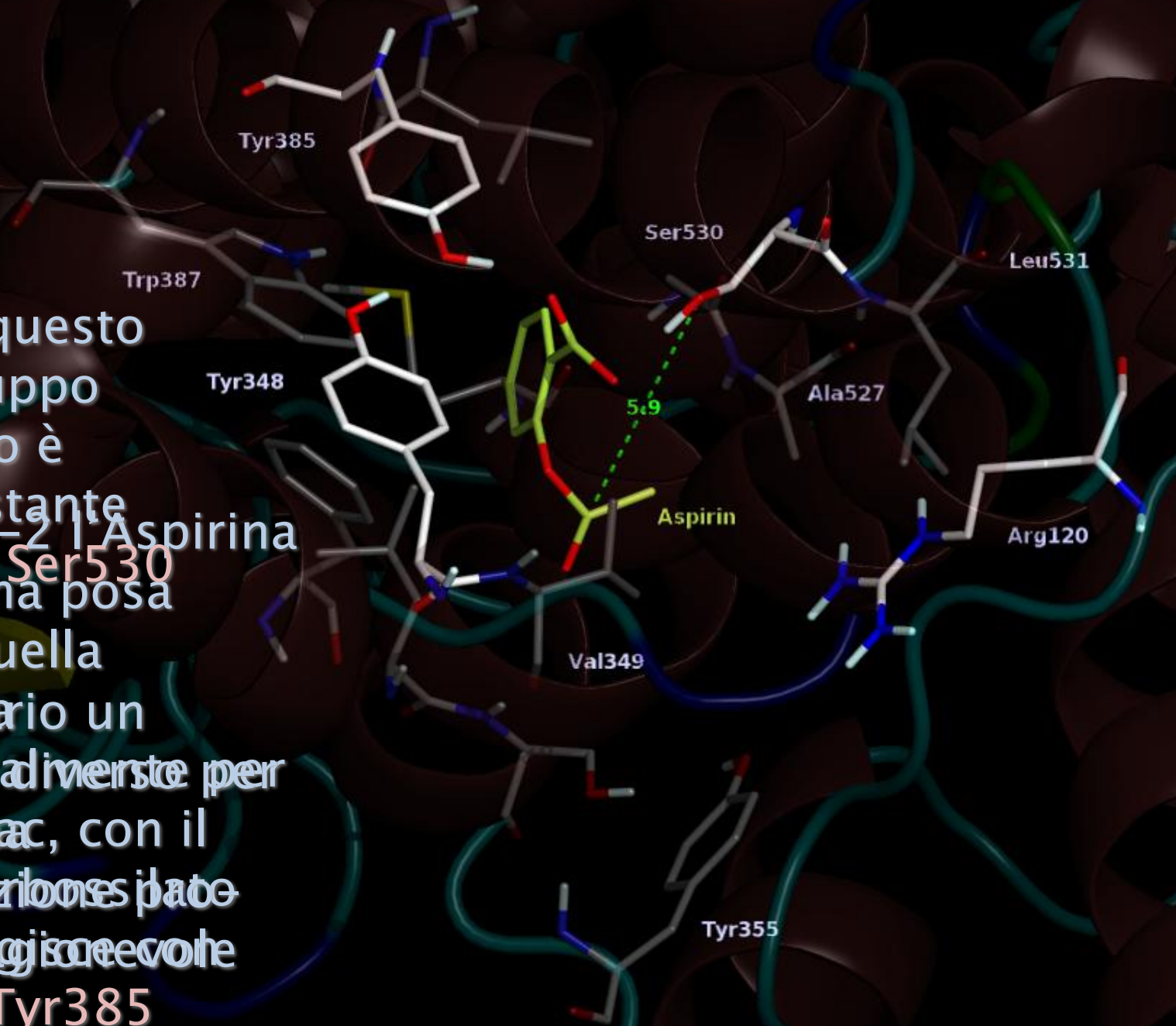
Protocollo di *molecular modelling*

- Inizialmente è necessario cercare di collocare (*docking*) l'Aspirina nella cavità di entrambi gli isoenzimi COX in una posizione in cui il gruppo acetilico si trovi in prossimità di **Ser530**
- Successivamente si esplorerà l'accessibilità energetica dell'acetilazione di **Ser530** a partire da quella posizione mediante un metodo ibrido quantomeccanico/meccanico-molecolare (**QM/MM**)



Tuttavia, il carbonio carbonilico si trova a **7.1 Å** di distanza dal gruppo OH di **Ser530**.
 Il *docking* dell'Aspirina con AutoDock 4.0 nel sito attivo della COX-1. Questa pose si ha nella COX-1 in modo che non è stata sperimentale.

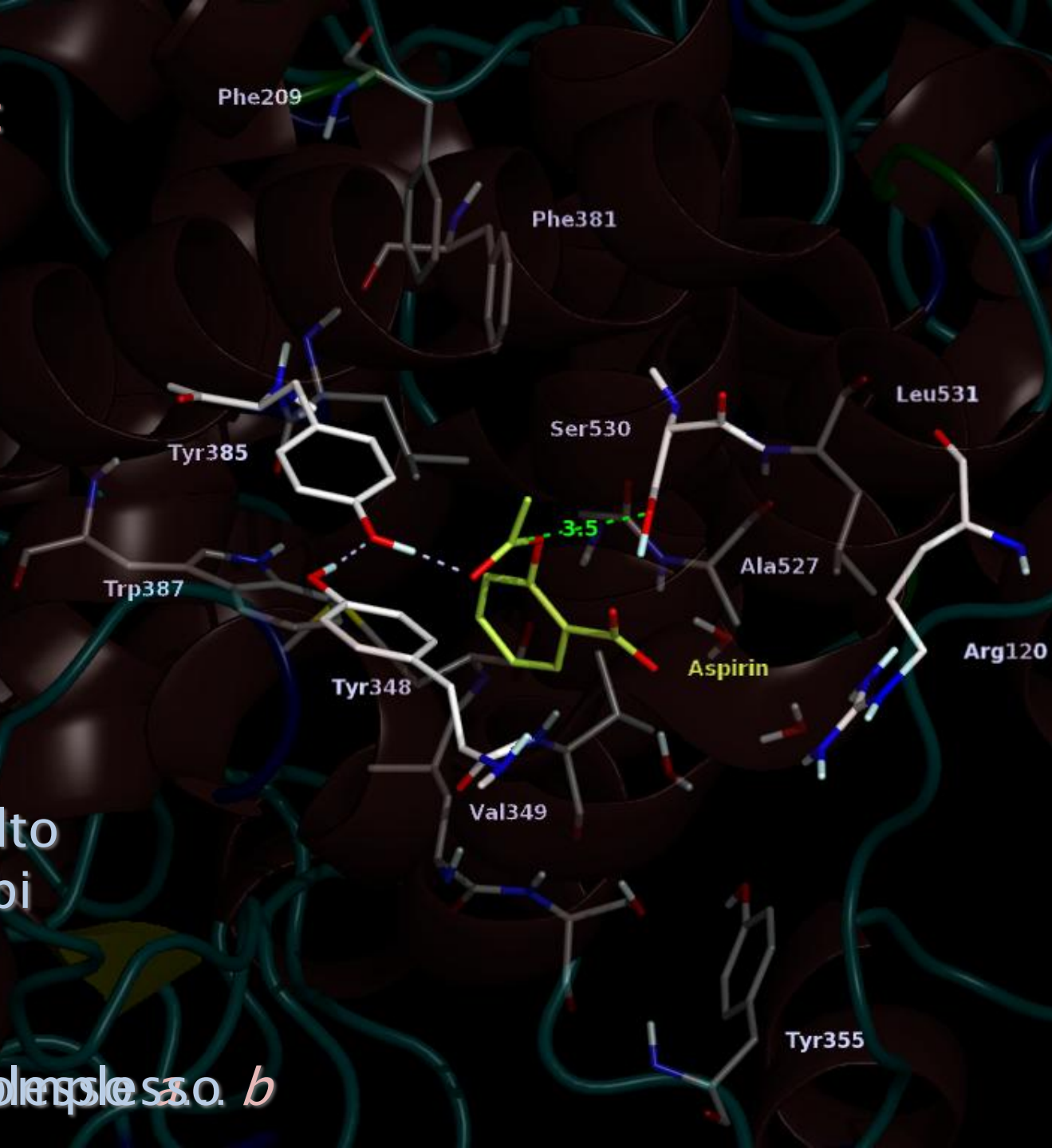
Anche in questo caso il gruppo carbonilico è troppo distante
Nella COX-2 l'Aspirina (5.9 Å) da Ser530 assume una posa simile a quella
↓
È necessario un approssimativo per trovare il farmaco, con il gruppo carbonilico che si abilita a raggiungere Ser530 e Tyr385



Campionamento conformazionale: risultati

La procedura di *simulated annealing* ha consentito di identificare 2 complessi, molto simili su entrambi gli isoenzimi

Questo è il complesso *a* o *b*



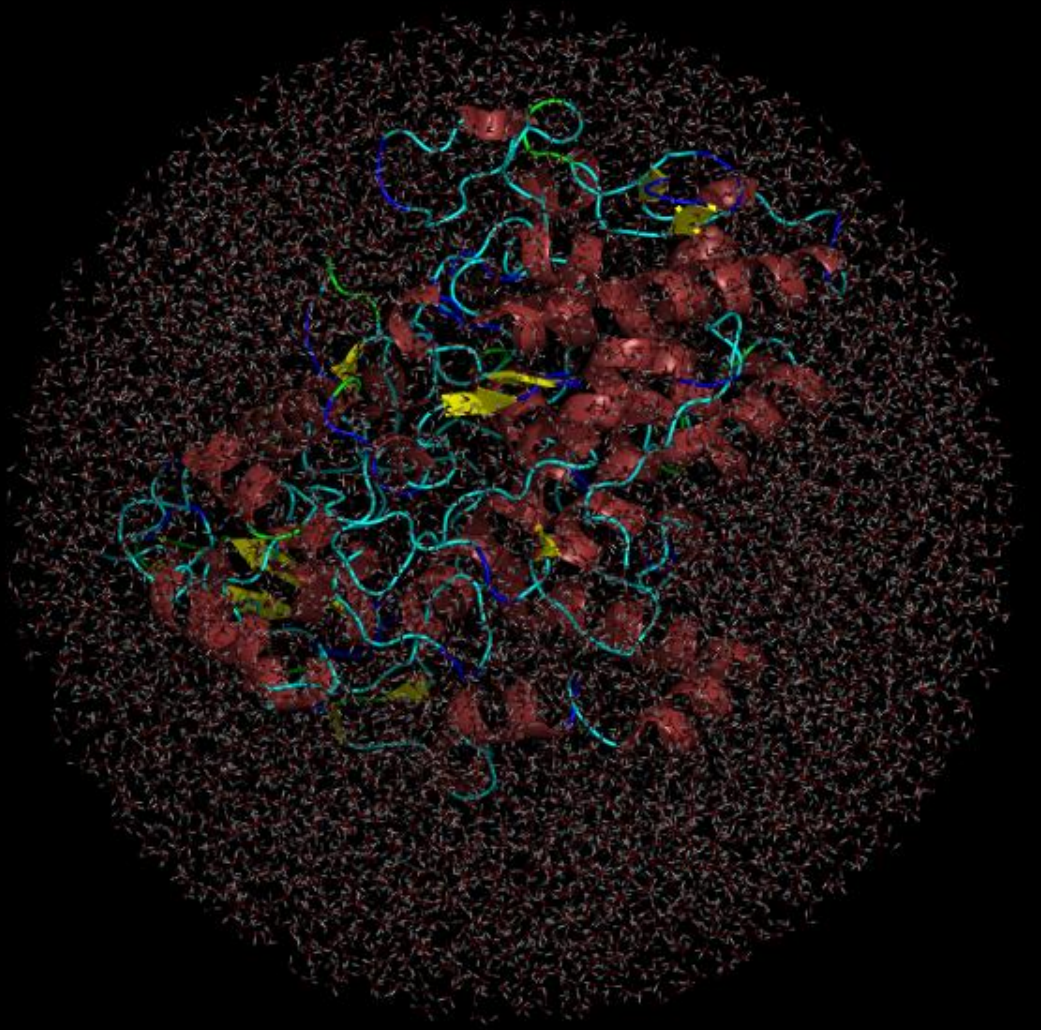
E ora: QM/MM!

Per rivoltare e tracciare i
dove potremmo essere, i
particolarmente, e la sua
popolazione. **MM** è
attiva, e la sua potenziale
distribuzione **QM/MM**

periodico a uno
non-periodico.

In particolare,
Aspirina, Tyr385,
Tyr348, Ser530 e le
quest'ultimo una
molecole d'acqua
sfera di 4.5 Å di
circostanti sono

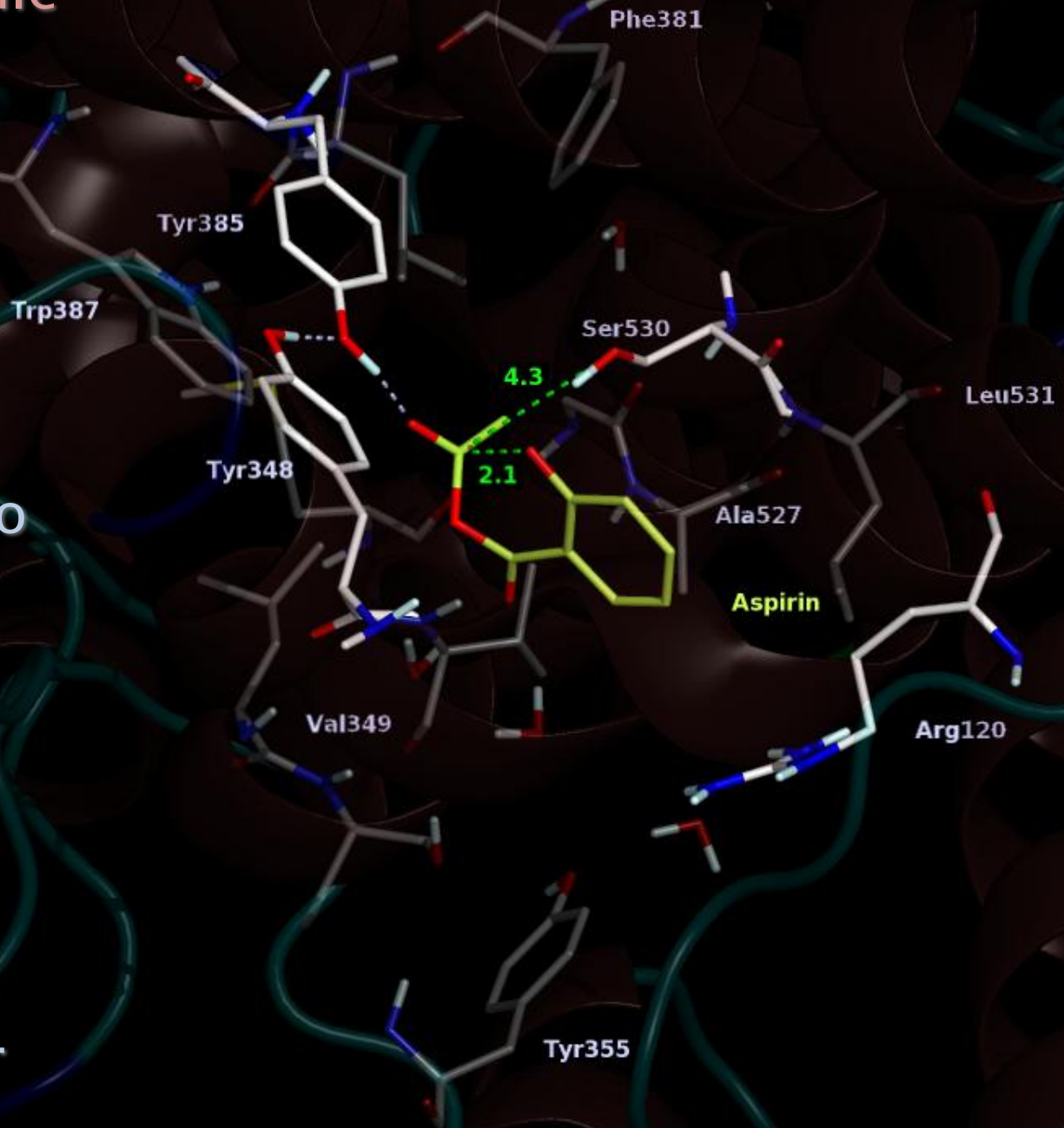
state trattate con il
metodo **QM SCC-
DFTB** implementato
in CHARMM



Migrazione dell'acetile

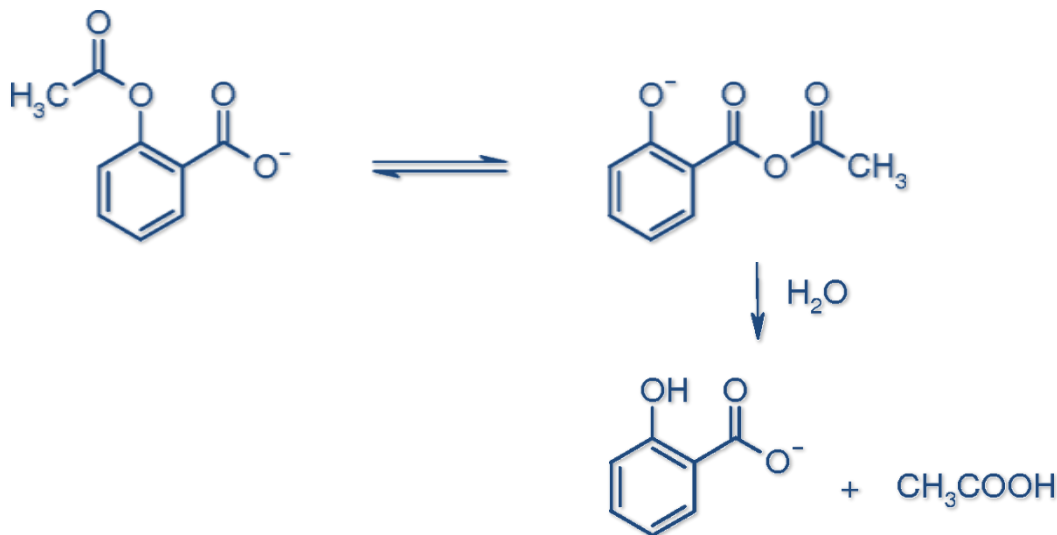
Non appena si è effettuata una ottimizzazione QM/MM della geometria del sistema, si è assistito alla migrazione del gruppo acetilico dal fenolo al gruppo carbossilato, con formazione di un'anidride

Molto promettente...
...o no?



In letteratura si trova spesso qualche ispirazione...

- Negli anni '50 si è osservato che l'Aspirina si comporta da anidride, secondo questo ipotetico equilibrio:



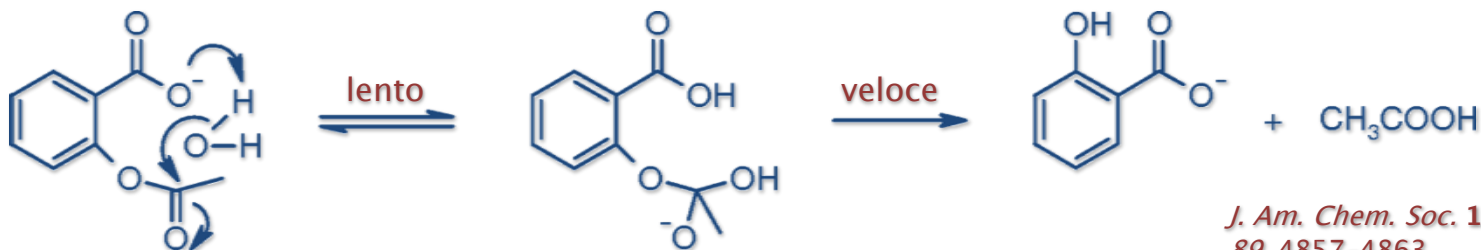
J. Am. Chem. Soc. **1953**,
75, 5984-5986

Chem. rev. **1960**,
60, 53-113

- In seguito è stato proposto che l'idrolisi dell'Aspirina, che avviene in maniera indipendente dal pH nel range di pH 4-8, proceda attraverso un intermedio reattivo di tipo anidridico

In letteratura si trova spesso qualche ispirazione...

- Negli anni '60, lavori indipendenti di Fersht e Jencks hanno dimostrato che l'Aspirina è effettivamente in equilibrio con la sua anidride, ma che la solvolisi avviene per **catalisi basica generale intramolecolare**:



J. Am. Chem. Soc. **1967**,
89, 4857-4863

J. Am. Chem. Soc. **1968**,
90, 3817-3827



L'anione fenossido
nell'intermedio anidridico è
molto più nucleofilo dell'acqua

e degli alcoli, e ha una forte tendenza a rigenerare l'Aspirina in una
reazione intramolecolare piuttosto che reagire con il solvente

Il complesso *b*, invece...

Sono state definite due coordinate di reazione:

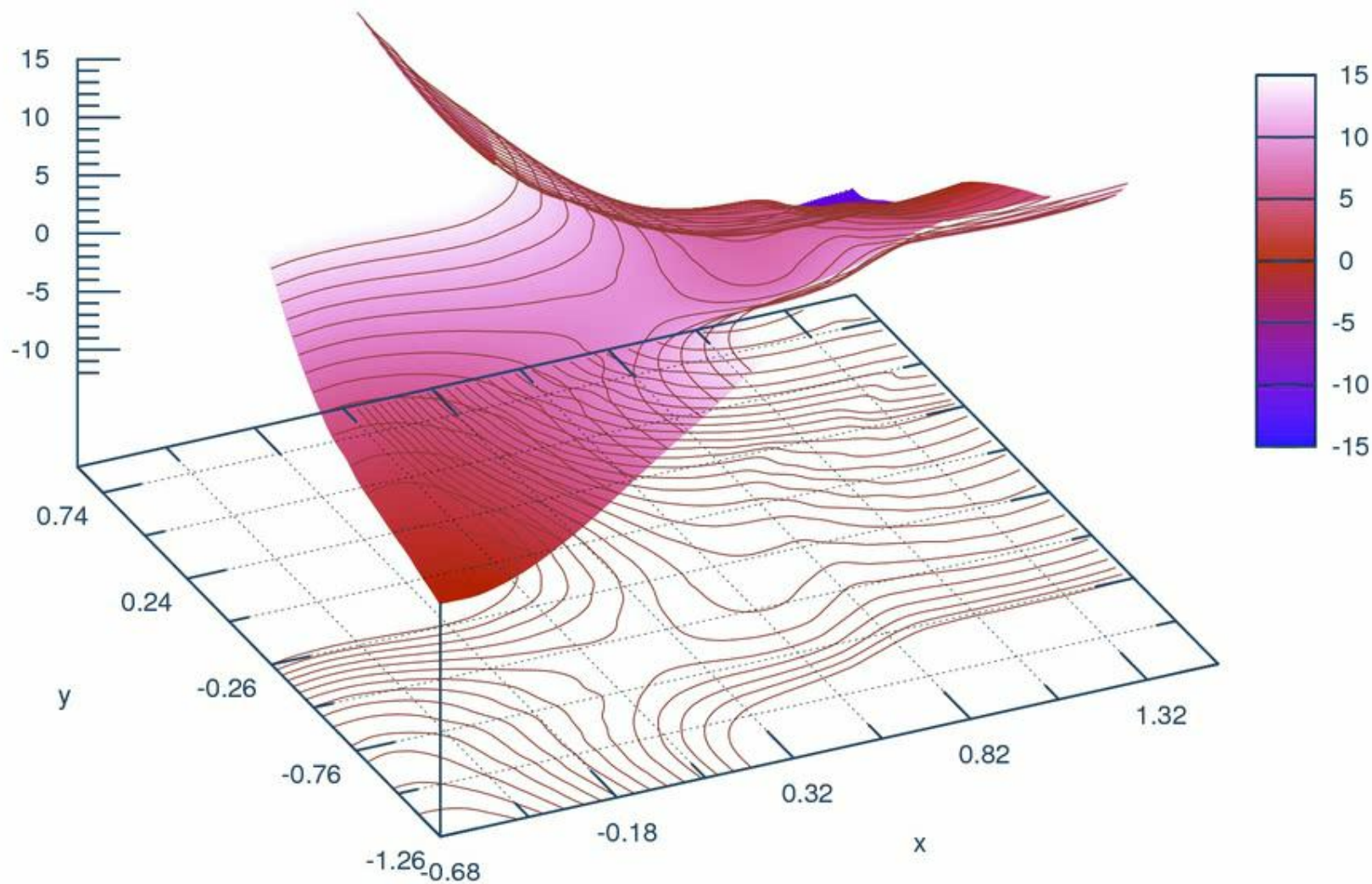
$$X = X_1 - X_2$$

Il complesso *b* si è dimostrato stabile in condizioni QM/MM

È stato calcolata una superficie di energia potenziale (PES) giusta per i reattivi su base angolare e verificata l'esistenza o meno di un minimo di reazione accessibile



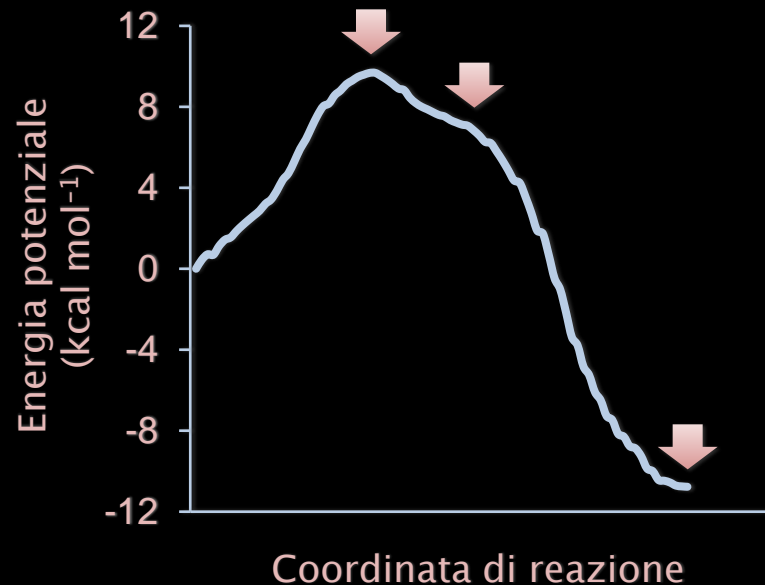
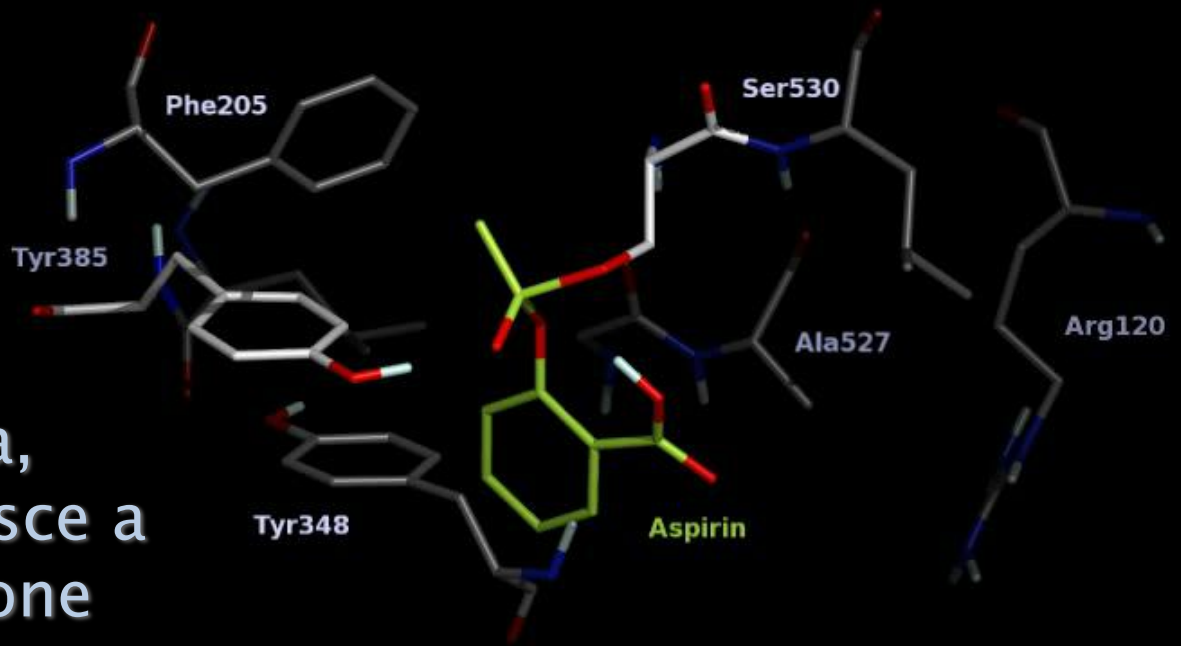
PES per l'acilazione della COX-1 da parte dell'Aspirina

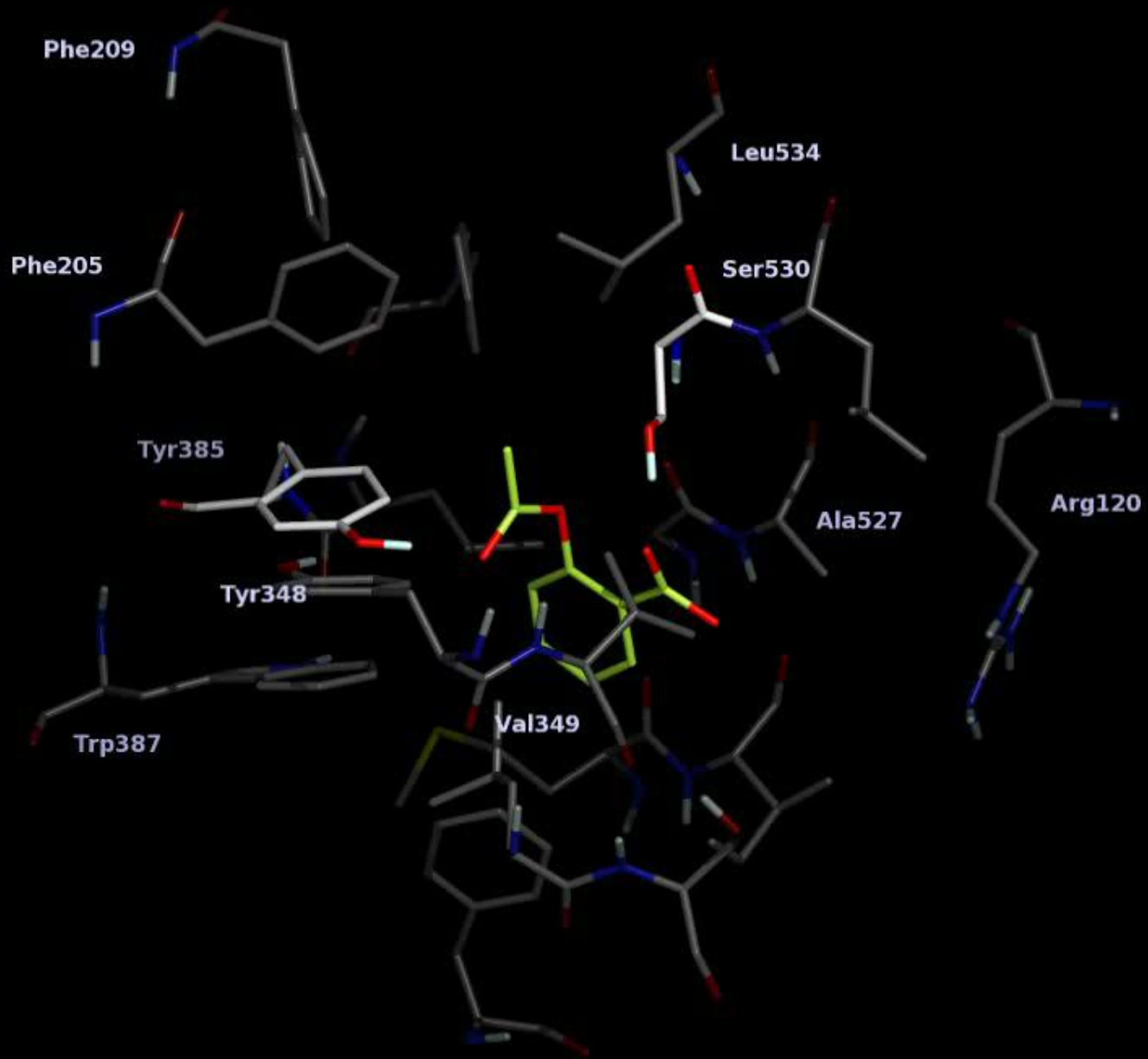


Cammino di reazione per l'acilazione della COX-1 da parte dell'Aspirina

Il primo punto a sella, ben definito, si riferisce a uno stato di transizione in cui il protone della Ser530 si trova circa a metà strada tra i due ossigeni

Il secondo punto a sella è meno netto e si può identificare non come uno stato stabile d'intermedio tetraedrico in passato

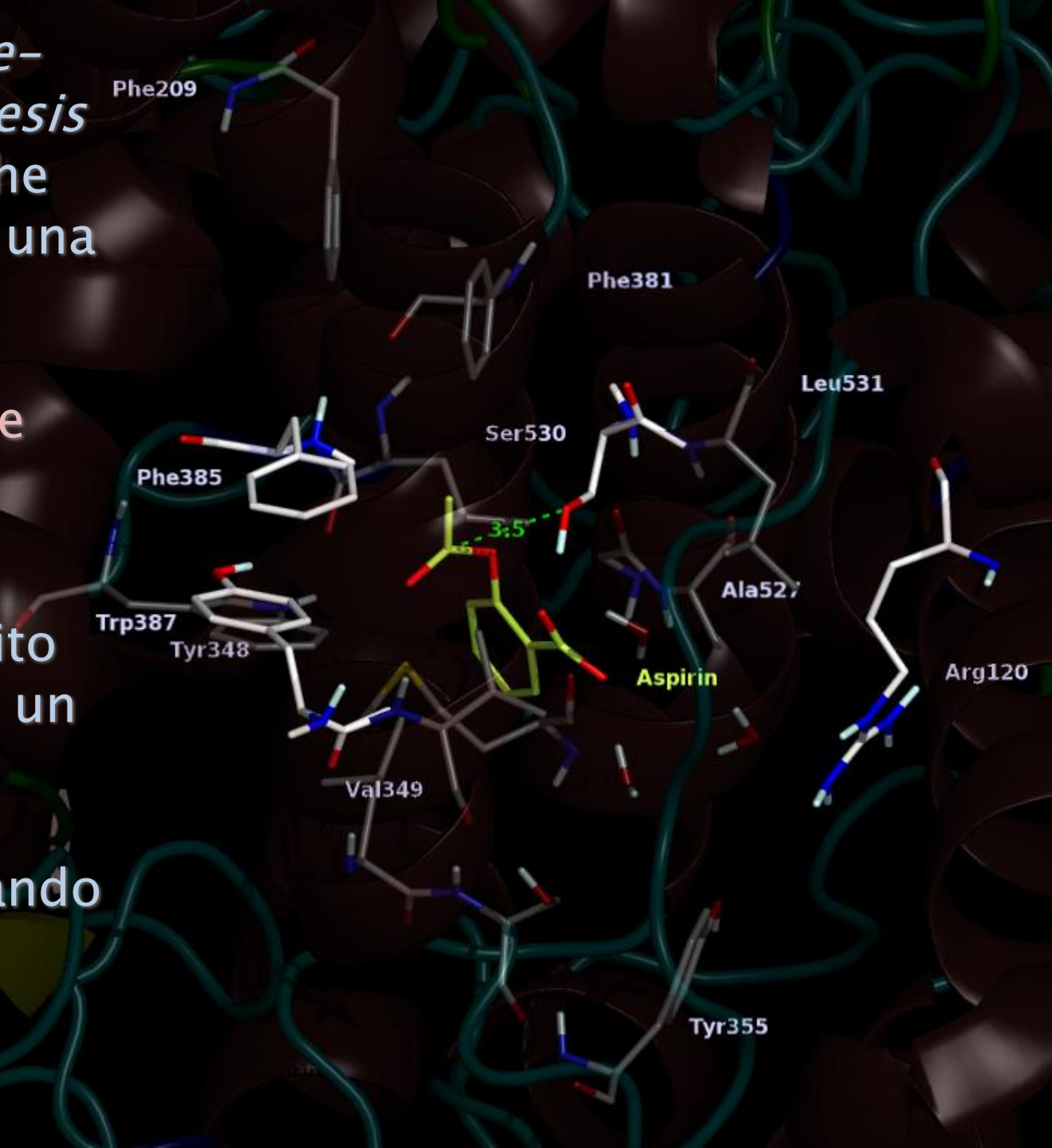


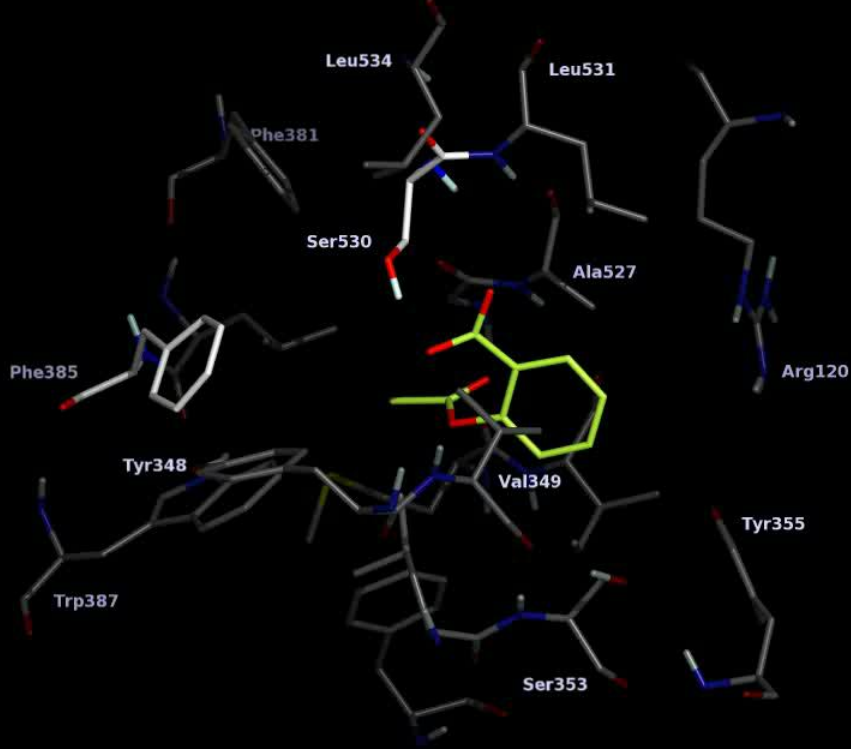


Esperimenti di *site-directed mutagenesis* hanno mostrato che l'Aspirina subisce una forte riduzione dell'attività sui mutanti **Tyr385Phe**



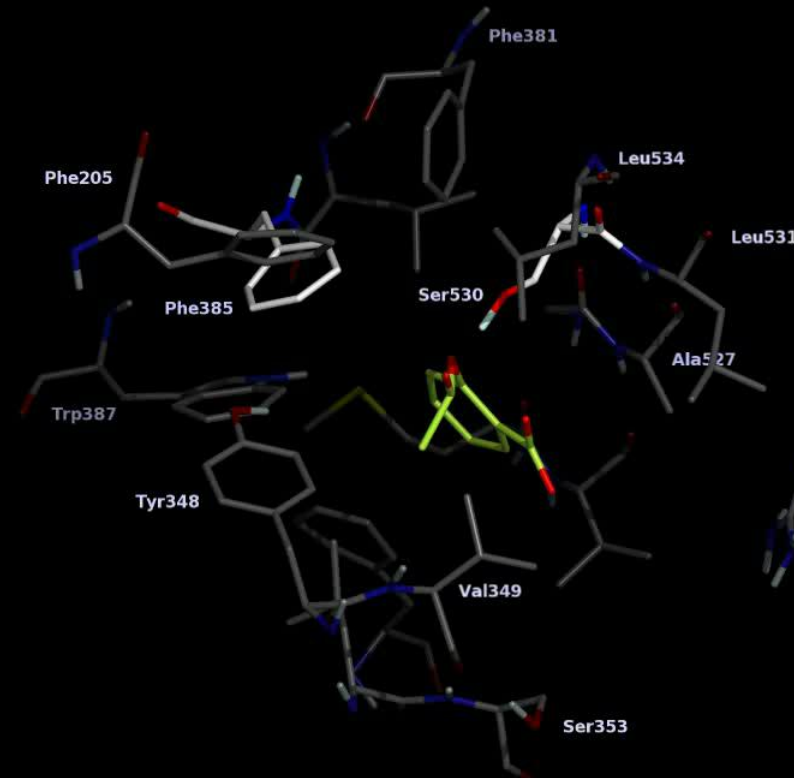
Questo ha suggerito che **Tyr385** giochi un ruolo attivo nel meccanismo di acilazione, orientando e polarizzando il gruppo **C=O**





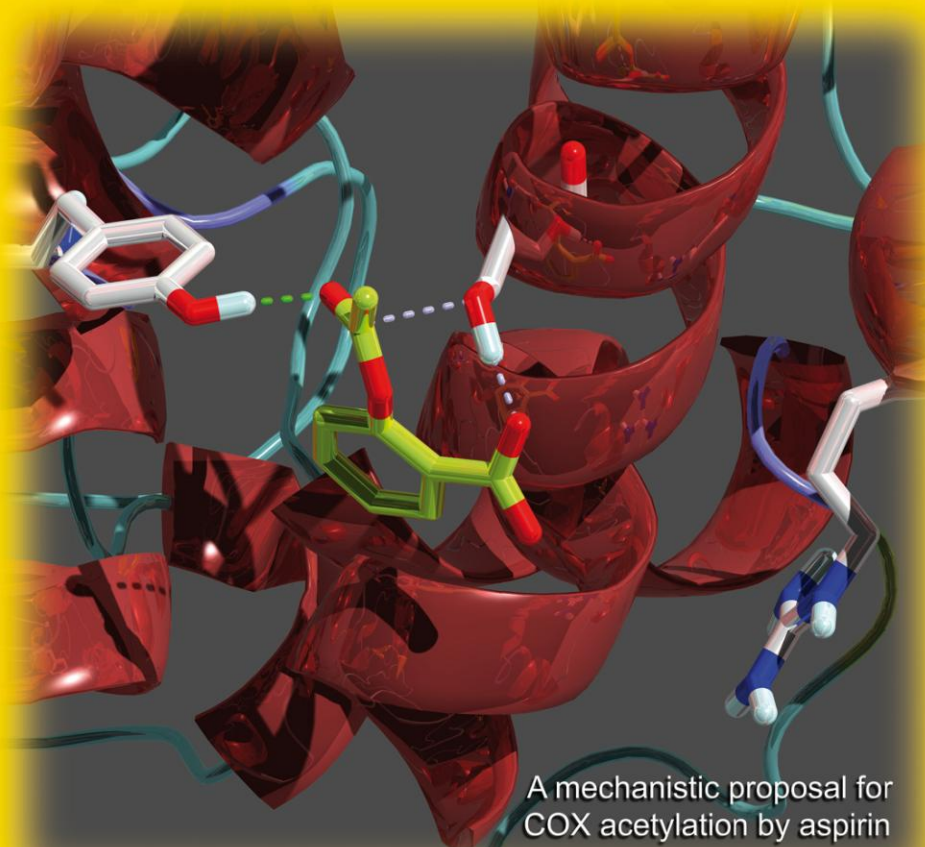
Quest'osservazione dà ulteriore forza ai nostri risultati

In effetti, simulazioni QM/MM condotte sui mutanti **Tyr385Phe** mostrano che, in assenza dell'OH fenolico della tirosina, l'Aspirina fluttua nella cavità della COX senza riuscire ad acilare **Ser530**



CHEM MED CHEM

CHEMISTRY ENABLING DRUG DISCOVERY



A mechanistic proposal for
COX acetylation by aspirin

6/2009

A Journal of



Minireview: Ionotropic Glutamate Receptor Antagonists
(A. Chimirri)

Communication: Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors
(R. Maccari)

SPECIAL ISSUE
XIX NMMC
Verona 2008
Organizer: L. Brasili

www.chemmedchem.org

 WILEY-VCH

Acknowledgments

Prof. A. Gasco
Prof. R. Fruttero
Dr. L. Lazzarato

Dipartimento di
Scienza e Tecnologia
del Farmaco
Università degli Studi
di Torino

MIUR cofin 2005-2007

NicOx Research Institute

ShareGrid

Dr. Massimo Canonico
Dr. Marco Guazzone

