

# **SIMULAZIONE MOLECOLARE DI COMPLESSI HOST-GUEST: APPLICAZIONE AL CASO CICLODESTRINE-FARMACI ANTITUMORALI**

Sabrina Pricl, Maurizio Fermeglia, Alessia Lodi

Dipartimento di Ingegneria Chimica, dell'Ambiente e delle Materie Prime, Università degli Studi di Trieste,  
Piazzale Europa 1, 34127 Trieste

## **INTRODUZIONE**

L'incidenza, la distribuzione geografica ed il comportamento dei vari tipi di cancro sono legati a molteplici fattori comprendenti sesso, età, razza, predisposizione genetica ed esposizione a fattori cancerogeni ambientali. Quale che ne sia la causa, il cancro è sostanzialmente una malattia delle cellule caratterizzata da una deviazione nei meccanismi di controllo che presiedono alla proliferazione e differenziazione cellulare. Le cellule che sono andate incontro a trasformazione neoplastica proliferano in maniera eccessiva, e formano tumori locali che possono comprimere o invadere le strutture normali adiacenti. I processi invasivi e metastatici, così come una serie di alterazioni metaboliche causate dal tumore, determinano i sintomi della malattia ed eventualmente la morte del paziente, a meno che il tumore non possa venir eradicato in tempo con un opportuno trattamento. Allo stato attuale, un terzo dei pazienti affetti da cancro viene guarito con provvedimenti locali (interventi chirurgici o radioterapia), terapie queste abbastanza efficaci quando l'affezione neoplastica non sia ancora disseminata al momento del trattamento. Una diagnosi precoce potrebbe aumentare le possibilità di guarigione dei pazienti per mezzo di queste terapie locali; comunque, nei rimanenti casi il tumore è caratterizzato da precoci micrometastasi e ciò indica che, per un efficace trattamento dell'affezione neoplastica, è necessario anche un trattamento per via sistemica (spesso in associazione alla terapia chirurgica e radiante) quale quello che può essere ottenuto con la chemioterapia. Attualmente, circa il 50% dei pazienti sofferenti di cancro può andare incontro a guarigione, e la chemioterapia contribuisce al risultato per il 17% (1). Durante l'ultimo trentennio si sono moltiplicati gli sforzi coordinati intesi a trovare farmaci antineoplastici efficaci, sia mediante procedimenti empirici di screening, sia in base ad una programmazione razionale delle sintesi chimiche. Ovviamente, farmaci antineoplastici ideali dovrebbero essere quelli capaci di distruggere soltanto le cellule tumorali, senza danneggiare quelle dei tessuti normali. Sfortunatamente, ben pochi principi attivi possiedono tale requisito, e l'uso di tali farmaci deve essere preceduto da una scrupolosa valutazione del rapporto effetto/tossicità. I farmaci di concezione classica attualmente impiegati nella lotta contro il cancro si possono suddividere in quattro grandi gruppi, dipendentemente dal loro meccanismo di azione: 1) agenti alchilanti, ovvero farmaci che esercitano gli effetti citotossici attraverso il trasferimento dei loro gruppi alchilici a vari costituenti cellulari; 2) antimetaboliti, che interferiscono sostanzialmente a livello della sintesi dei nucleotidi e degli acidi nucleici e 3) inibitori delle topoisomerasi, cioè l'enzima che media la scissione e il successivo ricongiungimento dei filamenti singoli del DNA.

Data l'elevata tossicità e il grande numero di effetti collaterali cui il paziente va incontro durante il trattamento con farmaci antitumorali, in questo studio abbiamo analizzato la possibilità di includere alcuni dei principi attivi appartenenti ai diversi gruppi nella beta-ciclodestrina. Al fine di progettare un sistema per rilascio dei farmaci (DDS) sono attualmente allo studio numerosi tipi di materiali ad elevate prestazioni in grado di depositare il principio attivo al sito target per il tempo necessario, espletando tali azioni in maniera efficiente e

precisa. Le ciclodestrine (CD) sono molecole potenzialmente candidate a svolgere un tal ruolo, in virtù della loro capacità di alterare le proprietà fisiche, chimiche e biologiche delle sostanze ospiti, attraverso la formazione di complessi di inclusione sia allo stato solido che in soluzione. Tali oligosaccaridi ciclici sono formati da un certo numero di residui glucopiranosidici legati covalentemente con legame alfa-1,4. Esistono tre strutture di base note per le CD, che differiscono sostanzialmente per il numero di unità monosaccaridiche: l'alfa-ciclodestrima, a sei unità, la BCD a sette e la gamma-CD, caratterizzata da otto unità glucopiranosidiche. Tutte le CD hanno, come caratteristica comune, l'esistenza di una cavità idrofobica centrale dal diametro compreso tra 0.6 – 1 nm, circondata da un anello idrofilico formato dai gruppi OH. I processi di complessazione dipendono dalla dimensione, dalla forma e dal carattere idrofobico della molecola ospite. Sostanzialmente, le principali forze che concorrono alla stabilizzazione del complesso host-guest sono le interazioni di van der Waals, responsabili per la stabilità dei complessi sia in acqua che in vacuo, e le interazioni idrofobiche, nel caso di sistemi acquosi. Altre interazioni importanti sono i legami idrogeno tra la molecola ospite e gli OH della CD, il rilascio di energia di strain da parte dell'anello della CD e, ultime solo per ordine di elencazione ma di topica importanza, le interazioni coulombiane e dipolo-dipolo.

In questo lavoro riportiamo i risultati di un dettagliato studio di simulazione molecolare condotto sia in vitro che in ambiente acquoso sui possibili complessi di inclusione tra la BCD ed una serie di farmaci antitumorali appartenenti alle varie classi di azione, con lo scopo di investigare la natura delle interazioni molecolari e dei fenomeni di inclusione CD-farmaco, di valutare le energie di interazione e di condurre un'analisi dei contributi energetici di tali complessi. I risultati di tale studio potranno essere sfruttati per una progettazione di opportuni DDS in questo ancora critico settore farmacologico.

## **DETTAGLI COMPUTAZIONALI**

Tutte le simulazioni sono state eseguite su una Silicon Graphics Origin 200 usando il software *Cerius<sup>2</sup>* (v.4.2) e *Materials Studio*, entrambi della Molecular Simulations Inc. (san Diego, USA). La struttura di partenza della beta-ciclodestrina (BCD) usata nelle simulazioni era quella cristallografica (2). Tale struttura è stata quindi rilassata via meccanica molecolare usando il force field COMPASS (3). L'ottimizzazione iniziale della posizione degli atomi di idrogeno è stata condotta attraverso l'uso di una tecnica combinata di minimizzazione dell'energia dell'intera BCD di tipo steepest descent/Newton-Raphson, ponendo come criterio di convergenza 0.00001 kcal/mole/Å. Le interazioni di non-legame a lungo raggio sono state trattate applicando opportune distanze di cut-off e, per evitare discontinuità indotte dalla presenza dei cut-off, è stato usato il metodo delle spline cubiche. I parametri delle distanze e delle energie di van der Waals per le interazioni di non legame tra atomi eteronucleari sono stati calcolati con la regola di combinazione di tipo 6<sup>th</sup>-power proposta da Walman e Hagler (4). I dettagli strutturali delle molecole isolate sono stati ottenuti da simulazioni di dinamica molecolare (MD) nell'insieme canonico (NVT) a 35, 37 e 39 C. Per il calcolo delle energie in ambiente acquoso, 300 molecole d'acqua sono state confinate, assieme a una molecola di complesso (o di farmaco o di BCD), in una cella cubica alla quale sono state applicate le condizioni periodiche al contorno (PBC). Come modello rappresentativo dell'acqua è stato preso il modello simple 3-point charge (SPC), che si è dimostrato particolarmente valido nel descrivere le proprietà di bulk dell'acqua a temperature ordinarie (5). Per minimizzare l'artificialità della periodicità, la distanza di cut-off è stata posta uguale a metà della lunghezza della cella. Le strutture risultanti sono state rilassate ancora con l'uso del COMPASS; in questo caso, per il calcolo delle interazioni di non legame è stata impiegata la

tecnica di Ewald Ogni simulazione MD è stata iniziata assegnando un set di velocità atomiche iniziali in accordo con una distribuzione di tipo Maxwell-Boltzmann a  $2xT$ , essendo  $T$  la temperatura della simulazione. La temperatura è stata controllata con un accoppiamento debole ad un bagno (6), con costante di accoppiamento  $\tau_T=0.01$  ps. Le equazioni Newtoniane del moto sono state integrate usando l'algoritmo di leapfrog Verlet (7), usando un intervallo di integrazione pari a 1 fs. Il tempo totale di simulazione era pari a 300 ps.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

La Figura 1 mostra, a titolo di esempio, il modello molecolare ottimizzato del complesso di inclusione tra la BCD e il pipobroman (NSC 25154), farmaco antitumorale appartenente alla classe degli agenti alchilanti usato nella terapia dei carcinomi ovarici, del colon, della pelle e in alcuni casi di leucemia.

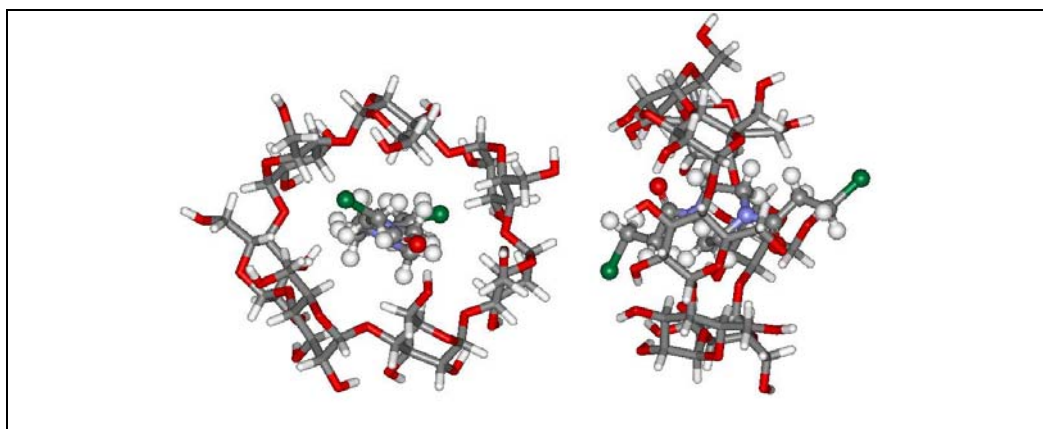


Figura 1: Modelli molecolari ottimizzati del complesso di inclusione tra la BCD ed il pipobroman: visione assiale (a sinistra) e visione laterale (a destra).

I risultati della simulazione dinamica su tale complesso hanno dimostrato che, sia nel vuoto che nel sistema acquoso, il sistema BCD-pipobroman è stabile (vedi Tabella 1). Le energie di complessazione sono state calcolate a partire dalle componenti dell'energia ottenute dalla simulazione dinamica per il complesso, la BCD ed il farmaco usando la seguente relazione:  $E_{\text{compl}} = E_{\text{BCD-farmaco}}^{\text{nonleg}} - E_{\text{BCD}}^{\text{nonleg}} - E_{\text{farmaco}}^{\text{nonleg}}$ . La Tabella 1 riporta inoltre i valori dell'energia di complessazione per un set di altri farmaci considerati. L'acivicin (NSC 163501) appartiene alla classe degli antimetaboliti dell'RNA/DNA mentre la tiocolchicina (NSC 361792) è un agente antimetotico.

Farmaco	$E_{\text{compl}}^{\text{vuoto}}$ (kcal/mole)	$E_{\text{compl}}^{\text{acqua}}$ (kcal/mole)
pipobroman	-21.3	-37.8
acivicin F_OH_prim	-25.5	+99.1
acivicin F_OH_sec	-22.6	-33.7
tiocolchicina SCH <sub>3</sub> _OH_prim	-27.8	+69.6
tiocolchicina SCH <sub>3</sub> _OH_sec	-32.1	+75.9

Tabella 1: Valori dell'energia di complessazione per alcuni farmaci antitumorali nella BCD a 37C.

Prima di commentare ulteriormente i dati riportati in Tabella 1, è interessante osservare che, mentre il pipobroman è una molecola simmetrica, gli altri due farmaci i cui dati sono riportati in Tabella 1 non lo sono. Pertanto, in quest'ultimo caso sono state considerate le geometrie ottimizzate relative alle due possibili orientazioni del farmaco nel complesso. Per semplicità, l'orientazione in cui un determinato gruppo funzionale puntava verso il perimetro degli OH primari è stata denominata nomegruppo\_OH\_prim mentre nell'altro caso è stato denominata nomegruppogruppo\_OH\_sec. Il confronto dei dati in Tabella 1 è estremamente significativo. Le forze che mantengono il farmaco all'interno della cavità della BCD sono i legami idrogeno tra i gruppi polari dell'ospite e gli OH sulla superficie esterna della BCD, e le interazioni idrofobiche tra i nuclei idrocarbonici del farmaco e l'interno della cavità della BCD. L'agente alchilante simmetrico pipobroman ( $C_{10}H_{16}O_2N_2Br_2$ ) presenta lo stesso comportamento in vacuo e in acqua e in entrambi i casi, come si è già osservato, il complesso è stabile e rimane tale per tutto il tempo della simulazione. L'analisi del modello durante le varie fasi della simulazione indica che l'anello eterociclico è perfettamente inserito nella cavità della BCD mentre i gruppi idrofilici sono esposti al solvente, e possono inoltre formare legami idrogeno con i gruppi OH presenti nell'anello esterno della BCD. Nel caso dell'acivicin, invece, le due possibili orientazioni del farmaco rispetto ai gruppi OH primari o secondari della BCD sono nettamente diverse da un punto di vista energetico, essendo termodinamicamente favorita quella che vede il gruppo F rivolto verso gli OH secondari. La tiocolchicina, infine, mostra un comportamento differente *in vacuo* e in soluzione. Infatti, in soluzione il farmaco migra verso l'esterno della cavità durante il corso della simulazione, e, dopo 300 ps, la tiocolchicina è uscita completamente dalla BCD.

Per tutti i farmaci dire che, in assenza di solvente, il bilancio tra interazioni idrofobiche che si esplicano all'interno della cavità e i legami idrogeno che si formano tra i gruppi polari dei farmaci e i bordi esterni della BCD sono forti a sufficienza per mantenere il principio attivo all'interno della cavità. In presenza del solvente, in particolare della tiocolchicina, la cavità della BCD non è sufficientemente grande da evitare le repulsioni steriche e, poiché l'acqua compete con i gruppi polari del farmaco per la formazione di legami idrogeno con gli OH della BCD, il farmaco alla fine viene estratto dalla cavità.

#### **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- (1) Katzung, B.G., *Basic & Clinical Pharmacology*, 7a edizione, Appleton and Lange, Stamford (CT, USA) (1998).
- (2) Manor, P.C., Saenger, W., *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 3639 (1974).
- (3) Rappé, A. K. and Goddard III, W. A., *J. Phys. Chem.*, 95, 3358 (1991).
- (4) Waldman, M. and Hagler, A. T., *J. Comput. Chem.*, 14, 1077 (1993).
- (5) Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Di Nola, A., van Gunsteren, W.F. and Hermans, J., in *Intermolecular Forces*, B. Pullman Ed., Reidel Dordrecht, The Netherlands, pp. 331-342 (1981).
- (6) Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Di Nola, A., van Gunsteren, W.F. and Haak, J.R., *J. Chem. Phys.*, 81, 3684 (1984).
- (7) Verlet, L., *Phys. Rev.*, 159, 98 (1967).