



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Σχεδιασμός καινοτόμων αναστολέων της ρενίνης και
της HIV-1 πρωτεάσης**

**ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΤΖΟΥΠΗΣ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σχεδιασμός καινοτόμων αναστολέων της ρενίνης και της HIV-1 πρωτεάσης

ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΤΖΟΥΠΗΣ

A.M.: 102816

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θ. ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ Θ., Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΜΟΥΤΕΒΕΛΗ-ΜΗΝΑΚΑΚΗ Π., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Μ., Ερευνητής Α΄

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΑΚΟΥΛΙΔΟΥ Α., Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΚΟΚΟΤΟΣ Γ., Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΜΑΥΡΟΜΟΥΣΤΑΚΟΣ Θ., Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΜΟΥΤΕΒΕΛΗ-ΜΗΝΑΚΑΚΗ Π., Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ Μ., Ερευνητής Α΄ Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

ΣΠΥΡΟΥΛΙΑΣ Γ., Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστήμιο Πατρών

ΤΣΕΛΙΟΣ Θ., Επίκουρος Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 24/01/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το σύνδρομο επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (AIDS) και η υπέρταση, αποτελούν δύο από τα σημαντικότερα προβλήματα της παγκόσμιας υγείας. Μέχρι σήμερα, 27 εκατ. άτομα έχουν αποβιώσει από τον ιό HIV-1 (στοιχεία UNAIDS). Επίσης, πάνω από 1 δισεκατομμύρια άτομα πάσχουν από υπέρταση. Μελέτες έχουν υποδείξει την HIV-1 πρωτεάση και τη ρενίνη, ως βασικούς φαρμακευτικούς στόχους, κατά του AIDS και της υπέρτασης, αντίστοιχα. Η HIV-1 πρωτεάση έχει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού, ενώ η ρενίνη έχει συνδεθεί με την παραγωγή της αγγειοτασίνης I (AT-I), στο σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης (RAAS). Και τα δύο ένζυμα ανήκουν στην οικογένεια των ασπαρτικών πρωτεασών. Η κατανόηση του μηχανισμού πρόσδεσης διαφορετικών εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων αποτελεί βασικό στοιχείο για το σχεδιασμό νέων καινοτόμων αναστολέων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενζύμων και των προσδετών με στόχο την πρόταση νέων φαρμακευτικών μορίων. Επίσης σημαντικό τμήμα της εργασίας είναι η αναγνώριση κοινών λειτουργικών στοιχείων (δημιουργία δεσμών υδρογόνου) στις δύο πρωτεΐνες. Η μελέτη στηρίχθηκε στη χρήση διαφορετικών υπολογιστικών τεχνικών (πχ 3D-QSAR και μοριακή δυναμική). Ο υπολογισμός της ενέργειας πρόσδεσης στα διάφορα σύμπλοκα της ρενίνης και της HIV-1 πρωτεάσης έγινε με τη χρήση της μεθόδου MM-PBSA ενώ η μέθοδος της θερμοδυναμικής ολοκλήρωσης χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της επίδρασης μεταλλάξεων στην πρόσδεση της σακουιναβίρης στην HIV-1 πρωτεάση. Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα αποτέλεσε η αναγνώριση κοινών λειτουργικών στοιχείων των ασπαρτικών πρωτεασών μέσω της ανάλυσης της επίδρασης των φαρμάκων νταρουναβίρης (AIDS) και αλισκιρένης (υπέρταση) στα δύο ένζυμα. Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από τη διπλή ανασταλτική δράση του αντιδιαβητικού φαρμάκου καναφλιφλοζίνης στη ρενίνη και στην HIV-1 πρωτεάση όπως προκύπτει από την ευνοϊκή μεταβολή ελεύθερης ενέργειας στην πρόσδεση.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Σχεδιασμός φαρμάκων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Μοριακή δυναμική, MM-PBSA, HIV-1 πρωτεάση, AIDS, ρενίνη, υπέρταση

ABSTRACT

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and hypertension present a public health challenge worldwide. Hitherto, more than 27 million people have died from HIV-1 infection (UNAIDS). Also, up to 1 billion people have developed some form of hypertension. Studies have identified HIV-1 protease (HIV-1 PR) and renin as the primary targets for drug design against AIDS and hypertension, respectively. The viral protease plays a crucial role in viral replication and renin induces the production of angiotensin I (AT-I), that is involved in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). Both enzymes belong to the family of aspartic proteases. Understanding the binding mechanism of different commercially available drugs offers valuable information for the design of novel inhibitors. The aim of this study is to analyze the different interactions between ligands and the enzymes and thus propose new inhibitors. Also, an important part of the present project is dedicated to the identification of common functional aspects (hydrogen bond interactions) in both proteins. Different computational techniques (e.g. 3D-QSAR and molecular dynamics) have been used for this purpose. The binding energy in the different renin and HIV-1 PR complexes has been calculated with the MM-PBSA method. Thermodynamic integration has been implemented for the analysis of the effect of mutations on the binding of saquinavir in HIV-1 PR. Of great importance is the dual inhibition of the drugs darunavir (AIDS) and aliskiren (hypertension) in both enzymes. This is further supported by the inhibitory action of canagliflozin –an anti-diabetic agent– in renin and in HIV-1 PR as it is depicted by the favoured ΔG binding values.

SUBJECT AREA: Drug Design

KEYWORDS: Molecular dynamics, MM-PBSA, HIV-1 protease, AIDS, renin, hypertension

Αφιερώσεις

*Η επιστήμη είναι φτιαγμένη από λάθη,
λάθη που είναι απαραίτητο να γίνουν,
καθώς οδηγούν βήμα βήμα στην αλήθεια*
I. Βερν «Ταξίδι στο κέντρο της γης»

Σε όλους όσοι μου στάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια
...Στα παιδιά που τα θέλουνε όλα...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ II. Η έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Οργανικής Χημείας (Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών) του ΕΚΠΑ, καθώς και όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής (Καθ. Θ. Μαυρομούστακο, Αναπλ. Καθ. Π. Μουτεβελή-Μινακάκη και Δρ. Μ. Παπαδόπουλο) για την ευκαιρία που μου έδωσαν. Επίσης, το Δρα. Μ. Παπαδόπουλο (Τμήμα Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών) για την ευκαιρία να εργαστώ στην ερευνητική του ομάδα και για τις συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια του διδακτορικού. Τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας, Δρα. Γ. Λεώνη, Δρα. Α. Αβραμόπουλο και Δρα. Η. Reis για τις πολύτιμες συμβουλές τους και την υπομονή τους κατά τη διάρκεια της εκμάθησης των διαφορετικών υπολογιστικών προγραμμάτων, που ήταν απαραίτητα για την ολοκλήρωση της διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη στήριξη που παρείχαν σε όλο αυτό το διάστημα.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1.1 Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοποιητικής Ανεπάρκειας (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome–AIDS).....	17
1.1.1 Κύκλος ζωής ιού HIV	21
1.2 Σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης.....	24
1.3 Ασπαρτικές πρωτεάσες	30
1.4 Μοριακή μοντελοποίηση και ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	36
2.1 Μοριακή μοντελοποίηση και φαρμακευτικός σχεδιασμός.....	36
2.2 Αλγόριθμοι προγραμμάτων μοριακής πρόσδεσης.....	36
2.3 Ποσοτική σχέση δομής-δραστικότητας (Quantitative Structure–Activity Relationship, QSAR).....	41
2.4 Μοριακή Δυναμική (ΜΔ).....	46
2.4.1 Πεδία δυνάμεων μοριακής δυναμικής.....	48
2.4.2 Μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις.....	48
2.4.3 Δεσμικές αλληλεπιδράσεις.....	50
2.5 Ανάλυση ενέργειας με τη χρήση μοριακής μηχανικής PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann surface area–MM-PBSA)	53
2.6 Μέθοδος θερμοδυναμικής ολοκλήρωσης (Thermodynamic integration-TI).55	
2.7 Ανάλυση διαμορφώσεων-ομαδοποίηση (clustering).....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Σκοπος	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 Σχεδιασμός φουλερενικών παραγώγων ως αναστολέων της HIV-1 πρωτεάσης	61
4.1 Φουλερενικά παράγωγα ως αναστολείς της HIV-1 πρωτεάσης	61
4.2 Μέθοδοι.....	66
4.3 Αποτελέσματα.....	73
4.4 Συμπεράσματα.....	101
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 Συγκριτική μελέτη των μεταλλάξεων L10I, G48V, L63P, A71V, G73S, V82A και I84V σε σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης με τη σακουιναβίρη	103
5.1 Εισαγωγή	103
5.2 Μέθοδοι.....	104
5.3 Αποτελέσματα.....	104

5.4	Συμπεράσματα.....	125
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 Διαμορφωτική και ενεργειακή μελέτη της αλίσκιδης σε διάλυμα καθώς και σε σύμπλοκο με τη ρενίνη.....		
6.1	Μέθοδοι.....	127
5.2	Αποτελέσματα.....	128
5.3	Συμπεράσματα.....	137
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 Αναστολείς με διπλή δράση κατά των ασπαρτικών πρωτεασών HIV-1 PR και ρενίνης: Σύνδεση AIDS- υπέρτασης- διαβήτη.....		
7.1	Εισαγωγή.....	139
7.2	Αποτελέσματα.....	140
7.3	Συμπεράσματα.....	155
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 Γενικά Συμπεράσματα.....		
Βιβλιογραφία.....		15963

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 2.1:** Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών όρων που εμφανίζονται στην εξίσωση 2.12.....51
- Σχήμα 2.2:** Σχηματική αρχή της μεθόδου TI όσον αφορά σε διαφορετικές πρωτεΐνες.....56
- Σχήμα 2.3:** Αναπαράσταση της ιεραρχικής μεθόδου. Με κόκκινο χρώμα ορίζονται τα άκρα του συνόλου και με μπλε το κέντρο του.....59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1.1:** Σχηματική σύγκριση του σημείου τομής (αμιδικός δεσμός Phe-Pro) του πολυπεπτιδίου Gag-Pol (αριστερά) και της σακουιναβίρης (δεξιά).....19
- Εικόνα 1.2:** (α) Δομικά χαρακτηριστικά του ιού HIV (αριστερά) και ο διαχωρισμός του γονιδιώματος του ιού (δεξιά). (β) Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του ιού HIV-1 κατά την προσβολή του κυττάρου ξενιστή.....22
- Εικόνα 1.3:** Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος RAS. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά την αρνητική ανάδραση (negative feedback) των ολιγοπεπτιδίων αγγειοτασίνη I και II στο σύστημα παραγωγής ρενίνης.....26
- Εικόνα 1.4:** Διαγραμματική παρουσίαση καμπύλης δόσης-ανταπόκρισης. Η καμπύλη A δείχνει την υψηλή ανταπόκριση σε σχέση με τη δοσολογία ενώ η καμπύλη B παρουσιάζει τη χαμηλή ανταπόκριση μιας ουσίας σε σχέση με τα δοσολογία.....28
- Εικόνα 1.5:** Σχηματική σύγκριση του σημείου τομής (αμιδικός δεσμός Leu-Val) του αγγειοτασινογόνου (αριστερά) και της ρεμικιρένης (δεξιά).....30
- Εικόνα 1.6:** Απεικόνιση της HIV-1 πρωτεάσης. Με μπλε χρώμα παριστάνεται το ενεργό κέντρο της και με κίτρινο τα πτερύγια που βρίσκονται στην είσοδο της κοιλότητας πρόσδεσης. Στην ένθετη εικόνα δεξιά απεικονίζονται οι πλευρικές αλυσίδες των δύο καταλυτικών ασπαρτικών οξέων.....31
- Εικόνα 1.7:** Απεικόνιση της ρενίνης. Με κίτρινο χρώμα παριστάνεται το ενεργό κέντρο της και με μπλε το πτερύγιο που βρίσκεται στην είσοδο της κοιλότητας πρόσδεσης. Στην ένθετη εικόνα δεξιά απεικονίζονται οι πλευρικές αλυσίδες των δύο καταλυτικών ασπαρτικών οξέων.....32
- Εικόνα 1.8:** (α) Υπέρθωση των δομών της ρενίνης (πράσινο) και της HIV-1 πρωτεάσης (μωβ). Πάνω αριστερά παρουσιάζεται η υπέρθεση των πτερυγίων από τα δύο ένζυμα, ρενίνη (κόκκινο) και HIV-1 πρωτεάση (κίτρινο). Τέλος, πάνω δεξιά, είναι το ενεργό κέντρο της ρενίνης (μπλε) και του ιικού ενζύμου (κόκκινο) και (β) σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων στην περιοχή του ενεργού κέντρου –με σκούρα γράμματα εμφανίζεται η καταλυτική τριάδα Asp-Thr-Gly.....34
- Εικόνα 2.1:** Παράδειγμα του τρόπου διαχωρισμού του προσδέτη σε τμήματα από το DOCK. Ο προσδέτης p-ακέτυλο-ακετουδραζίνη χωρίζεται στο άκαμπτο τμήμα 1 και στα ευέλικτα τα τμήματα 2 και 3.....37
- Εικόνα 2.2:** Σχηματική αναπαράσταση (α) της επιφάνειας της HIV-1 πρωτεάσης και (β) του κέντρου πρόσδεσης αποτελούμενο από έξι άτομα (κόκκινο). Οι πράσινες σφαίρες αποτελούν τα σημεία επαφής στην επιφάνεια (μαύρο).....39

Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση επιλογής του κέντρου πρόσδεσης της ρενίνης με το πρόγραμμα ArgusLab. Με κίτρινο χρώμα αναπαριστώνται τα αμινοξέα που αποτελούν το ενεργό κέντρο Asp38/225-Thr39/226-Gly40/227 και με μαύρο ένα κουτί διαστάσεων 25 x 25 x 25 Å ³ με το οποίο ορίζεται η περιοχή πρόσδεσης.....	41
Εικόνα 2.4: Παράδειγμα μιας ισούψους καμπύλης ενός μοντέλου QSAR. Το κόκκινο χρώμα συμβολίζει τις περιοχές με ηλεκτροστατική επίδραση στη μείωση της δραστηριότητας, ενώ με μπλε χρώμα είναι οι περιοχές που αυξάνουν τη δραστηριότητα λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης (αριστερά). Αντίθετα οι στερικές επιδράσεις χρωματίζονται με πράσινο χρώμα όσες αυξάνουν και με κίτρινο όσες μειώνουν τη δραστηριότητα της χημικής ένωσης (δεξιά).....	45
Εικόνα 2.5: Γραφική αναπαράσταση του δυναμικού Lennard-Jones, όπου παρουσιάζονται και οι σταθερές , σ_{ij} και ϵ_{ij}	50
Εικόνα 4.1: Παραδείγματα φουλερενίων αποτελούμενα από (α) 20 C (β) 24 C (γ) 60 C (δ) 70 C.....	62
Εικόνα 4.2: (α) Φουλερενικό παράγωγο που συντέθηκε με σκοπό την αύξηση του υδροφιλικού χαρακτήρα του σκελετού C ₆₀ και (β) Φουλερενικό παράγωγο με προσθήκη πεπτιδίου όπου R= (Tyr) _n με n=1-8.....	64
Εικόνα 4.3: Χάρτες ισούψων καμπύλων που προέκυψαν από τη χρήση του CoMSIA 3D-QSAR για: ένωση 18 (αριστερά) και ένωση 4 (δεξιά).....	82
Εικόνα 4.4: Τμήματα της σακουιναβίρης (σε πλαίσιο) που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό φουλερενικών παραγώγων του Πίνακα 4.6.....	85
Εικόνα 4.5: Δομή του φουλερενικού παραγώγου 54 και των ατόμων που συμβάλλουν στους δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεάση. α) στα πρώτα 5 ns και β) στα τελευταία 5 ns.....	89
Εικόνα 4.6: Σχηματική παρουσίαση των υδρογονοδεσμών της ένωσης 87 και των αμινοξέων της πρωτεάσης.....	90
Εικόνα 4.7: Υπολογισμένες αποστάσεις (στα 20 ns) μεταξύ ατόμων Ca για τα αμινοξέα Asp25 (ενεργό κέντρο), Ile50 και Ile50' (περύγιο) στο σύμπλοκο HIV-1 PR-ένωση 87 : (α) Απόσταση Asp25-Ile50. (β) Απόσταση Ile50-Ile50'.....	92
Εικόνα 4.8: Διακύμανση τιμών rmsd, για τα σύμπλοκα HIV-1PR- 87 (α, β, γ) και HIV-1 PR- 96 (δ). (α) Πρωτεάση-ένωση 87 (μπλε) και αμινοξέα (44-55, 44'-55') στα περύγια (κόκκινα). (β) και (δ). Αμινοξέα ενεργού κέντρου (Asp-Thr-Gly).(γ) Αμινοξέα 79-83 (κόκκινο) και 79'-83' (μαύρο).....	93
Εικόνα 4.9: Ανάλυση ενεργειακής συνεισφοράς στην ενέργεια πρόσδεσης (ΔG, πράσινο) ανά αμινοξύ για (α) την αλυσίδα A και (β) την αλυσίδα B της πρωτεΐνης στο σύμπλοκο με την ένωση 87	98
Εικόνα 4.10: Ενεργειακή συνεισφορά, ΔH (γαλάζιο), TΔS (μπλε), ΔG (πράσινο) για τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο (Asp-Thr-Gly) και τα περύγια (Ile50/50'), καθώς και για τα αμινοξέα που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την ένωση 87 (Asp29', Asp30', Gly48, Gly48').....	98
Εικόνα 5.1: Αντιπροσωπευτική τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου της wt HIV-1 πρωτεάσης με τη σακουιναβίρη (αριστερά). Η χημική δομή του φαρμάκου παρουσιάζεται στα δεξιά. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι θέσεις των αμινοξέων που έχουν υποστεί μεταλλάξεις.....	105
Εικόνα 5.2: Τιμές rmsd για τα άτομα άνθρακα Ca της HIV-1 PR wt και των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. (α) I84V-μαύρο, L10I-κίτρινο, V82A-μωβ (β) L63P-κόκκινο, A71V-μπλε, G73S-πράσινο (γ) wt-κόκκινο, G48V-μπλε.....	108

Εικόνα 5.3: Τιμές rmsd για τη σακουιναβίρη, σε σύγκριση με την αρχική της διαμόρφωση, μέσα στα σύμπλοκα με την HIV-1 πρωτεάση: (α) wt (μπλε) και G48V (κόκκινο) (β) L63P (μπλε), A71V (κόκκινο), V82A (πράσινο), G73S (μαύρο), I84V (μωβ) και L10I (κίτρινο). Η γκρι γραμμή δείχνει τη μέση τιμή rms για τη σακουιναβίρη στη wt-HIV-1 πρωτεάση.....108

Εικόνα 5.4: Αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις της σακουιναβίρης στο ενεργό κέντρο της HIV-1 πρωτεάσης. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η διαμόρφωση στην wt HIV-1 πρωτεάση και σε υπέρθεση οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις του φαρμάκου στις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες. Η κρυσταλλική δομή της σακουιναβίρης παρουσιάζεται με μαύρο χρώμα.....110

Εικόνα 5.5: Τιμές rmsd των ατόμων άνθρακα Ca για την περιοχή των πτερυγίων (αμινοξέα 44-55 και 44'-55'), σε σχέση με την αρχική δομή: (α) wt (μπλε) και στελέχη G48V (κόκκινο) (β) L63P (μπλε), A71V (κόκκινο), V82A (πράσινο), G73S (μαύρο), I84V (μωβ) και L10I (κίτρινο).....111

Εικόνα 5.6: Γραφήματα Ramachandran (γωνίες φ και ψ) για τα αμινοξέα 47-51 στη wt πρωτεάση (κόκκινο) και στο στέλεχος G48V (μαύρο) των συμπλόκων με τη σακουιναβίρη. Κάτω δεξιά παρουσιάζονται οι γωνίες φ, ψ και ω στο σκελετό ενός πεπτιδίου.....113

Εικόνα 5.7: Διακυμάνσεις ατόμων άνθρακα Ca για τα αμινοξέα της HIV-1 πρωτεάσης στα σύμπλοκα: (α) wt (μπλε) και στα στελέχη G48V (κόκκινο) (β) L63P (μπλε), A71V (κόκκινο), V82A (πράσινο), G73S (μαύρο), I84V (μωβ) και L10I (κίτρινο).....114

Εικόνα 5.8: Κύριοι ΔΥ ανάμεσα στη σακουιναβίρη στα σύμπλοκα: (α) με την wt HIV-1 πρωτεάση και (β) με το στέλεχος G48V. Οι κόκκινες διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζουν τους ΔΥ με τα καταλυτικά αμινοξέα Asp25/25'.....117

Εικόνα 5.9: Συνεισφορές στην ΔH αμινοξέων του ενεργού κέντρου και των πτερυγίων για τα σύμπλοκα HIV-1_{wt} πρωτεάσης- σακουιναβίρης (πράσινο) και HIV-1_{G48V} πρωτεάσης- σακουιναβίρης (μπλε).....124

Εικόνα 6.1: (α) Αντιπροσωπευτικές δομές της αλισκιρένης σε διάλυμα DMSO: με κόκκινο χρώμα η κυρίαρχη «ανοιχτή» δομή και με πράσινο η «κλειστή» δομή του φαρμάκου, (β) Σύγκριση της αντιπροσωπευτικής «ανοιχτής» δομής με την κρυσταλλογραφική δομή (μπλε) της αλισκιρένης.....129

Εικόνα 6.2: Rmsd των ατόμων άνθρακα Ca της ρενίνης για το σύμπλοκο αλισκιρένη-ρενίνη (κόκκινο) και για το ελεύθερο ένζυμο (μαύρο).....131

Εικόνα 6.3: ΔΥ ανάμεσα σε αλισκιρένη και ρενίνη. Οι συνολικά οκτώ δεσμοί συμπεριλαμβάνουν τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο (Gly34, Asp32/215) και τα αμινοξέα Tyr14, Arg74 και Ser76.....131

Εικόνα 6.4: Rmsd της αλισκιρένης μέσα στη ρενίνη.....132

Εικόνα 6.5: Rmsd διακυμάνσεις για τη ρενίνη σε σχέση με την κρυσταλλική δομή. Οι τιμές αφορούν στα άτομα Ca για τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο Asp32/215, Thr33/216 και Gly34/217 (κόκκινο) και τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου που αλληλεπιδρούν μέσω ΔΥ (Asp32/215 και Gly34, μαύρο).....134

Εικόνα 6.6: Διακυμάνσεις των ατόμων Ca για την ελεύθερη (άπο-μορφή) της ρενίνης (μαύρο) και για το σύμπλοκο ρενίνης-αλισκιρένης (κόκκινο).....134

Εικόνα 6.7: Πιθανός μηχανισμός εισόδου της αλισκιρένης στην περιοχή γύρω από τη Ser76 (κόκκινο): (α) το άνοιγμα της συγκεκριμένης περιοχής ελέγχει την είσοδο του προσδέτη στην κοιλότητα του ενζύμου, (β) κατά την πρόσδεση το πτερύγιο

κλείνει πάνω από το ενεργό κέντρο και το μόριο του προσδέτη εγκλωβίζεται σε αυτό. Η αλισκιρένη λαμβάνει την «ανοιχτή» διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο (πράσινο)..	135
Εικόνα 6.8: Γραφική παράσταση της μεταβολής ελεύθερης ενέργειας ΔG του συμπλόκου ρενίνης-αλισκιρένης (πράσινο), της μεταβολής της ενθαλπίας (ΔH , κόκκινο) και των αλληλεπιδράσεων van der Waals (ΔG_{vdW} , μπλε) κατά την προσομοίωση.....	136
Εικόνα 7.1: Rmsd για τα σύμπλοκα της καναγλοφλοζίνης με (α) την HIV-1 πρωτεάση και (β) τη ρενίνη, ως προς τις κρυσταλλικές δομές τους (2IEN και 2V0Z, αντίστοιχα). Με κόκκινο εμφανίζονται τιμές rmsd για όλα τα άτομα Ca για τα ένζυμα και με μπλε για τα αντίστοιχα άτομα του ενεργού κέντρου. (γ) rmsd για την καναγλοφλιζίνη στην HIV-1 πρωτεάση (μαύρο) και στη ρενίνη (πράσινο). (δ) αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις της καναγλιφλοζίνης στο ενεργό κέντρο της HIV-1 πρωτεάσης (μπλε) και της ρενίνης (κόκκινο). Τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου εμφανίζονται ως κίτρινα για την ιική πρωτεάση και πράσινα για τη ρενίνη.....	141
Εικόνα 7.2: Rmsd για την άπο-μορφή της ρενίνης (κόκκινο). Με μπλε αποτυπώνονται οι τιμές rmsd ως προς τα άτομα Ca των αμινοξέων του ενεργού κέντρου της.....	142
Εικόνα 7.3: Επάνω, rmsd για τα άτομα Ca της πρωτεΐνης (κόκκινο) και των ατόμων Ca των αμινοξέων του ενεργού κέντρου (μπλε) για τα σύμπλοκα: (α) Νταρουναβίρης-ρενίνης και (β) Αλισκιρένης-HIV-1 πρωτεάσης. Κάτω, διακυμάνσεις των ατόμων Ca των αμινοξέων για τα σύμπλοκα: (γ) καναγλιφλοζίνης-ρενίνης (κόκκινο), νταρουναβίρης-ρενίνης (μαύρο) και (δ) καναγλιφλοζίνης-HIV-1 πρωτεάσης (κόκκινο), αλισκιρένης-HIV-1 πρωτεάσης (μαύρο).....	144
Εικόνα 7.4: Rmsd για: (α) τη νταρουναβίρη στη ρενίνη και (β) την αλισκιρένη στην HIV-1 πρωτεάση.....	145
Εικόνα 7.5: Κύριοι ΔY μεταξύ (α) καναγλιφλοζίνης- ρενίνης (β) καναγλιφλοζίνης-HIV-1 πρωτεάσης (γ) αλισκιρένης- HIV-1 πρωτεάσης (στο ένθετο σχήμα παρουσιάζεται ο ΔY μεταξύ των πτερυγίων και ενός μορίου νερού) και (δ) νταρουναβίρης- ρενίνης.....	147
Εικόνα 7.6: Σημαντικές ηλεκτροστατικές και van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδέτη (κόκκινο) και επιλεγμένων αμινοξέων (μπλε).....	153

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Δομές των εμπορικά διαθέσιμων αναστολέων	20
Πίνακας 1.2: Τα σημαντικότερα γονίδια του ιού και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες.	23
Πίνακας 1.3: Δομές των διαθέσιμων αναστολέων της ρενίνης.....	29
Πίνακας 2.1: Τιμές λ και W που χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς TI	57
Πίνακας 4.1: Ομάδα «εκμάθησης», η οποία χρησιμοποιήθηκε ώστε να παραχθεί το μοντέλο QSAR. Στον πίνακα αναφέρονται οι υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης, IC_{50} καθώς και προβλεπόμενες τιμές IC_{50} από τα μοντέλα CoMFA/CoMSIA.	67
Πίνακας 4.2: Σύγκριση θεωρητικών τιμών μοριακής πρόσδεσης και πειραματικών ενεργειών πρόσδεσης των εμπορικά διαθέσιμων αναστολέων της HIV-1 πρωτεάσης.....	75
Πίνακας 4.3: Περίληψη των στατιστικών αποτελεσμάτων για τα μοντέλα CoMFA και CoMSIA.....	76
Πίνακας 4.4: Ενώσεις δοκιμής για τον έλεγχο των μοντέλων QSAR: σύγκριση πειραματικών (ενώσεις 55-74) και υπολογισμένων (ενώσεις 52-54) ενεργειών πρόσδεσης, μέσω μοριακής πρόσδεσης, με τις αντίστοιχες προβλέψεις των μοντέλων CoMFA/CoMSIA.	78
Πίνακας 4.5: Υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης των παραγώγων με βάση την ένωση 18 και τα αποτελέσματα CoMSIA.	83
Πίνακας 4.6: Προτεινόμενες δομές και υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης.....	86
Πίνακας 4.7: Παρουσία (%) δεσμών υδρογόνου μεταξύ των φουλερενικών παραγώγων και της HIV-1 PR όπως υπολογίζονται από τη ΜΔ.	89
Πίνακας 4.8: Συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ($\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$) για τα σύμπλοκα της HIV-1 PR με τις ενώσεις 87, 96 και C_{60} , όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο MM-PBSA.	96
Πίνακας 4.9: Φαρμακοκινητικές ιδιότητες των προτεινόμενων φουλερενικών παραγώγων 81-96 ^a	100
Πίνακας 5.1: Δομές των αμινοξέων στην HIV-1 πρωτεάση (wt) και οι αντίστοιχες μεταλλάξεις που μελετήθηκαν.....	106
Πίνακας 5.2: Περίληψη των σημαντικότερων αποτελεσμάτων της συγκριτικής μελέτης για τα διαφορετικά σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης και της σακουιναβίρης.....	107
Πίνακας 5.3: ΔY και π-αλληλεπιδράσεις* στα διάφορα σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης.	116
Πίνακας 5.4: ΔY μεταξύ των πτερυγίων στα σύμπλοκα wt και G48V με τη σακουιναβίρη.....	120
Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα των υπολογισμών MM-PBSA και TI για τα σύμπλοκα της σακουιναβίρης με τα στελέχη L10I, G48V, L63P, A71V, G73S και I84V της HIV-1 πρωτεάσης.....	122

Πίνακας 6.1: Σύγκριση πειραματικών (NMR) και θεωρητικών (<i>ab initio</i> : B3LYP/6-31 G(d)) αποστάσεων μεταξύ των πρωτονίων της αλίσκιρένης.	129
Πίνακας 6.2: Βασικοί δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο ρενίνης-αλίσκιρένης (72).	132
Πίνακας 6.3: Τιμές της κινητικότητας των ατόμων Ca (σε Å) για τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου στο σύμπλοκο αλίσκιρένης-ρενίνης και στην ελεύθερη ρενίνη (72).	133
Πίνακας 6.4: Ενεργειακές συνεισφορές στην ενέργεια πρόσδεσης, όπως υπολογίστηκαν από τη μέθοδο MM-PBSA (σε kcal/mol).	136
Πίνακας 7.1: Δεσμοί υδρογόνου ^α στα διάφορα σύμπλοκα.	148
Πίνακας 7.2: Συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (ΔG : kcal mol ⁻¹) για τα σύμπλοκα των πρωτεασών όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο MM-PBSA ^α	150
Πίνακας 7.3: Συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια (σε kcal mol ⁻¹) που απορρέει από την αλληλεπίδραση μεταξύ του προσδέτη και του ενζύμου.	152
Πίνακας 7.4: Θεωρητικές τιμές για την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα DOCK για την αλίσκιρένη και τη νταρουναβίρη σε διάφορα μέλη των ασπαρτικών πρωτεασών.	155
Πίνακας 8.1: Υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης των παραγώγων με βάση την ένωση 18 (CoMSIA).	159
Πίνακας 8.2: Προτεινόμενες δομές και υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης.	159

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες η ιατρική επιστήμη καθώς και όλοι οι συναφείς κλάδοι, έχουν γνωρίσει μια εκρηκτική άνοδο. Τα επιτεύγματα στους τομείς της διάγνωσης, της πρόληψης και της θεραπείας είναι σημαντικότερα. Νέες διαγνωστικές και θεραπευτικές μέθοδοι ανακαλύπτονται συνεχώς, προσθέτοντας νέα όπλα στη φαρμακευτική επιστήμη για την αντιμετώπιση των διαφόρων ασθενειών. Η σημαντικότερη ίσως διεργασία στην προσπάθεια εξεύρεσης θεραπευτικών μέσων για την αντιμετώπιση της ασθένειας είναι η αποκωδικοποίηση των βιοχημικών διεργασιών, που συμβάλλουν στην ανάπτυξη των συμπτωμάτων. Μέρος αυτής της διαδικασίας αποτελεί και η αναγνώριση των κύριων παθολογικών αιτιών τα οποία μπορεί να είναι είτε συστημικής φύσης (βλάβες στον ίδιο τον οργανισμό) είτε εξωγενείς παράγοντες, όπως η μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς (π.χ. βακτήρια, ιοί, μύκητες).

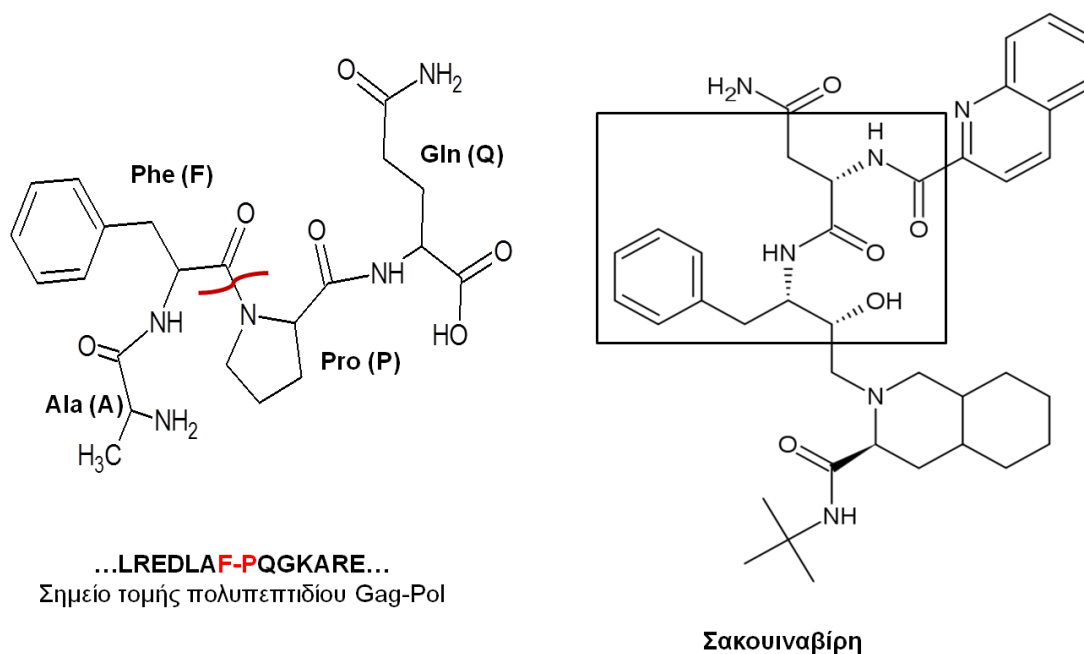
1.1 Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοποιητικής Ανεπάρκειας (Acquired ImmunoDeficiency Syndrome–AIDS)

Το AIDS αποτελεί μια σύγχρονη μάστιγα, που αναγνωρίστηκε μόλις στις αρχές του 1980.^{1,2} Είναι μια εκφυλιστικού τύπου ασθένεια, η οποία οδηγεί σε κατάρρευση το ανοσοποιητικό σύστημα, και καθιστά τον ασθενή ευάλωτο σε μια πληθώρα μικροβίων που σε φυσιολογικές συνθήκες δε θα δημιουργούσαν πρόβλημα. Το σημαντικότερο βήμα στην κατανόηση του AIDS, αποτελεί η ταυτοποίηση της βάσης της παθογένειας του. Συγκεκριμένα, ανακαλύφθηκε ότι το σύνδρομο προκαλείται από τον ιό ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV-Human Immunodeficiency Virus).¹ Ο ιός προσβάλλει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και πιο συγκεκριμένα τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα.³ Στα πρώτα στάδια της ασθένειας, τα συμπτώματα που εμφανίζονται προσιδιάζουν σε αυτά της κοινής γρίπης και διαρκούν περίπου 1-3 μήνες. Στη συνέχεια ο ιός εισέρχεται σε μια λανθάνουσα φάση, η οποία μπορεί να διαρκέσει από 1 έως 15 χρόνια.⁴ Στο χρονικό αυτό διάστημα ο ιός

HIV συνεχίζει να πολλαπλασιάζεται στους λεμφαδένες χωρίς ο ασθενής να παρουσιάζει κάποιο σύμπτωμα από την προσβολή του. Κατά το τελευταίο στάδιο, ο ιός HIV, πολλαπλασιάζεται ραγδαία και ελευθερώνεται στο αίμα οδηγώντας στην εκδήλωση του Συνδρόμου Επίκτητης Ανοσοποιητικής Ανεπάρκειας. Στην τελευταία αυτή φάση το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς είναι τόσο καταπονημένο, ώστε δε μπορεί να καταπολεμήσει οποιαδήποτε απειλή.⁴ Το αποτέλεσμα είναι ο οργανισμός να κατακλύζεται από μικρόβια με συνέπεια να οδηγείται ο ασθενής στο θάνατο. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα κλινικά στοιχεία υπολογίζεται πως ο αριθμός των ανθρώπων που έχουν προσβληθεί από τον ιό του AIDS ανέρχεται σε 36 εκατομμύρια (UNAIDS, 2011).⁵ Το μεγαλύτερο πρόβλημα παρουσιάζεται στην Υπό-σαχάρια Αφρική όπου περισσότερο από το 68% του πληθυσμού είναι μολυσμένο από τον ιό HIV.

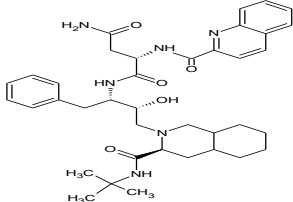
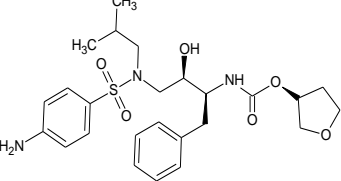
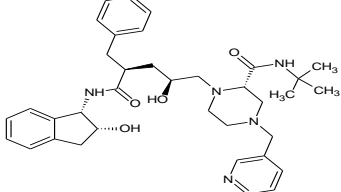
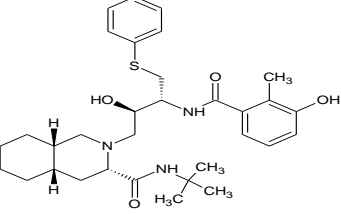
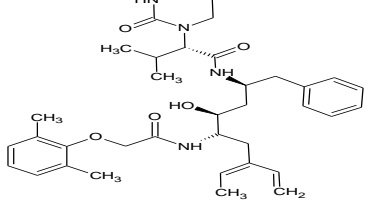
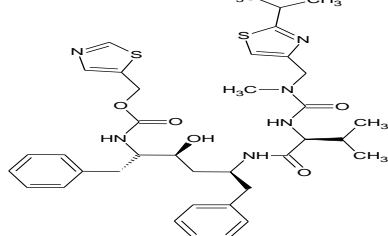
Τα 30 εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα κατά του AIDS χωρίζονται σε: 16 αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase), 9 αναστολείς της πρωτεάσης, έναν αναστολέα σύμπτυξης (fusion inhibitor), έναν αναστολέα του ενζύμου ολοκλήρωσης (integrase), έναν αναστολέα εισόδου (entry inhibitor) και 2 συνδυαστικά φάρμακα.⁶ Οι αναστολείς της ιικής πρωτεάσης είναι πεπτιδικά ανάλογα του φυσικού υποστρώματος και παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1. Τα φάρμακα δρουν ως μιμητές των πεπτιδικών δεσμών και της μεταβατικής κατάστασης του πολυπεπτιδίου Gag-Pol. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η σακουιναβίρη (saquinavir), η οποία δρα ως πεπτιδομιμητής του δεσμού Phe-Pro του πολυπετιδίου Gag-Pol (Εικόνα 1.1).⁷ Η αναστολή της λειτουργίας της πρωτεάσης συμβάλλει στην παραγωγή μη βιώσιμων ιών. Άμεση συνέπεια είναι η μείωση του ιικού βάρους στους ασθενείς, όπως αυτό μετριέται μέσω της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction).⁸ Οι αναστολείς της HIV-1 πρωτεάσης διαχωρίζονται σε 1^{ης} (πχ σακουιναβίρη, ιντιναβίρη –indinavir-) και 2^{ης} γενιάς (πχ νταρουναβίρη –darunavir-, τιπραναβίρη –tipranavir-). Τα φάρμακα της 1^{ης} γενιάς, σχεδιάσθηκαν αξιοποιώντας την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενζύμου και διαφορετικών πεπτιδικών υποστρωμάτων.⁹ Παρατηρήθηκε ότι οι βασικές αλληλεπιδράσεις είναι δύο ειδών, υδρόφοβες και δεσμοί υδρογόνου. Τα φάρμακα 2^{ης} γενιάς

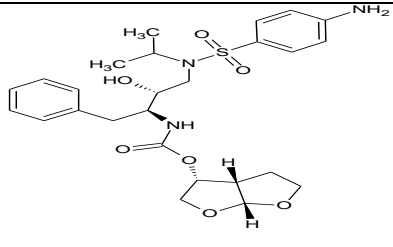
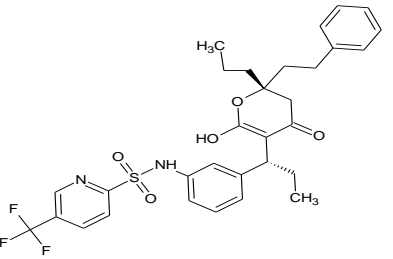
αναπτύχθηκαν για να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών του ιού στις προηγούμενες θεραπείες.¹⁰ Βασικό χαρακτηριστικό των αναστολέων 2^{ης} γενιάς είναι η αντικατάσταση λειτουργικών ομάδων όπως το καρβονύλιο (σακουιναβίρη) με ομάδες όπως το τετραυδροφουράνιο (αμπρεναβίρη). Η δραστηριότητα των φαρμάκων αυτών όμως μειώνεται με το χρόνο λόγω της αδιάλειπτης χορήγησής τους καθώς εμφανίζονται νέα ανθεκτικά στελέχη του ιού. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το φαινόμενο εισήχθηκε η χρήση μιας συνδυαστικής φαρμακευτικής αγωγής αποτελούμενη κυρίως, από αναστολείς της πρωτεάσης και της αντίστροφης μεταγραφάσης (HAART: highly active antiretroviral therapy).^{11,12}



Εικόνα 1.1: Σχηματική σύγκριση του σημείου τομής (αμιδικός δεσμός Phe-Pro) του πολυπεπτιδίου Gag-Pol (αριστερά) και της σακουιναβίρης (δεξιά).

Πίνακας 1.1: Δομές των εμπορικά διαθέσιμων αναστολέων της HIV-1 πρωτεάσης.

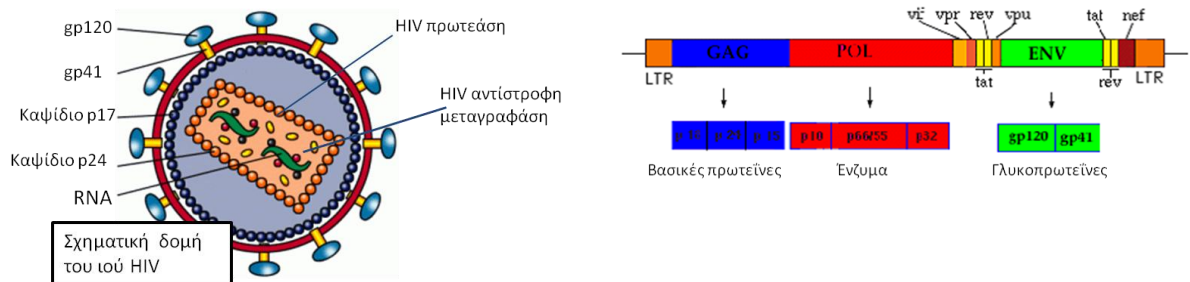
Όνομα	Μοριακή Δομή
Σακουιναβίρη (Saquinavir)	 <p>The structure of Saquinavir features a central piperidine ring substituted with a hydroxyl group, a tert-butyl amide, and a side chain containing a benzyl group, a hydroxyl group, and a 2-quinolinecarboxamide moiety.</p>
Αμπρεναβίρη (Amprenavir)	 <p>The structure of Amprenavir consists of a central piperidine ring with a hydroxyl group, a tert-butyl amide, and a side chain containing a benzyl group, a hydroxyl group, and a 4-aminophenyl sulfonamide moiety.</p>
Ιντιναβίρη (Indinavir)	 <p>The structure of Indinavir features a central piperidine ring with a hydroxyl group, a tert-butyl amide, and a side chain containing a benzyl group, a hydroxyl group, and a 2-phenylindole-3-carboxamide moiety.</p>
Νελφίναβίρη (Nelfinavir)	 <p>The structure of Nelfinavir features a central piperidine ring with a hydroxyl group, a tert-butyl amide, and a side chain containing a benzyl group, a hydroxyl group, and a 3-hydroxy-4-methylbenzamide moiety.</p>
Λοπιναβίρη (Lopinavir)	 <p>The structure of Lopinavir features a central piperidine ring with a hydroxyl group, a tert-butyl amide, and a side chain containing a benzyl group, a hydroxyl group, and a 2,6-dimethylphenyl amide moiety.</p>
Ριτοναβίρη (Ritonavir)	 <p>The structure of Ritonavir features a central piperidine ring with a hydroxyl group, a tert-butyl amide, and a side chain containing a benzyl group, a hydroxyl group, and a 2-thiazolylmethyl amide moiety.</p>

Νταρουναβίρη (Darunavir)	
Τιπραναβίρη (Tipranavir)	

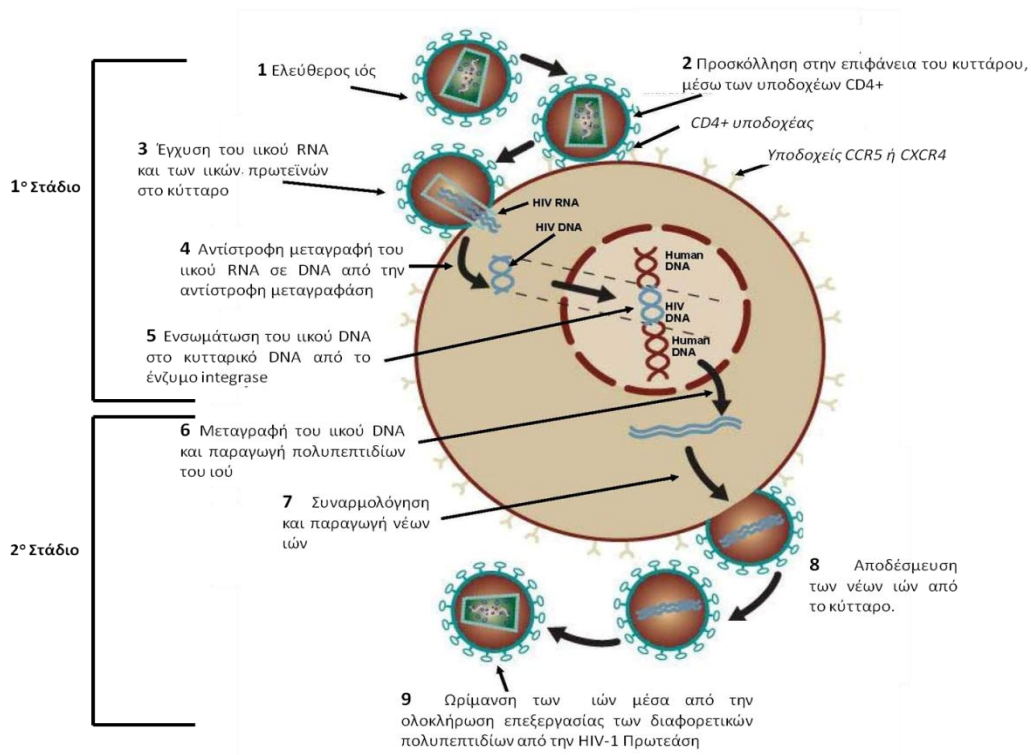
1.1.1 Κύκλος ζωής ιού HIV

Ο ιός του HIV ανήκει στην ομάδα των λεντιϊών (lentivirus) και αποτελεί μέλος της μεγαλύτερης οικογένειας των ρετροϊών (*Retroviridae*). Η συγκεκριμένη οικογένεια ιών έχει ως βασικό χαρακτηριστικό την παρουσία RNA ως γενετικού υλικού.¹³ Το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται μαζί με σημαντικές πρωτεΐνες και περιβάλλεται από ένα καψίδιο και μια μεμβράνη που προέρχεται από τα μολυσμένα κύτταρα (Εικόνα 1.2α). Τα σημαντικότερα γονίδια του ιού βρίσκονται ομαδοποιημένα σε τρεις οικογένειες, *gag* (Group Antigens—ομάδα αντιγόνων), *pol* (Polymerase— πολυμεράση) και *env* (Envelope— πρωτεΐνες καψιδίου) (Πίνακας 1.2, Εικόνα 1.2α).¹⁴⁻¹⁶ Τα γονίδια που εκφράζουν δομικές πρωτεΐνες, ανήκουν στην οικογένεια *gag*.¹⁴ Γονίδια σημαντικά για την αναπαραγωγή του ιού, ανήκουν στην οικογένεια *pol* και τέλος η οικογένεια *env* κωδικοποιεί γονίδια του καψιδίου του ιού.¹⁶⁻¹⁸ Μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο, το RNA μεταγράφεται σε DNA μέσω ενός υβριδίου RNA-DNA. Η όλη διαδικασία της μεταγραφής ελέγχεται από την αντίστροφη μεταγραφάση. Στη συνέχεια αντίγραφο του ιικού DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή. Παρόμοιο κύκλο ζωής έχουν και άλλη ρετροϊοί όπως ο ιός που προκαλεί λευχαιμία των T-λεμφοκυττάρων (Human T-cell leukemia virus 1—HTLV-1).¹⁹

(α)



(β)



Εικόνα 1.2: (α) Δομικά χαρακτηριστικά του ιού HIV (αριστερά) και ο διαχωρισμός του γονιδιώματος του ιού (δεξιά). (β) Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής του ιού HIV-1 κατά την προσβολή του κυττάρου ξενιστή.

Πίνακας 1.2: Τα σημαντικότερα γονίδια του ιού και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες.

Γονίδιο	Λειτουργία
<i>Gag</i>	Βασικές πρωτεΐνες: Καψίδιο (p24), Πυρηνικό καψίδιο (Nucleocapsid)
<i>Pol</i>	Ένζυμα: αντίστροφη μεταγραφάση, ολοκληράση
<i>Env</i>	Γλυκοπρωτεΐνες επιφάνειας: gp41, gp120

Η μόλυνση ενός οργανισμού από τον ιό HIV χωρίζεται σε δύο βασικά στάδια (Εικόνα 1.2β). Το πρώτο στάδιο αφορά την προσκόλληση του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου και την επικείμενη ενσωμάτωση του γενετικού υλικού στο γονιδίωμα του ξενιστή. Το δεύτερο στάδιο της αναπαραγωγής του ιού αφορά στην έκφραση των ιικών γονιδίων και την παραγωγή νέων ιών. Τα κύτταρα που προσβάλλονται από τον ιό είναι τα CD4+ T-λεμφοκύτταρα.²⁰ Η κατηγορία αυτή των κυττάρων έχει στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, τη γλυκοπρωτεΐνη CD4. Σε μικρότερο βαθμό η γλυκοπρωτεΐνη CD4 είναι παρούσα και σε άλλες ομάδες κυττάρων.²¹

Ο ιός HIV με τη βοήθεια συγκεκριμένων γλυκοπρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια προσκολλάται στα κύτταρα στόχους. Η διαδικασία επιτυγχάνεται με την προσκόλληση στην πρωτεΐνη CD4 της ιικής γλυκοπρωτεΐνης gp120. Η ισχυρή πρόσδεση της gp120 στην CD4 μπορεί να εξηγήσει σε μεγάλο βαθμό τη μόλυνση και άλλων κυττάρων (πχ. μονοκύτταρα) από τον ιό HIV. Η σημαντικότερη οικογένεια υποδοχέων που συμβάλλουν στην επιτυχή έκβαση της μόλυνσης είναι αυτή της χημοκίνης (chemokine receptors) CXCR4 και CCR5.^{22,23} Κατά την πρόσδεση του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου, προκαλείται σύντηξη της ιικής με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της διαμεσολάβησης της γλυκοπρωτεΐνης gp-41. Μελέτες έχουν δείξει πως στα T-λεμφοκύτταρα υπάρχει ο υποδοχέας CXCR4, ενώ στα στελέχη του ιού που μολύνουν τα μακροφάγα (macrophages) βρίσκεται ο υποδοχέας CCR5.^{22,24,25} Η σημασία των υποδοχέων αυτών στη μόλυνση με τον ιό του HIV, αναδείχθηκε από τις μελέτες των Littman *et al.* (1998) και Mellado *et al.* (2001).^{24,26}

Το επόμενο στάδιο είναι η απελευθέρωση του κυρίου σώματος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή. Με τη συνέργεια της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού, μεταγράφεται το ιικό RNA σε ένα γραμμικό υβρίδιο DNA-RNA. Το τελικό προϊόν της όλης διαδικασίας θα μεταφερθεί στον πυρήνα του κυττάρου.²⁷ Ο τελικός σκοπός είναι η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του HIV στο γονιδίωμα του κυττάρου, μια διεργασία η οποία καταλύεται από το ένζυμο ολοκληράση που παράγει ο ιός.²⁸ Το γονιδίωμα του HIV έχει μέγεθος 10 kb και αποτελεί τη βάση για τη παραγωγή του ιικού mRNA με τη βοήθεια ενζύμων του κυττάρου όπως είναι η πολυμεράση Pol II. Τα παραγόμενα RNA μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα και αποτελούν τη βάση για την παραγωγή των πολυπεπτιδίων Gag και Gag-Pol.¹⁴ Η πολύπλοκη διεργασία μέσα στο κυτταρόπλασμα του ιού, οδηγεί στην παραγωγή νέων ιών που στη συνέχεια απελευθερώνονται στον οργανισμό. *Ο ρόλος της πρωτεάσης του ιού είναι η επεξεργασία των πολυπεπτιδίων που παράγονται στο κυτταρόπλασμα, ώστε να συναρμολογηθούν τα νέα ιικά στελέχη.* Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται με την αποβολή των νέων ιών από το κύτταρο και οδηγεί στην μόλυνση νέων κυττάρων. Ο ρόλος της πρωτεάσης στην παραγωγή λειτουργικών ιών αποτελεί και το σημαντικότερο λόγο για τη στόχευση της όσον αφορά στις θεραπευτικές αγωγές κατά του ιού. Η αναστολή της οδηγεί στην παραγωγή στελεχών του ιού που δεν έχουν τη δυνατότητα να προσβάλλουν νέα κύτταρα με άμεσο αποτέλεσμα την μη εξάπλωση της νόσου.

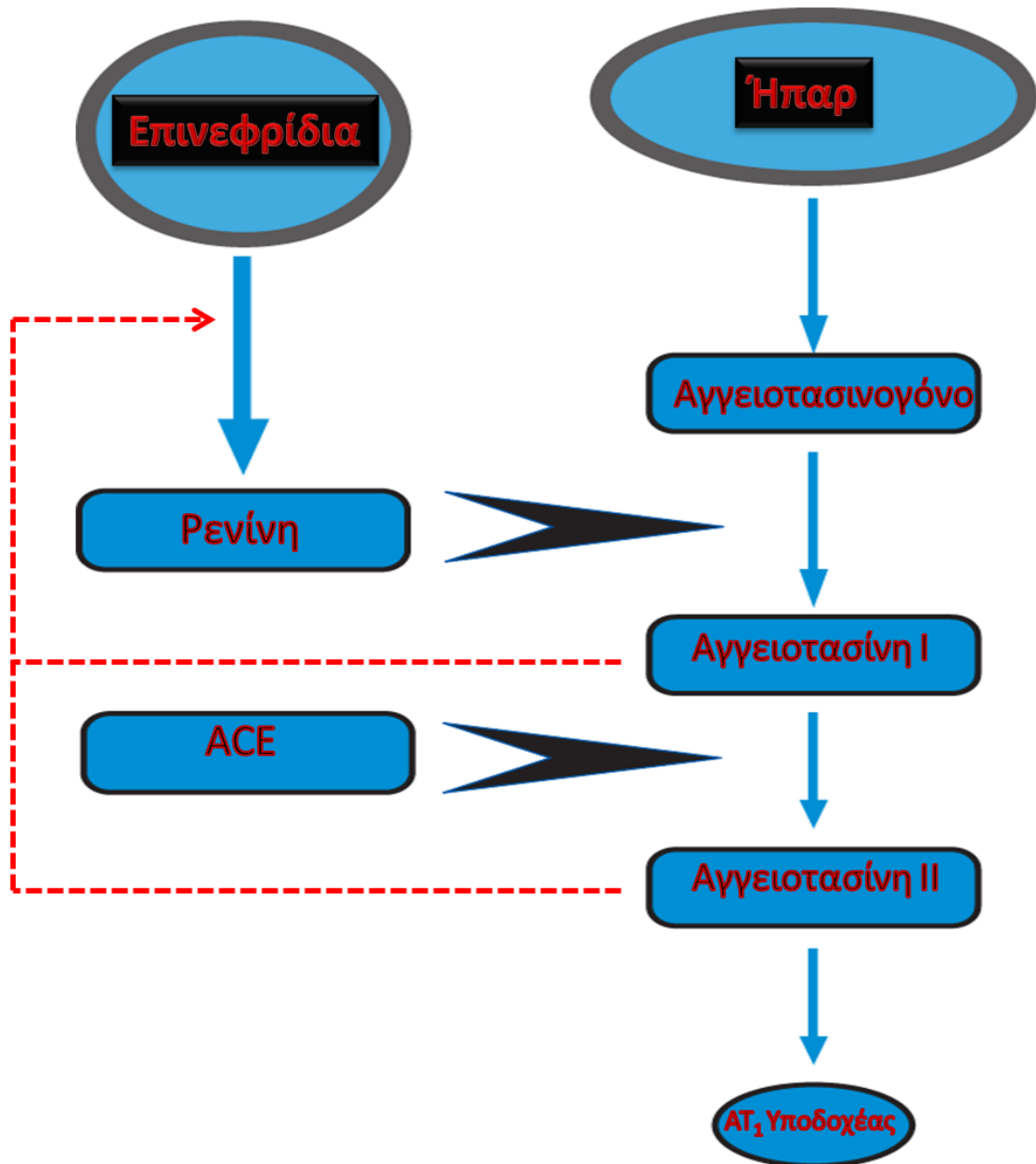
1.2 Σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης

Εξίσου σημαντικό πρόβλημα με το AIDS στο σύγχρονο κόσμο αποτελούν και οι διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις. Σύμφωνα με διαθέσιμα κλινικά στοιχεία, περισσότεροι από 1 δισεκατομμύριο άνθρωποι έχουν αναπτύξει κάποιο είδος υπέρτασης.²⁹ Οι ερευνητές έχουν αναγνωρίσει αρκετά διαφορετικά συστήματα που ελέγχουν την καρδιαγγειακή πίεση. Το σημαντικότερο ίσως είναι το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης (renin-angiotensin-aldosterone system ή RAAS).³⁰ Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί αρκετά φαρμακευτικά σκευάσματα για την υπέρταση. Παρόλα αυτά ο έλεγχος της πίεσης στα υπέρτασικά άτομα είναι δύσκολος.^{31,32} Γίνεται

λοιπόν επιτακτικός ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη νέων καινοτόμων φαρμάκων για τον έλεγχο της υπέρτασης.

Στην Εικόνα 1.3 παρουσιάζεται σχηματικά το σύστημα RAAS. Η ρενίνη παράγεται από τα επινεφρίδια ενώ ο πρόδρομος της αγγειοτασίνης, το αγγειοτασινογόνο, παράγεται από το ήπαρ. Η ρενίνη ενεργοποιεί το αγγειοτασινογόνο και το μετατρέπει στην αγγειοτασίνη I. Στη συνέχεια το ένζυμο μετατροπής αγγειοτασίνης I (angiotensin converting enzyme-ACE) μετατρέπει την ορμόνη στην αγγειοτασίνη II. Στο τέλος αυτής της μεταβολικής διαδικασίας, η αγγειοτασίνη II προσδένεται στον υποδοχέα τύπου I της αγγειοτασίνης II (angiotensin II type 1 receptor-AT₁R). Ο υποδοχέας AT₁ βρίσκεται, κυρίως, σε κύτταρα της καρδιάς, των αιμοφόρων αγγείων, των νεφρών, των πνευμόνων και του εγκεφάλου. Η δράση της αγγειοτασίνης II επιφέρει την αύξηση παραγωγής αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια. Επίσης, οδηγεί στη συστολή των αγγείων και κατ' επέκταση την αύξηση της πίεσης καθώς και στην κατακράτηση νερού.³³

Με την πάροδο των χρόνων και κυρίως μετά την κυκλοφορία των πρώτων αναστολέων του υποδοχέα AT₁ (πχ λοσαρτάνης- losartan)³⁴, ανακαλύφθηκε ότι το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης δρα και σε τοπικό-κυτταρικό επίπεδο.^{35,36} Οι σημαντικότεροι ιστοί που περιλαμβάνουν το σύστημα RAS είναι τα νεφρά, ο εγκέφαλος, η καρδιά, τα μάτια και τα λιποκύτταρα (λιπώδης ιστός). Ουσιαστικά, παρατηρούμε πως το σύστημα RAS δρα με τρεις διαφορετικούς τρόπους: ενδοκρινικά (σε όλο τον οργανισμό, μέσω των ενδοκρινών αδένων), παρακρινικά (παράγεται σε ένα κύτταρο και δρα στα γειτονικά κύτταρα μόνο, μέσω τοπικών υποδοχέων) και διακρινικά (μέσα στο ίδιο το κύτταρο μόνο).³⁷⁻³⁹ Το σύστημα RAS περιλαμβάνει όλα τα σημαντικά στοιχεία για την παραγωγή της ορμόνης αγγειοτασίνης II καθώς και τους αντίστοιχούς υποδοχείς. Μάλιστα οι διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, καταδεικνύουν πως η ρενίνη, σε όλα τα διαφορετικά συστήματα RAS, παράγεται σχεδόν αποκλειστικά από τα επινεφρίδια.



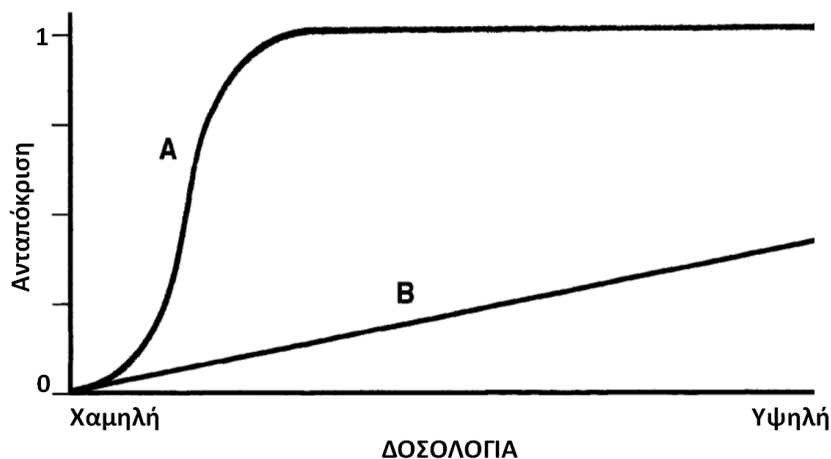
Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος RAS. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά την αρνητική ανάδραση (negative feedback) των ολιγοπεπτιδίων αγγειοτασίνη I και II στο σύστημα παραγωγής ρενίνης.

Στο επίπεδο του οργανισμού, τα διαφορετικά συστήματα RAS λειτουργούν συμπληρωματικά και μόνο στους ενδοκρινείς αδένες και στον εγκέφαλο το τοπικό σύστημα RAS δρα ανεξάρτητα από το κυκλοφορικό.⁴⁰ Συγκεκριμένα, το τοπικό σύστημα RAS συμβάλλει στον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων και στη σύνθεση πρωτεϊνών, ενώ το κυκλοφορικό RAS ελέγχει

την ομοίωση στον οργανισμό και την ισορροπία των διαφορετικών ηλεκτρολυτών και κατά συνέπεια την πίεση.^{41,42}

Ο έλεγχος της λειτουργίας του συστήματος RAAS αποτελεί σημαντικό όπλο στην καταπολέμηση της υπέρτασης καθώς και διαφόρων άλλων παθήσεων όπως η καρδιακή ανεπάρκεια και διαφόρου τύπου νεφροπάθειες.⁴³ Η πλειονότητα των αντί-υπερτασικών φαρμάκων κατατάσσεται στις κατηγορίες: των διουρητικών, των β-αναστολέων (β-blockers), των αναστολέων του ενζύμου μετατροπής αγγειοτασίνης I και των αναστολέων του υποδοχέα AT₁.⁴⁴ Ο τελικός στόχος στην αντιμετώπιση της υπέρτασης είναι η μείωση των ανεπιθύμητων επιπτώσεων, όπως αυτές εμφανίζονται στα νεφρά (πχ νεφρική τοξικότητα, σχηματισμός πέτρας) και στον εγκέφαλο (πχ κεφαλαλγία, ημικρανίες). Επίσης, ο έλεγχος του συστήματος RAAS μπορεί να συμβάλει και στην προστασία διαφόρων οργάνων, λόγω της επίπτωσης και στο τοπικό σύστημα RAS.^{45,46}

Η επιτυχία των διάφορων φαρμάκων σε συνδυασμό με την εκτεταμένη έρευνα στο σύστημα RAS οδήγησε πολλούς ερευνητές να σχεδιάσουν αναστολείς και για τη ρενίνη.⁴⁷ Ο βασικός λόγος για την ανάπτυξη αναστολέων της ρενίνης, είναι η παρατήρηση του φαινομένου της μη σημαντικής εξάρτησης δόσης-ανταπόκρισης (flat-dose response) (Εικόνα 1.4) για τα περισσότερα φάρμακα μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα.⁴⁸ Η ανταπόκριση και η δοσολογία σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα (efficacy) και τη δραστικότητα (potency) του φαρμάκου. Η δραστικότητα (EC₅₀) ενός μορίου ορίζεται ως η συγκέντρωση όπου το μόριο εμφανίζει δράση στο 50% της μέγιστης απόκρισης, ενώ αποτελεσματικότητα (E_{max}) είναι η μέγιστη απόκριση. Αυτό σημαίνει ότι συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές που παράγουν την τιμή E_{max} δεν αυξάνουν την απόκριση του φαρμάκου. Το φαινόμενο επίπεδης καμπύλης δόσης-απόκρισης παρατηρείται επειδή η αναστολή της παραγωγής του οκταπεπτιδίου της αγγειοτασίνης II, οδηγεί σε μια αρνητική ανάδραση (negative feedback) στο σύστημα RAAS (Εικόνα 1.3).⁴⁹ Συγκεκριμένα, όταν τα επίπεδα της αγγειοτασίνης II πέφτουν σημαντικά λόγω αναστολής του ενζύμου ACE, η παραγωγή της ρενίνης αυξάνεται. Έτσι, οδηγείται ο οργανισμός σε παραγωγή της αγγειοτασίνης II μέσω μεταβολικών διεργασιών που δεν περιλαμβάνουν το ένζυμο ACE.⁴⁹⁻⁵¹



Εικόνα 1.4: Διαγραμματική παρουσίαση καμπύλης δόσης-απόκρισης. Η καμπύλη A δείχνει την υψηλή απόκριση σε σχέση με τη δοσολογία ενώ η καμπύλη B παρουσιάζει τη χαμηλή απόκριση μιας ουσίας σε σχέση με τα δοσολογία.

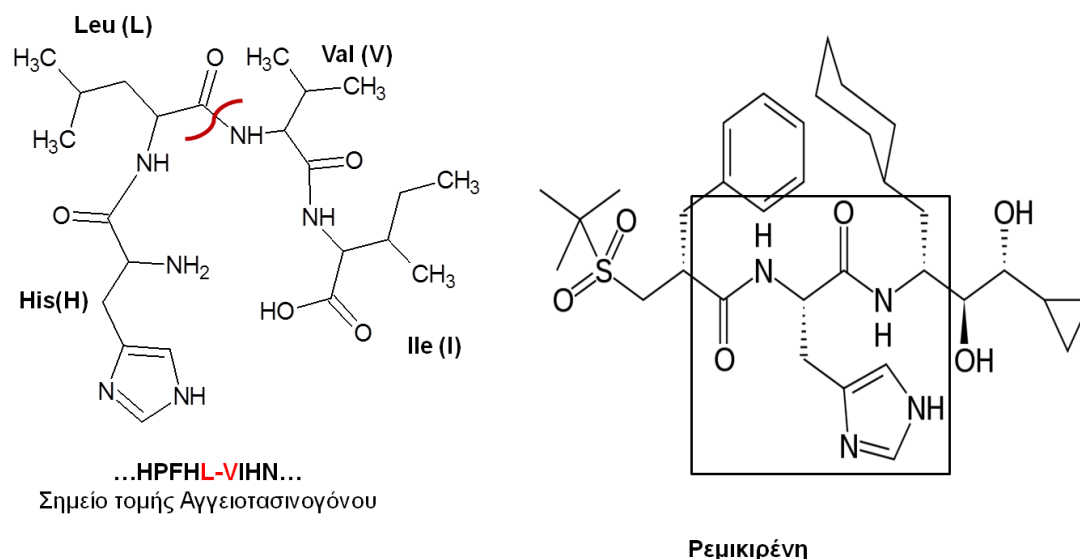
Είναι εμφανές λοιπόν πως η ρενίνη αποτελεί ένα σημαντικότερο φαρμακευτικό στόχο καθώς ελέγχει το πρώτο βήμα στην ενεργοποίηση της αγγειοτασίνης και αποτελεί επίσης το ρυθμιστικό στάδιο της όλης διαδικασίας.⁵² Συνεπώς η αναστολή της συμβάλλει στη μείωση της πίεσης. Μάλιστα κυριαρχεί και η άποψη ότι η αναστολή της ρενίνης επιφέρει και λιγότερες παρενέργειες σε σχέση με τις άλλες κατηγορίες φαρμάκων που έχουν διαφορετικούς στόχους.^{43,53,54}

Από τα τέλη της δεκαετίας του 1980 άρχισαν να αναπτύσσονται οι πρώτοι αναστολείς ρενίνης που ήταν ανάλογα του φυσικού υποστρώματος.⁴⁴ Οι σημαντικότεροι αναστολείς της ρενίνης είναι η εναλκίρηνη (enalapirone, A-64662, Abbott, Abbott Park, IL, USA),⁵⁵ η ρεμικίρηνη (ramipril, Ro-425892, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland),⁵⁶ η ζανκίρηνη (zincapirone, A-72517, Abbott)⁵⁷ και η αλισκίρηνη (aliskiren, CGP 60536B, Novartis, Basel, Switzerland).⁵⁸ Οι δομές των αναστολέων της ρενίνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3. Από τα τέσσερα αυτά μόρια η αλισκίρηνη είναι το πρώτο φάρμακο που λαμβάνεται από το στόμα και έχει εγκριθεί για την καταπολέμηση της υπέρτασης από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) το 2007. Μάλιστα, εμφανίζει ανασταλτική δράση της τάξης των nM, ($IC_{50} = 0,6$ nM) και παρουσιάζει χρόνο ημι-ζωής ≈ 24 ώρες.⁵⁹ Όπως και στην περίπτωση της HIV-1 πρωτεάσης, ο σχεδιασμός των πρώτων αναστολέων της ρενίνης

(ρεμικιρένη, εναλκιρένη, ζανκιρένη) βασίστηκε στη μίμηση του φυσικού υποστρώματός της (πεπτιδομημικά ανάλογα, Εικόνα 1.5).^{56,60} Η αλίσκιρένη είναι ένα μη-πεπτιδικό ανάλογο και σχεδιάστηκε με σκοπό την ισχυροποίηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης.^{30,47}

Πίνακας 1.3: Δομές των διαθέσιμων αναστολέων της ρενίνης.

Όνομα	Μοριακή Δομή
Εναλκιρένη (Enalkiren)	
Ρεμικιρένη (Remikiren)	
Ζανκιρένη (Zankiren)	
Αλίσκιρένη (Aliskiren)	



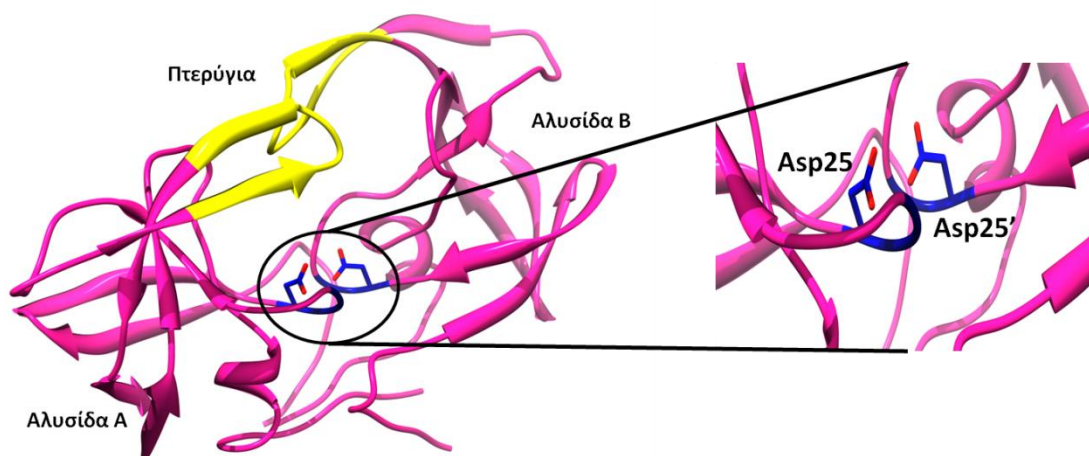
Εικόνα 1.5: Σχηματική σύγκριση του σημείου τομής (αμιδικός δεσμός Leu-Val) του αγγειοτασινογόνου (αριστερά) και της ρεμικιρένης (δεξιά).

1.3 Ασπαρτικές πρωτεάσες

Τόσο στην αντιμετώπιση του AIDS όσο και της υπέρτασης, οι βασικοί φαρμακευτικοί στόχοι είναι δύο πρωτεάσες, η HIV-1 πρωτεάση και η ρενίνη, αντίστοιχα. Και οι δύο αποτελούν μέλη της ίδιας οικογένειας ενζύμων και συγκεκριμένα των ασπαρτικών πρωτεασών.^{61,62} Κατά συνέπεια και οι δύο πρωτεΐνες εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά. Βασικό γνώρισμα της οικογένειας των ασπαρτικών πρωτεασών είναι η παρουσία δύο ασπαρτικών οξέων (Asp) στο ενεργό τους κέντρο. Τα δύο ασπαρτικά οξέα αποτελούν μέρη μια διπλής καταλυτικής αλληλουχίας τριών αμινοξέων, που έχει επιπλέον μια γλυκίνη (Gly) και μια θρεονίνη (Thr).⁶³ Η αλληλουχία Asp-Thr-Gly διατηρείται στα περισσότερα μέλη της οικογένειας αυτής, ενώ σε μερικά μέλη της το αμινοξύ Thr έχει αντικατασταθεί από τη σερίνη (Ser).⁶⁴ Η καταλυτική τριάδα βρίσκεται στο βάθος της κοιλότητας όπου προσδένεται το υποστρώμα.^{65,66} Τα δύο καταλυτικά Asp σε όλα τα ένζυμα της οικογένειας είναι τοποθετημένα αντικριστά στο χώρο. Η συγκεκριμένη χωροθέτηση συμβάλλει σημαντικά στο μηχανισμό υδρόλυσης καθώς ευνοεί τη μεταφορά πρωτονίων μεταξύ του υποστρώματος και του ενζύμου, που υποβοηθά στην υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού.⁶³

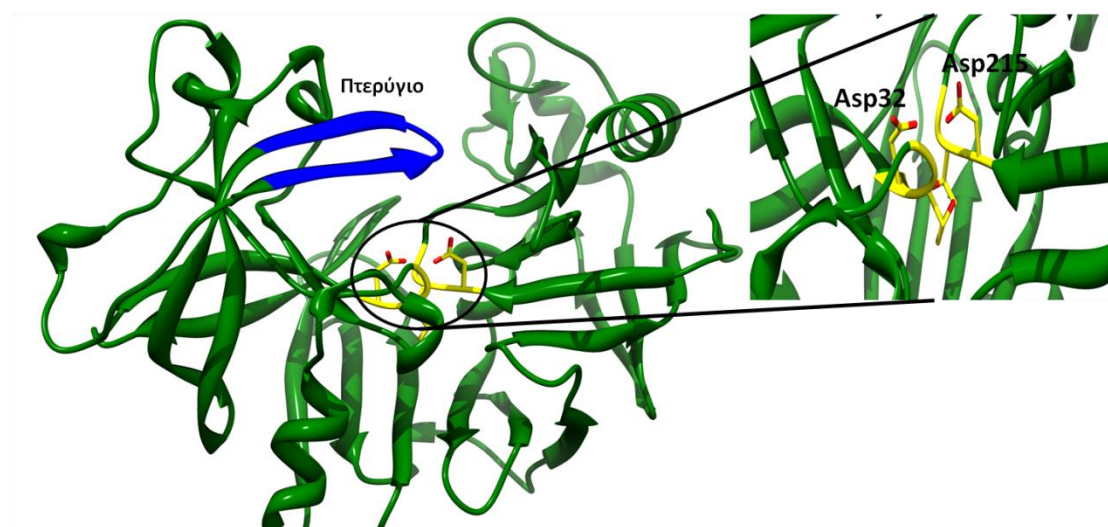
Η ιική πρωτεάση αποτελείται από δύο συμμετρικά όμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες των 99 αμινοξέων. Το ενεργό κέντρο της βρίσκεται στο βάθος της κοιλότητας που δημιουργείται από τις δύο αλυσίδες.^{65,67} Η καταλυτική τριάδα των αμινοξέων Asp-Thr-Gly βρίσκεται στις θέσεις 25-27 (αλυσίδα A) και 25'-27' (αλυσίδα B). Στο πάνω μέρος της κοιλότητας και σε επαφή με το διαλύτη βρίσκονται δύο πτερύγια, αποτελούμενα κυρίως από γλυκίνες (αμινοξέα 45-55 και 45'-55'). Τα πτερύγια αυτά καλύπτουν την κοιλότητα πρόσδεσης του υποστρώματος και ελέγχουν την είσοδο των διαφόρων μορίων στο ενεργό κέντρο (Εικόνα 1.6).

Υπάρχουν αρκετές υπολογιστικές και πειραματικές (κρυσταλλογραφικές και φασματοσκοπικές μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού-NMR) μελέτες, που καταδεικνύουν ότι τα πτερύγια στην ελεύθερη (άπο-) μορφή της πρωτεΐνης έχουν μεγάλη ευελιξία.⁶⁷⁻⁶⁹ Μάλιστα, παρατηρήθηκε ότι τα πτερύγια στην άπο-μορφή εμφανίζουν μια ισορροπία μεταξύ τριών διαφορετικών διαμορφώσεων: μιας «ανοιχτής» δομής, μιας «ημι-ανοιχτής» και μια «κλειστής» δομής. Από αυτές τις τρεις, η «ημι-ανοιχτή» διαμόρφωση είναι κυρίαρχη.⁷⁰ Κατά την πρόσδεση στην κοιλότητα της πρωτεάσης, τα πτερύγια υιοθετούν την «κλειστή» διαμόρφωση και η πρωτεΐνη παρουσιάζει μια πιο σταθερή δομή.⁷¹



Εικόνα 1.6: Απεικόνιση της HIV-1 πρωτεάσης. Με μπλε χρώμα παριστάνεται το ενεργό κέντρο της και με κίτρινο τα πτερύγια που βρίσκονται στην είσοδο της κοιλότητας πρόσδεσης. Στην ένθετη εικόνα δεξιά απεικονίζονται οι πλευρικές αλυσίδες των δύο καταλυτικών ασπαρτικών οξέων.

Η ρενίνη, σε αντίθεση με την HIV-1 πρωτεάση, αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα με 339 αμινοξέα. Και σε αυτήν την περίπτωση το ενεργό κέντρο –που αποτελείται από τα αμινοξέα Asp, Thr και Gly στις θέσεις 32/215, 33/216 και 34/217, αντίστοιχα– βρίσκεται βαθιά στην κοιλότητα του ενζύμου. Η κοιλότητα στη ρενίνη, περιβάλλεται από ένα πτερύγιο το οποίο αποτελείται από αμινοξέα που βρίσκονται γύρω από τη Ser στη θέση 76 (Εικόνα 1.7).⁴⁷ Όπως και στην ιική πρωτεάση, το πτερύγιο στη ρενίνη ελέγχει την είσοδο του προσδέτη στην κοιλότητα του ενζύμου. Κατ' αντιστοιχία, με την HIV-1 πρωτεάση, στην ελεύθερη ρενίνη η δομή του είναι αρκετά ευέλικτη ενώ κατά την πρόσδεση λαμβάνει μια «κλειστή» διαμόρφωση.^{72,73}



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση της ρενίνης. Με κίτρινο χρώμα παριστάνεται το ενεργό κέντρο της και με μπλε το πτερύγιο που βρίσκεται στην είσοδο της κοιλότητας πρόσδεσης. Στην ένθετη εικόνα δεξιά απεικονίζονται οι πλευρικές αλυσίδες των δύο καταλυτικών ασπαρτικών οξέων.

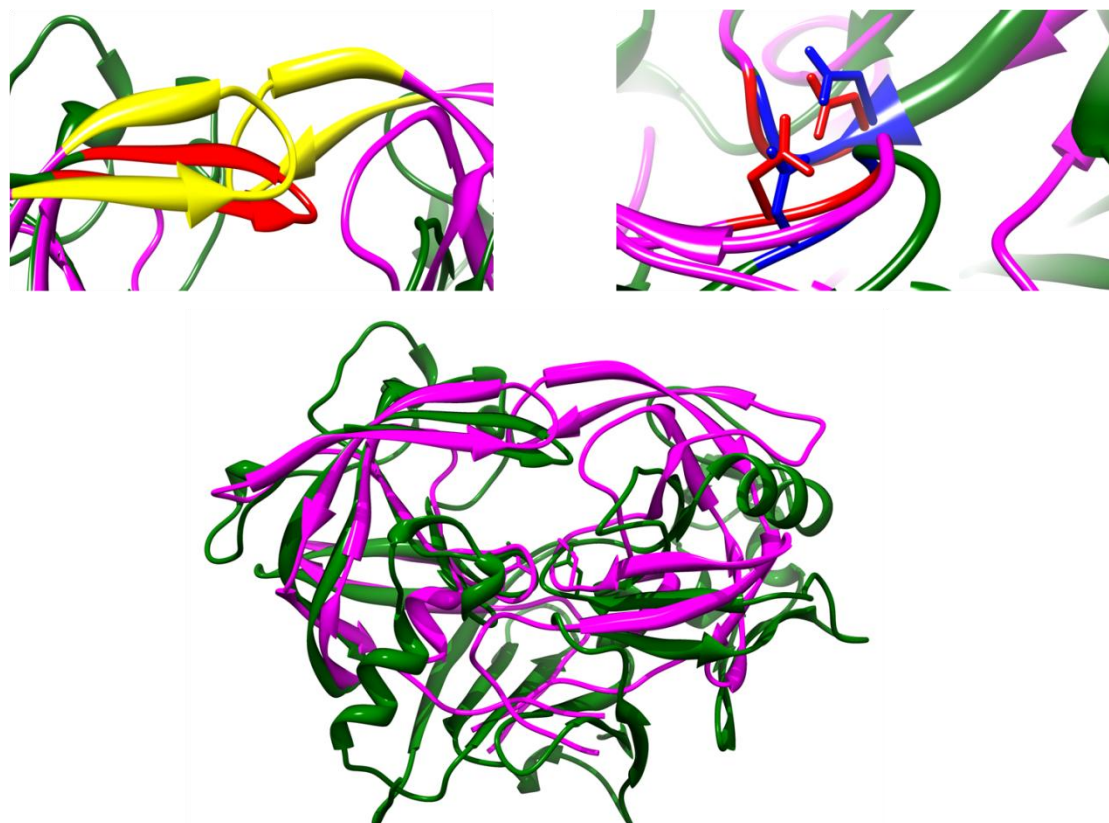
Το γεγονός των κοινών δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των δύο ενζύμων μας οδήγησε στη σύγκριση αυτών. Η υπέρθεση των δύο δομών παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.8α. Είναι εμφανές πως οι δομές της ρενίνης (Εικόνα 1.8α, πράσινο) και της HIV-1 πρωτεάσης (Εικόνα 1.8α, μωβ) έχουν μεγάλες ομοιότητες (RMSD = 1,20 Å). Επίσης, η σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων γύρω από το ενεργό κέντρο (Εικόνα 1.8β) επιβεβαιώνει τις

ομοιότητες των δύο πρωτεϊνών. Παρατηρούμε πως και στις δύο περιπτώσεις υπάρχει μια υδροφοβική περιοχή που προηγείται του ενεργού κέντρου. Στην HIV-1 πρωτεάση αποτελείται από τα αμινοξέα Ala21/21'-Leu22/22'-Leu23/23' και στη ρενίνη αποτελείται από: Val35-Val36-Phe37/Ala222-Leu223-Val224. Όσον αφορά το ενεργό κέντρο τους, πειραματικές και υπολογιστικές μελέτες έδειξαν ότι πρωτονιωμένο είναι μόνο το ένα από τα δύο Asp.⁷⁴⁻⁷⁷

Οι ομοιότητες μεταξύ των δύο ενζύμων έχουν περιγραφεί σε αρκετές μελέτες. Το 1991, οι Sharma *et al.* σε μια μελέτη τους, κατέγραψαν την παραγωγή αγγειοτασίνης I από την HIV-1 πρωτεάση σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της ρενίνης.⁷⁸ Αυτή η βιολογική παρατήρηση συνέβαλε σημαντικά στην κατανόηση του μηχανισμού των δύο ενζύμων και κατέδειξε τις λειτουργικές ομοιότητες στις ασπαρτικές πρωτεάσες. Οι Zhang *et al.* (1991), έκαναν χρήση ιόντων ψευδαργύρου για την αναστολή των δύο πρωτεϊνών.⁷⁴ Οι ερευνητές παρατήρησαν αναστολή στη λειτουργία και της ρενίνης και της HIV-1 πρωτεάσης. Η αναστολή της ρενίνης είχε μη-ανταγωνιστικό (non-competitive) χαρακτήρα, καθώς τα ιόντα ψευδαργύρου δεν εμποδίζουν την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο του υποστρώματος, αλλά αναστέλλουν τη λειτουργία του ενζύμου. Αντίθετα στην ιική πρωτεάση η αναστολή ήταν ανταγωνιστική (competitive)/ μη-ανταγωνιστική. Και στις δύο περιπτώσεις πάντως, η αναστολή της λειτουργίας ήταν άμεσα εξαρτώμενη από το pH όπως και σε άλλα μέλη της οικογένειας (πχ πεπσίνη).

Αυτές οι δομικές και λειτουργικές ομοιότητες μας οδηγούν στην υπόθεση πως τα κοινά χαρακτηριστικά τους θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό νέων καινοτόμων φαρμάκων με διπλή δράση. Αυτή η προσέγγιση περιγράφεται αναλυτικότερα στο Κεφάλαιο 7 όπου εξετάζεται διεξοδικά η δράση των εμπορικών αναστολέων νταρουναβίρης (HIV-1 πρωτεάσης) και αλισκιρένης (ρενίνης) στα δύο ένζυμα.⁷⁹ Επίσης, στην ίδια εργασία γίνεται ανάλυση και για το συσχετισμό λειτουργικών χαρακτηριστικών της ρενίνης και της HIV-1 πρωτεάσης μέσω του κοινού μηχανισμού δράσης του φαρμάκου καναγλιφλοζίνης (canagliflozin).

(α)



(β)



Εικόνα 1.8: (α) Υπέρθωση των δομών της ρενίνης (πράσινο) και της HIV-1 πρωτεάσης (μωβ). Πάνω αριστερά παρουσιάζεται η υπέρθεση των πτερυγίων από τα δύο ένζυμα, ρενίνη (κόκκινο) και HIV-1 πρωτεάση (κίτρινο). Τέλος, πάνω δεξιά, είναι το ενεργό κέντρο της ρενίνης (μπλε) και του ιικού ενζύμου (κόκκινο) και (β) σύγκριση της αλληλουχίας των αμινοξέων στην περιοχή του ενεργού κέντρου –με σκούρα γράμματα εμφανίζεται η καταλυτική τριάδα Asp-Thr-Gly.

1.4 Μοριακή μοντελοποίηση και ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων

Είναι εμφανές, πως οι υπολογιστικές μελέτες αποτελούν ένα σημαντικό όπλο στο σχεδιασμό καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων. Με τη συμβολή των συνεχώς αναπτυσσόμενων υπολογιστικών προγραμμάτων καθώς και κλάδων όπως η στατιστική, η βιοχημεία και η βιολογία, έχει γίνει δυνατή η θεωρητική

προσομοίωση διαφόρων βιολογικών και χημικών διεργασιών. Στη φαρμακευτική χημεία είναι απαραίτητο να μπορούμε να προβλέψουμε τις ιδιότητες νέων ουσιών και τη συμπεριφορά τους στα διαφορετικά βιολογικά συστήματα. Η ανάλυση των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ πιθανών φαρμακευτικών μορίων και των αντίστοιχων στόχων προσφέρει δυνατότητες ορθολογικού σχεδιασμού καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων σε μικρότερο χρονικό διάστημα και συνεπώς με μικρότερο κόστος.

Η χρήση τεχνικών όπως η μέθοδος Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (Quantitative Structure-Activity Relationships– QSAR) και η μοριακή δυναμική (ΜΔ) προσφέρουν τη δυνατότητα για σχεδιασμό νέων αναστολέων και την αξιολόγηση της βιολογικής τους δράσης (βλ. Κεφάλαιο 4).⁸⁰ Όπως αναφέρεται και στο Κεφάλαιο 4 (Ενότητα 4.1), μια ομάδα ουσιών με ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες είναι τα φουλερένια. Αρκετά παράγωγα των φουλερενίων έχουν προταθεί ως αναστολείς της HIV-1 πρωτεάσης. Στην παρούσα μελέτη, η χρήση διαφορετικών υπολογιστικών μεθόδων οδηγεί στο σχεδιασμό νέων φουλερενικών παραγώγων με ισχυρότερη ανασταλτική δράση στην πρωτεάση. Επίσης η χρήση υπολογιστικών τεχνικών (ΜΔ, MM–PBSA, TI) μπορεί να συμβάλλει στην βαθύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων και των αντίστοιχων μορίων–στόχων (βλ. Κεφάλαια 5 και 6).^{72,81} Τα αποτελέσματα των μελετών μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω αξιολόγηση και σύγκριση μεταξύ συγγενών πρωτεϊνών, όπως είναι η ρενίνη και η HIV-1 πρωτεάση. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η μελέτη της διασύνδεσης διαφορετικών ασθενειών και ο σχεδιασμός ή ανακάλυψη καινοτόμων μορίων με διπλή δράση, με απώτερο στόχο την αποφυγή της πολυφαρμακίας και των αρνητικών συνεπειών της στους ασθενείς (βλ Κεφάλαιο 7).⁷⁹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Μοριακή μοντελοποίηση και φαρμακευτικός σχεδιασμός

Ένα σημαντικό τμήμα της σχεδίασης νέων φαρμάκων αποτελεί η μελέτη της πρόσδεσης στον υποδοχέα χρησιμοποιώντας μια σειρά τεχνικών. Στην παρούσα διατριβή, θα διερευνήσουμε τον τρόπο πρόσδεσης επιλεγμένων μορίων/φαρμάκων σε πρωτεΐνες που εντάσσονται στην οικογένεια των ασπαρτικών πρωτεασών χρησιμοποιώντας ένα σύνολο υπολογιστικών τεχνικών.

Οι περισσότερες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα είναι μη πεπτιδικής μορφής. Οι ουσίες αυτές (προσδέτες στους υποδοχείς) είναι δυνατό να παράγονται είτε από κάποιον οργανισμό (πχ μύκητες) ή να συντίθενται στο εργαστήριο. Προγράμματα μοριακής πρόσδεσης ή μοριακής δυναμικής μπορούν να συμβάλλουν στη σχεδίαση νέων και καινοτόμων φαρμάκων, λόγω της δυνατότητας προσομοίωσης των αλληλεπιδράσεων των φαρμακευτικών ουσιών με τα ενεργά κέντρα των πρωτεϊνικών υποδοχέων. Οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις διαχωρίζονται κυρίως σε: ηλεκτροστατικές, υδροφοβικές, van der Waals, δεσμοί υδρογόνου και μη πολικές. Εκτίμηση των παραπάνω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της υπό έρευνα φαρμακευτικής ουσίας και του ενεργού κέντρου την πρωτεΐνης, συμβάλλει στην κατανόηση του τρόπου δράσης του φαρμάκου και καθιστά δυνατή τη βελτίωση της.

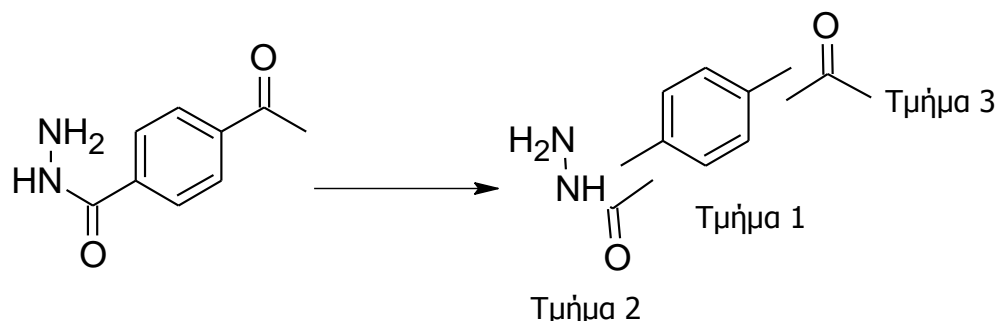
2.2 Αλγόριθμοι προγραμμάτων μοριακής πρόσδεσης

Τα προγράμματα που έχουν αναπτυχθεί για την προσομοίωση πρόσδεσης χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες: (α) αυτά που χρησιμοποιούν μεθόδους συνταιριασμού (matching methods) και (β) αυτά που χρησιμοποιούν προσομοίωση πρόσδεσης (docking simulation methods).^{82,83}

Η διαφορά αυτών των δύο προσεγγίσεων έγκειται στον τρόπο με τον οποίο προσδιορίζουν την διαδικασία πρόσδεσης. Στις μεθόδους

συνταιριασμού δημιουργούμε ένα μοντέλο του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης, στο οποίο περιλαμβάνονται τμήματα που μπορούν να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου καθώς και τμήματα τα οποία δεν εμφανίζουν στερεοχημικά εμπόδια. Επίσης, στη συγκεκριμένη διαδικασία, ο προσδέτης «τεμαχίζεται» σε μικρότερα τμήματα (anchors). Έτσι, γίνεται εφικτή η γεωμετρική αντιπαραβολή του με το κέντρο πρόσδεσης. Η διαδικασία αυτή εμφανίζεται στο πρόγραμμα DOCK 6.4.^{84,85} Το συγκεκριμένο πρόγραμμα είναι χρήσιμο στο γρήγορο έλεγχο μεγάλων βάσεων δεδομένων χημικών ουσιών (πχ βάση δεδομένων ZINC)⁸⁶ για την εύρεση ουσιών που μπορεί να έχουν σημαντικές φαρμακοχημικές ιδιότητες.

Τα τμήματα του προσδέτη περιλαμβάνουν άκαμπτους δεσμούς και συνδέονται μεταξύ τους μέσω ευέλικτων δεσμών (rotatable) όπως παριστάνεται στην Εικόνα 2.1α. Στη συνέχεια ο αλγόριθμος ιεραρχεί τα τμήματα ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων που περιλαμβάνονται, εξαιρώντας τα υδρογόνα. Ο αριθμός των τμημάτων καθώς και των ατόμων κάθε τμήματος μπορεί να οριστεί είτε από το χρήστη είτε αυτόματα από το πρόγραμμα.



Εικόνα 2.1: Παράδειγμα του τρόπου διαχωρισμού του προσδέτη σε τμήματα από το DOCK. Ο προσδέτης 4-ακέτυλο-βενζουδραζίδιο χωρίζεται στο άκαμπτο τμήμα 1 και στα ευέλικτα τα τμήματα 2 και 3.

Ο αλγόριθμος στη συνέχεια ελέγχει το κάθε τμήμα ξεχωριστά μέσα στην κοιλότητα πρόσδεσης. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη γεωμετρική τοποθέτηση του πρώτου τμήματος, τον έλεγχο των διαμορφώσεων του και την ενέργεια αλληλεπίδρασης του. Στη συνέχεια προστίθεται το επόμενο τμήμα ώστε να δημιουργηθεί μεγαλύτερο δομικό τμήμα του μορίου και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία, μέχρι τη συμπλήρωση των δομικών τμημάτων που

απαρτίζουν το μόριο. Οι διαφορετικές διαμορφώσεις που παράγονται ελέγχονται και επιλέγεται αυτή με την μεγαλύτερη επίδοση (scoring).

Η ενέργεια πρόσδεσης ενός μορίου υπολογίζεται με τη χρήση του λογισμικού DOCK και συγκεκριμένα της εξίσωσης:⁸⁷

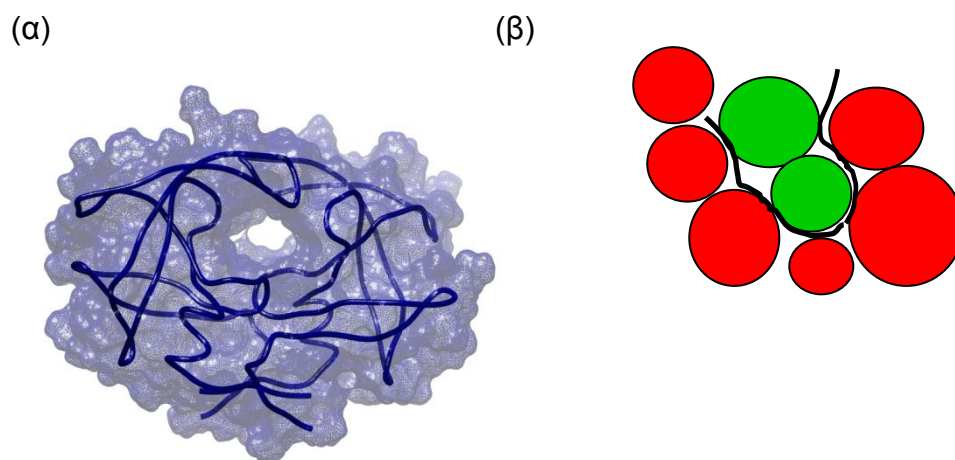
$$E = \sum_{i=1}^{lig} \sum_{j=1}^{rec} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^a} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^b} + \frac{1}{\epsilon} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right), \quad (2.1)$$

όπου η ενέργεια είναι το διπλό άθροισμα ηλεκτροστατικών και στερικών αλληλεπιδράσεων ατόμων i και j του προσδέτη και του υποδοχέα, αντίστοιχα. Α και Β αποτελούν σταθερές απώθησης και έλξης, ενώ ο όρος $1/\epsilon$ εκφράζει την επιρροή της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου. Οι αλληλεπιδράσεις που οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου υπολογίζονται με βάση γεωμετρικά κριτήρια (γωνία, απόσταση).⁸⁸

Στο λογισμικό DOCK ο ορισμός του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης γίνεται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα sphgen.⁸⁹ Από τον αλγόριθμο δημιουργείται ένα σύνολο σφαιρών, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον ορισμό είτε ενός μορίου (πχ του προσδέτη) είτε μιας επιφάνειας (Εικόνα 2.2α). Η διαδικασία για τον προσδέτη που περιγράφηκε πιο πάνω ακολουθείται για την περιοχή που ορίζεται από τις εν λόγω σφαίρες (Εικόνα 2.2β).

Τα προγράμματα που ακολουθούν τη δεύτερη μέθοδο παρουσιάζουν μια διαφορετική προσέγγιση. Σε αυτήν την περίπτωση, το μόριο προσδέτης ελέγχεται με μεγαλύτερη ακρίβεια στο κέντρο πρόσδεσης. Πιο συγκεκριμένα στην προσομοίωση, ο προσδέτης πλησιάζει την πρωτεΐνη και «ψάχνει» γενικά τον ευνοϊκότερο ενεργειακά τρόπο πρόσδεσης ερευνώντας όλες τις δυνατές θέσεις, τον προσανατολισμό και τις διαφορετικές δομές μέχρι να βρει την καταλληλότερη θέση πρόσδεσης. Επίσης η συγκεκριμένη μέθοδος προσομοιάζει τον προσδέτη ως ελαστικό σώμα (flexible body) όσον αφορά στον υπολογισμό της ενέργειας πρόσδεσης. Συνέπεια αυτής της μεθόδου είναι η αύξηση του υπολογιστικού χρόνου. Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η παροχή δυνατότητας στους ερευνητές να ελέγχουν αποτελεσματικότερα τις αλληλεπιδράσεις προσδέτη-κέντρου πρόσδεσης, καθώς επίσης και την επίδραση της αλλαγής λειτουργικών ομάδων του μορίου

προσδέτη. Παραδείγματα τέτοιων προγραμμάτων είναι το AUTODOCK⁹⁰ και το ArgusLab.⁹¹



Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση (α) της επιφάνειας της HIV-1 πρωτεΐνης και (β) του κέντρου πρόσδεσης αποτελούμενο από έξι άτομα (κόκκινο). Οι πράσινες σφαίρες αποτελούν τα σημεία επαφής στην επιφάνεια (μαύρο).

Στους γενετικούς αλγόριθμους η πρόσδεση αντιμετωπίζεται ως ένα πρόβλημα με πολλούς βαθμούς ελευθερίας. Ο προσδέτης τοποθετείται σε τυχαίες συντεταγμένες και ο αλγόριθμος στη συνέχεια ελέγχει πιθανές, μετατοπίσεις και διαμορφώσεις του μορίου, με τελικό στόχο την εύρεση της βέλτιστης διαμόρφωσης.⁹² Ο τρόπος πρόβλεψης της ενέργειας πρόσδεσης βασίζεται στο διαχωρισμό της σε διακριτές συνιστώσες:

$$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{υδροφοβική}} + \Delta G_{\text{δεσμοί-H}} + \Delta G_{\text{δεσμοί-H}^*} + \Delta G_{\text{παραμόρφωσης}} + \Delta S_0 \quad (2.2)$$

*Δεσμοί-H που περιλαμβάνουν φορτισμένους δότες και/ ή ομάδες δέκτες.

Οι συνολικές αλληλεπιδράσεις van der Waals συμπεριλαμβάνονται στο γενικό όρο ΔG_{vdW} . Οι υπόλοιποι όροι αναφέρονται στην υδροφοβική επίδραση, στους δεσμούς H μεταξύ των μορίων, στις παραμορφώσεις των μορίων ($\Delta G_{\text{παραμόρφωσης}}$) καθώς και στην επίδραση της κινητικής και περιστροφικής απώλειας εντροπίας (ΔS_0).⁹²

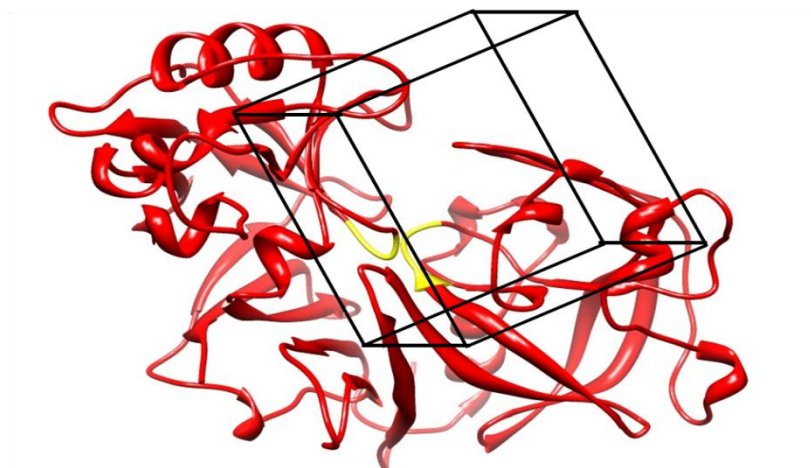
Με τη χρήση των προγραμμάτων αυτών, συνήθως, ελέγχονται οι διάφορες θέσεις και μορφές του προσδέτη κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Ουσιαστικά γίνεται μια στατιστική επιλογή των ευνοϊκότερων ενεργειακά θέσεων και μορφών του προσδέτη και οι κύκλοι επαναλαμβάνονται μέχρι να εκπληρωθούν τα κριτήρια που θέτει ο ερευνητής. Στους γενετικούς αλγόριθμους η διαδικασία ξεκινά με τη δημιουργία ενός τυχαίου πληθυσμού διαμορφώσεων, τον αριθμό των οποίων ορίζει ο χρήστης.⁹³ Κάθε διαμόρφωση λαμβάνει μια ομοιόμορφα κατανεμημένη, τυχαία τιμή (x,y,z) στο χάρτη του πλέγματος (grid map). Επίσης ο αλγόριθμος ορίζει τον προσανατολισμό, που αποτελείται από τυχαία αποδιδόμενες τιμές καθώς και τυχαίες γωνίες περιστροφής και διέδρες γωνίες μεταξύ -180° και +180°. Μετά τη δημιουργία του αρχικού πληθυσμού, ακολουθείται μια επαναληπτική διαδικασία (loop) με την παραγωγή γενεών, είτε μέχρι να συμπληρωθεί ο μέγιστος αριθμός γενεών, που έχει οριστεί, είτε μέχρι να υπολογιστεί ο μέγιστος αριθμός ενεργειακών εκτιμήσεων.⁹⁴

Στη διαδικασία, αξιολογείται πρώτα η καταλληλότητα (fitness) της κάθε διαμόρφωσης ξεχωριστά, η οποία αποτελείται από το σύνολο των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του προσδέτη και της πρωτεΐνης και των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων του προσδέτη. Στη συνέχεια ακολουθεί η επιλογή της ευνοϊκότερης ενεργειακά διαμόρφωσης, που θα αναπαραχθεί στην επόμενη γενιά σύμφωνα με τον τύπο:

$$n = (f_w - f_i) / (f_w - \langle f \rangle), \quad f_w \neq \langle f \rangle, \quad (2.3)$$

όπου n είναι ο ακέραιος αριθμός των διαμορφώσεων, f_i η καταλληλότητα, f_w η μικρότερα ευνοϊκότερη ενεργειακά τιμή στην τελευταία N γενιά (ο αριθμός N ορίζεται από τον χρήστη) και $\langle f \rangle$ είναι η μέση καταλληλότητα του πληθυσμού.^{83,94} Ένας επιπλέον παράγοντας, ο οποίος μπορεί να προσδιοριστεί από τον χρήστη είναι ο παράγοντας του εκλεκτισμού (elitism factor). Στη συγκεκριμένη ακέραια παράμετρο ορίζονται πόσες από τις ευνοϊκότερες ενεργειακά διαμορφώσεις θα επιβιώσουν στην επόμενη γενιά. Το τελευταίο βήμα σε αυτή τη διαδικασία είναι ο ορισμός των διαστάσεων (x,

y, z) ενός τρισδιάστατου κουτιού έτσι ώστε να περιλαμβάνεται όλη η περιοχή που επιθυμούμε να εξετάσουμε (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση επιλογής του κέντρου πρόσδεσης της ρενίνης με το πρόγραμμα ArgusLab. Με κίτρινο χρώμα αναπαριστώνται τα αμινοξέα που αποτελούν το ενεργό κέντρο Asp38/225-Thr39/226-Gly40/227 και με μαύρο ένα κουτί διαστάσεων 25 x 25 x 25 Å³ με το οποίο ορίζεται η περιοχή πρόσδεσης.

Όσον αφορά στις παραμέτρους που περιέχουν οι αλγόριθμοι, μπορεί να παρατηρηθούν διαφορές μεταξύ υπολογισμένων και πειραματικών τιμών. Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται σε εντροπικές συνεισφορές από τις αλυσίδες της πρωτεΐνης και από τις διαμορφωτικές αλλαγές της, όπως επίσης και σε περιβαλλοντικές συνεισφορές, οι οποίες δεν είναι δυνατόν να συμπεριληφθούν στις παραμέτρους των αλγορίθμων. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν τα δύο αυτά προγράμματα (DOCK, ArgusLab) για τους υπολογισμούς των ενεργειών πρόσδεσης.

2.3 Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (Quantitative Structure–Activity Relationships, QSAR)

Παράλληλα με τα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης, έχουν αναπτυχθεί και διάφορες μέθοδοι που δίνουν τη δυνατότητα να μελετηθεί η επίδραση της δομής ενός μορίου σε βιολογικά συστήματα. Μία από αυτές είναι η μέθοδος QSAR, με την οποία δύναται να εκτιμηθεί η δραστηκότητα μιας συγκεκριμένης

δομής ή ενός συνόλου μορίων με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα, ερευνάται η σχέση επιλεγμένων ιδιοτήτων των μορίων με τη βιολογική τους δράση.^{95,96} Τελικός στόχος της τεχνικής είναι η δημιουργία μιας ομάδας σχέσεων με στόχο την αξιολόγηση νέων χημικών ενώσεων όσον αφορά τη δράση τους. Η μαθηματική αποτύπωση ενός μοντέλου QSAR έχει τη γραμμική μορφή:

$$\text{Βιολογική δράση} = \text{Σταθερά} + (C_1 * P_1) + (C_2 * P_2) + \dots + (C_n * P_n) \quad (2.4)$$

Οι παράμετροι P_1 – P_n εκφράζουν συγκεκριμένες ιδιότητες των επιλεγμένων μορίων (πχ διαλυτότητα) που μπορούν να συσχετιστούν με τη βιολογική δράση τους. Οι τιμές αυτές υπολογίζονται είτε πειραματικά είτε θεωρητικά, για κάθε ένα από τα μόρια. Αντίστοιχα, οι σταθερές (C_n) υπολογίζονται με στατιστικές μαθηματικές τεχνικές προσαρμογής (fitting). Είναι φανερό από την εξίσωση 4 ότι ένα μοντέλο QSAR συσχετίζει τη βιολογική δράση μιας ομάδας ουσιών με υπολογισμένες ή πειραματικές τιμές συγκεκριμένων ιδιοτήτων τους.^{97,98}

Για να είναι ένα μοντέλο QSAR αξιόπιστο θα πρέπει κατά τη δημιουργία του να χρησιμοποιηθεί ένα μεγάλο εύρος καλά κατανομημένων τιμών βιολογικής δράσης. Αυτές θα πρέπει να ποικίλουν μεταξύ υψηλών έως πολύ χαμηλών τιμών δραστηριότητας. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίσουμε ότι η ανάπτυξη ενός μοντέλου QSAR είναι άμεσα συνυφασμένη με το είδος και τον τρόπο διεξαγωγής των μετρήσεων βιολογικής δραστηριότητας. Απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη ενός ικανοποιητικού μοντέλου QSAR, είναι η προσεκτική επιλογή των δεδομένων. Υπάρχουν δηλαδή περιπτώσεις, όπου οι αρχικές μετρήσεις δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτούσιες για τη δημιουργία του μοντέλου. Καθώς στη μέθοδο QSAR συσχετίζεται η δομή με τη δραστηριότητα ενός μορίου, οι μετρήσεις θα πρέπει να μετατραπούν σε τιμές που να εκφράζουν αυτή τη σχέση,^{97,99,100} όπως είναι η αρνητική λογαριθμική κλίμακα της σταθερά αναστολής (IC_{50}).

Οι παράμετροι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα μοντέλο QSAR είναι αρκετές, όπως φυσικο-χημικές σταθερές ή ακόμα και αντίστοιχες τιμές που προέρχονται από κβαντικούς υπολογισμούς (π.χ. E_{LUMO} και E_{HOMO} ,

όπου E είναι η ενέργεια των αντίστοιχων: LUMO-Lowest Unoccupied Molecular Orbital, και HOMO-Highest Occupied Molecular Orbital).¹⁰¹⁻¹⁰³ Η ισχυρή συσχέτιση ιδιότητας-δραστηκότητας αυξάνει την ποιότητα των προβλέψεων του μοντέλου QSAR.¹⁰⁴

Η δημιουργία ενός χρηστικού μοντέλου QSAR προϋποθέτει ορισμένες παραδοχές. Από τις σημαντικότερες είναι ότι οι ιδιότητες πρέπει να υπολογίζονται ή να μετρούνται με ευκολία.¹⁰⁵ Επίσης, οι ιδιότητες του συνόλου ουσιών που χρησιμοποιούνται, πρέπει να εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση (variation). Η χρησιμοποίηση των διαφόρων παραμέτρων επιβάλλεται να γίνει με στατιστική γραμμική ανάλυση παλινδρομικά –μέθοδος ελαχίστων τετραγώνων– ώστε να παρουσιάζεται σωστά η επίδρασή τους. Η απόκλιση στα αποτελέσματα υπολογίζεται από την τιμή συσχέτισεως (correlation coefficient) R, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (\psi_i - f_i)^2}{\sum_i (\psi_i - \bar{\psi})^2} \quad (2.5)$$

όπου ψ_i είναι οι παρατηρούμενες τιμές και f_i είναι οι τιμές που παράγονται από το θεωρητικό μοντέλο (best fit line).

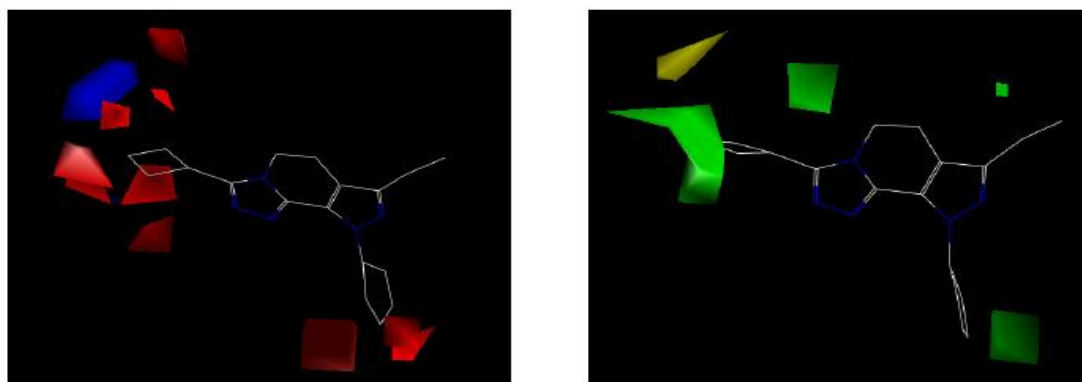
Μια από τις προσεγγίσεις για τη δημιουργία ενός μοντέλου QSAR είναι η μέθοδος CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis- Συγκριτική Ανάλυση Μοριακών Πεδίων).¹⁰⁶ Η μέθοδος βασίζεται στη γνώση βιολογικής δραστηκότητας και στην τρισδιάστατη δομή μίας χημικής ένωσης. Χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο μοντέλο ο ερευνητής ορίζει στη σειρά των χημικών ενώσεων κοινά δομικά χαρακτηριστικά, που θα χρησιμοποιηθούν ώστε να γίνει ευθυγράμμιση όλων των χημικών ενώσεων της ομάδας. Ακολούθως, υπολογίζονται τα διαφορετικά στοιχεία των δομών, όπως η ηλεκτροστατική και η στερική επίδραση στο δυναμικό πεδίο μοριακής μηχανικής. Οι εξισώσεις που παράγονται με αυτόν τον τρόπο είναι:

$$\begin{aligned} \text{Τμήμα}_1 &= \text{Σταθερά}_1 + a_1(\text{στερική}_{xyz}) + b_1(\text{στερική}_{xyz}) + \dots + a'_1(\text{ηλεκτροστ.}_{xyz}) + b'_1(\text{ηλεκτροστ.}_{xyz}) + \dots \\ \text{Τμήμα}_2 &= \text{Σταθερά}_2 + a_2(\text{στερική}_{xyz}) + b_2(\text{στερική}_{xyz}) + \dots + a'_2(\text{ηλεκτροστ.}_{xyz}) + b'_2(\text{ηλεκτροστ.}_{xyz}) + \dots \\ \text{Τμήμα}_n &= \text{Σταθερά}_n + a_n(\text{στερική}_{xyz}) + b_n(\text{στερική}_{xyz}) + \dots + a'_n(\text{ηλεκτροστ.}_{xyz}) + b'_n(\text{ηλεκτροστ.}_{xyz}) + \dots \end{aligned} \quad (2.6)$$

Στην εξίσωση 2.6 οι στερικές αλληλεπιδράσεις μέσα στο μοντέλο CoMFA υπολογίζονται σύμφωνα με το δυναμικό Lennard-Jones, ενώ οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις υπολογίζονται σύμφωνα με το δυναμικό Coulomb. Για την έγκυρη ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούμε στατιστικές μεθόδους, όπως είναι η μέθοδος μερικών ελάχιστων τετραγώνων (Partial Least Squares-PLS). Στη συγκεκριμένη στατιστική ανάλυση λαμβάνεται υπόψη ότι οι στερικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις σε γειτονικά σημεία ενός μορίου είναι παρόμοιες με συνέπεια να περιορίζεται ο αριθμός των παραμέτρων (Εξίσωση 2.6–a_n). Έτσι οι σταθερές που παράγονται με την ομάδα εξισώσεων 6 είναι άμεσα συνδεδεμένες με τη θέση και γίνεται εφικτή η εύρεση ενός μοτίβου (pattern) για τη σειρά των χημικών μορίων. Το μοντέλο καθώς και η αξιοπιστία του επικυρώνονται με τη διαδικασία διασταυρωμένης επικύρωσης (cross-validation). Η διασταύρωση διαφέρει από τις συνήθεις μεθόδους επειδή σ' αυτή ελέγχεται η αξιοπιστία ενός μοντέλου στηριζόμενο στο πόσο καλά προβλέπει τα δεδομένα. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο "leave-one-out" (LVO), δημιουργείται ένα μοντέλο από N-1 ουσίες και η νιοστή (N) ένωση προβλέπεται. Η αποδοτικότητα του μοντέλου ελέγχεται από το διασταυρούμενο συντελεστή συσχέτισης r_{cv}^2 που ορίζεται ως:

$$r_{cv}^2 = (SD-Press)/SD, \quad (2.7)$$

SD είναι το άθροισμα τετραγώνων αποκλίσεων για κάθε ιδιότητα από το μέσο όρο. Press (PREdictive Sum of Squares- Προβλεπόμενο άθροισμα τετραγώνων) είναι το άθροισμα των διαφορών μεταξύ των παρατηρούμενων και των προβλεπόμενων τιμών εις το τετράγωνο όταν μια ένωση δεν περιλαμβάνεται. Οι τιμές για το διασταυρούμενο συντελεστή συσχέτισης r_{cv}^2 κυμαίνονται μεταξύ -1 και 1. Αρνητικές τιμές υποδεικνύουν πως η βιολογική δραστηριότητα μια ένωσης, όπως προβλέπεται από το μοντέλο δεν είναι αξιόπιστη. Τα αποτελέσματα του τελικού μοντέλου παρουσιάζονται ως ισοϋψείς καμπύλες (contour maps). Στα συγκεκριμένα διαγράμματα εμφανίζονται τα τμήματα της χημικής ένωσης τα οποία επιδρούν στη δραστηριότητα της, είτε αυξάνοντας είτε μειώνοντάς τη (Εικόνα 2.4).



Εικόνα 2.4: Παράδειγμα μιας ισούψους καμπύλης ενός μοντέλου QSAR. Το κόκκινο χρώμα συμβολίζει τις περιοχές με ηλεκτροστατική επίδραση στη μείωση της δραστηριότητας, ενώ με μπλε χρώμα είναι οι περιοχές που αυξάνουν τη δραστηριότητα λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης (αριστερά). Αντίθετα οι στερικές επιδράσεις χρωματίζονται με πράσινο χρώμα όσες αυξάνουν και με κίτρινο όσες μειώνουν τη δραστηριότητα της χημικής ένωσης (δεξιά).

Παρόμοια μεθοδολογία ακολουθείται και στην ανάπτυξη του μοντέλου CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis).¹⁰⁷ Η διαφορά του έγκειται στη χρήση δεικτών ομοιότητας (similarity indices) για τον υπολογισμό των διαφορετικών παραμέτρων αντί για μοριακά πεδία. Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης τεχνικής έγινε για την αποφυγή προβλημάτων που παρατηρήθηκαν στη μέθοδο CoMFA.¹⁰⁸ Για παράδειγμα η επίδραση της εντροπίας δε λαμβάνεται υπόψη, ή λαμβάνεται υπόψη κατά τρόπο μη ικανοποιητικό, ενώ τα δυναμικά Lennard-Jones και Coulomb παρουσιάζουν μοναδικότητες –singularities- στη θέση των ατόμων.¹⁰⁷ Επίσης κατά την ανάπτυξη ενός μοντέλου CoMSIA λαμβάνονται υπόψη, πλην των ηλεκτροστατικών και στερικών αλληλεπιδράσεων, τις υδροφοβικές συνεισφορές καθώς και η επίδραση δεσμών υδρογόνου.

Είναι γενικά παραδεκτό πως τα μοντέλα 3D-QSAR στηρίζονται σε υποθέσεις όπως:¹⁰⁴

- (α) Το μόριο προσδέτης, και όχι τα μεταβολικά προϊόντα ή κάποια παράγωγά του έχουν βιολογική δράση
- (β) Η γεωμετρία του κέντρου πρόσδεσης θεωρείται σταθερή
- (γ) Το κέντρο πρόσδεσης είναι το ίδιο για όλα τα υπό έρευνα μόρια
- (δ) Το σύστημα υπό μελέτη θεωρείται πως βρίσκεται σε ισορροπία

(ε) Η επίδραση του διαλύτη, η θερμοκρασία, η διασπορά, το pH, η συγκέντρωση αλάτων και διάφοροι άλλοι παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την ενέργεια πρόσδεσης δε λαμβάνονται υπόψη.

2.4 Μοριακή Δυναμική (ΜΔ).

Για την καλύτερη δυνατή περιγραφή της δυναμικής και την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων σε μεγάλα συστήματα έχουν αναπτυχθεί υπολογιστικές μέθοδοι οι οποίες προσφέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα και συμπληρώνουν τα στοιχεία που συλλέγονται μέσω άλλων πειραματικών τεχνικών. Από τις βασικότερες τεχνικές *in silico* προσομοιώσεων είναι η μοριακή δυναμική και η μέθοδος Monte Carlo (MC).¹⁰⁹ Η διαφορά των δύο τεχνικών βρίσκεται στον τρόπο υπολογισμού των ιδιοτήτων ενός συστήματος. Για παράδειγμα, η μέθοδος MC είναι καταλληλότερη για συστήματα σε αέρια φάση. Αντίθετα, η μέθοδος ΜΔ χρησιμοποιείται κυρίως για βιολογικά συστήματα όπου τα μόρια εμφανίζουν πολλούς βαθμούς ελευθερίας που επηρεάζουν την δυναμική τους. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της ΜΔ σε σχέση με τη μέθοδο MC είναι η δυνατότητα υπολογισμού δυναμικών ιδιοτήτων (πχ ιδιότητες που εξαρτώνται από το χρόνο). Σε πολλές περιπτώσεις, οι δύο αυτές μέθοδοι μπορεί να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά. Κατά συνέπεια υπάρχει μια πληθώρα μεθόδων που συνδυάζουν στοιχεία από τις δύο προαναφερόμενες τεχνικές

110

Η δυνατότητα πρόβλεψης διαφόρων διαμορφώσεων αλλά και ενεργειακών καταστάσεων ενός μορίου αποτελεί σημαντικό εργαλείο στη σχεδίαση και σύνθεση νέων και αποτελεσματικότερων ουσιών με βιολογική δράση. Η τεχνική ΜΔ αναπτύχθηκε με σκοπό να συμβάλλει στην ουσιαστικότερη κατανόηση των διαμορφωτικών ιδιοτήτων της χημικής δομής και των διαφόρων μηχανισμών που επηρεάζουν χημικές ουσίες ή χημικές αντιδράσεις. Επίσης μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση μηχανισμών χημικών αντιδράσεων όσον αφορά διάφορες μεταβατικές δομές.

Με τη βοήθεια της ΜΔ έγινε εφικτή η δημιουργία δυναμικών μοντέλων πρωτεϊνικών μορίων και κατά συνέπεια η κατανόηση όπως και η πρόβλεψη των μηχανισμών λειτουργίας τους.^{111,112} Μία στατική απεικόνιση της πρωτεΐνης, η οποία προέρχεται από τις συνήθεις πειραματικές μεθόδους

απεικόνισης (κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, NMR), δεν μπορεί να δώσει πληροφορίες όσον αφορά τις δυναμικές λειτουργίες της. Για παράδειγμα, η στατική απεικόνιση της αιμοσφαιρίνης δε βοηθάει στην κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο τα άτομα του οξυγόνου δεσμεύονται από το κέντρο πρόσδεσης της αιμοσφαιρίνης.¹¹³ Η θεωρητική όμως εξήγηση που προτάθηκε, μέσω υπολογισμών ΜΔ, αφορούσε τη δημιουργία οδών πρόσβασης του οξυγόνου που διανοίγονται λόγω των θερμικών κινήσεων του μορίου της αιμοσφαιρίνης ¹¹²⁻¹¹⁴.

Οι γενικές αρχές της ΜΔ μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:¹¹⁵

- α) οι πυρήνες και τα ηλεκτρόνια των ατόμων θεωρούνται ενιαία σωματίδια πάνω στα οποία ασκούνται δυνάμεις.
- β) οι δεσμοί μεταξύ των ατόμων συμπεριφέρονται ως ελατήρια μεταξύ σφαιρών και διέπονται από το νόμο του Hooke.
- γ) η ενέργεια υπολογίζεται ως συνάρτηση των θέσεων των ατόμων στο χώρο
- δ) η αλληλεπίδραση μεταξύ των ατόμων περιγράφεται από τους νόμους της κλασικής μηχανικής.

Η ΜΔ βασίζεται σε ένα απλό μοντέλο αλληλεπιδράσεων μέσα σε ένα μοριακό σύστημα (σύστημα ατόμων και δεσμών μέσα σε ένα πεδίο δυνάμεων). Σε ένα τέτοιο πλαίσιο η συνολική ενέργεια υπολογίζεται ως το άθροισμα των δεσμικών και μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων. Ουσιαστικά γίνεται χρήση των εξισώσεων της κλασικής μηχανικής για κάθε άτομο του συστήματος καθ' όλη τη χρονική διάρκεια της προσομοίωσης.

$$f_i = -\frac{\partial}{\partial r_i} V, \quad (2.8)$$

όπου f_i είναι οι δυνάμεις που ενεργούν πάνω στα άτομα και υπολογίζονται από τη δυναμική ενέργεια $V(r^N)$ όπου $r^N = (r_1, r_2, \dots, r_N)$ είναι η συντεταγμένες στο χώρο του κάθε ατόμου. Οι αλγόριθμοι ΜΔ παράγουν στιγμιότυπα του συστήματος ως προς το χρόνο, μετά την επίλυση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα ($F=ma$, m : μάζα και a =επιτάχυνση). Οι δυνάμεις πάνω στα άτομα υπολογίζονται σύμφωνα με το εξίσωση 2.8.

2.4.1 Πεδία δυνάμεων μοριακής δυναμικής

Για τον υπολογισμό της δύναμης f , όπως περιγράφεται στην εξίσωση 2.8, πρέπει να γνωρίζουμε τη δυναμική ενέργεια του συστήματος. Η δυναμική ενέργεια εκφράζεται από το πεδίο δυνάμεων (force field) και έχει τη γενική μορφή:

$$V(r^N) = \sum_{\text{δεσμοί}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{γωνίες}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{στρέψη}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1+1}^N \left(4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (2.9)$$

όπου οι όροι $\sum_{\text{δεσμοί}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2$, $\sum_{\text{γωνίες}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2$ και $\sum_{\text{στρέψη}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma))$ εκφράζουν τις δεσμικές αλληλεπιδράσεις, ενώ ο όρος $\sum_{i=1}^N \sum_{j=1+1}^N \left(4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)$ τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις.

Η ανάπτυξη διαφορετικών λογισμικών σε συνδυασμό με την ύπαρξη πληθώρας συστημάτων (πχ, πρωτεΐνες, μεμβράνες, νουκλεϊκά οξέα), οδήγησε στη δημιουργία αρκετών πεδίων δυνάμεων. Η διαφορά τους βρίσκεται στην παραμετροποίηση για τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα τα πεδία δυνάμεων AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)¹¹⁶ και CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)¹¹⁷ χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό δυναμικής ενέργειας σε πρωτεΐνες, μεμβράνες και νουκλεϊκά οξέα, ενώ το OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations)¹¹⁸ χρησιμοποιείται κυρίως για τις προσομοιώσεις κρυστάλλων.

2.4.2 Μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις

Με τον όρο αυτό περιγράφονται οι αλληλεπιδράσεις ατόμων που δε συνδέονται με χημικό δεσμό. Οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων χωρίζονται σε διαφορετικούς όρους όπως παρουσιάζεται στην εξίσωση 2.10:

$$V_{\mu\eta-\delta\epsilon\sigma\mu\kappa\epsilon\varsigma}(r^N) = \sum_i u(r_i) + \sum_i \sum_{j>i} v(r_i r_j) + \dots \quad (2.10)$$

Ο όρος $u(r)$ αντιπροσωπεύει το δυναμικό ενός εξωτερικού πεδίου δυνάμεων ή τις επιδράσεις λόγω ύπαρξης περιοριστικών ορίων στο σύστημα. Κατά τις προσομοιώσεις μεγάλων συστημάτων (πχ πρωτεϊνών), ο πρώτος όρος αγνοείται ενώ δίνεται προσοχή κυρίως στην αλληλεπίδραση ζεύγους ατόμων $v(r_i, r_j) = v(r_{ij})$. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ τριών ή περισσότερων ατόμων δε λαμβάνονται υπόψη. Οι μη δεσμικές van der Waals αλληλεπιδράσεις ενός ζεύγους ατόμων i, j υπολογίζονται με το δυναμικό Lennard-Jones (εξίσωση 2.11)¹¹⁹ και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το νόμο Coulomb (εξίσωση 2.12):

$$v^{LJ}(r) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.11)$$

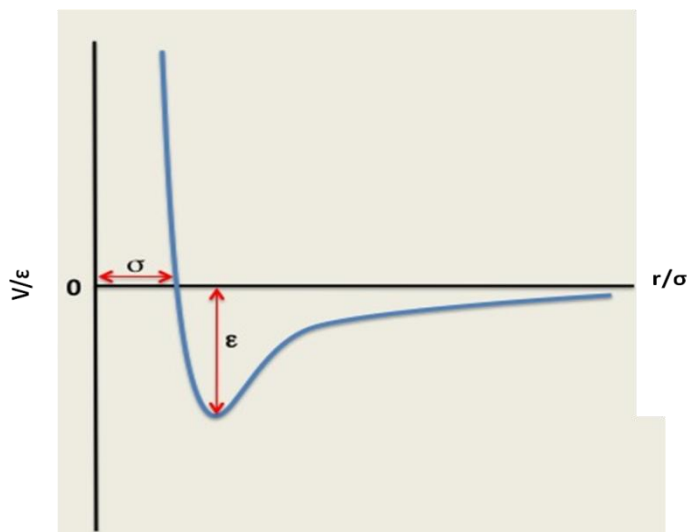
και

$$v^{Coulomb}(r) = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}} \quad (2.12)$$

Στις παραπάνω εξισώσεις, σ_{ij} είναι η απόσταση όπου το δυναμικό μεταξύ των δύο ατόμων είναι 0 και ε_{ij} είναι το βάθος του πηγαδιού (Εικόνα 2.5). Η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων εκφράζεται από τον όρο r_{ij} και στις δύο εξισώσεις. Τέλος στην εξίσωση 2.12 q_i, q_j είναι τα φορτία των ατόμων και ε_0 η διηλεκτρική σταθερά του κενού.

Στην εξίσωση 2.11 ο όρος $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12}$ εκφράζει την απώθηση κατά Pauli σε μικρές αποστάσεις και ο όρος $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6$ εκφράζει την έλξη σε μεγάλες αποστάσεις και αφορά κυρίως δυνάμεις van der Waals ή δυνάμεις διασποράς (dispersion). Οι παράμετροι σ και ε , στην εξίσωση 2.11, καθορίζονται από τις θερμοδυναμικές ιδιότητες καθαρών υγρών, ενώ οι ηλεκτροστατικές

παράμετροι (εξίσωση 2.12), ορίζονται με τη μέθοδο RESP (περιοριστικό ηλεκτροστατικό δυναμικό–restrained electrostatic potential fit model).



Εικόνα 2.5: Γραφική αναπαράσταση του δυναμικού Lennard-Jones, όπου παρουσιάζονται και οι σταθερές, σ_{ij} και ϵ_{ij} .

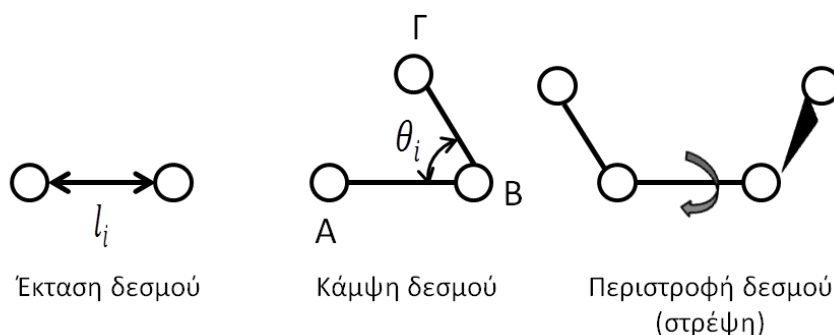
2.4.3 Δεσμικές αλληλεπιδράσεις

Ο όρος αυτός περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ατόμων που συνδέονται με χημικό δεσμό. Η απλούστερη συνάρτηση που περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις αυτές έχει τη μορφή της εξίσωσης 2.13:

$$V(r^N) = \sum_{\text{δεσμοί}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{i,0})^2 + \sum_{\text{γωνίες}} \frac{k_\theta}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{στρέψεις}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \quad (2.13)$$

$V(r^N)$ είναι συνάρτηση της θέσης r των N αλληλεπιδρώντων ατόμων. Οι όροι της εξίσωσης 2.13 παρουσιάζονται στο σχήμα 2.1. Ο πρώτος όρος της εξίσωσης 2.13 εκφράζει την αλληλεπίδραση όλων των ατόμων που συνδέονται με χημικό δεσμό: l_i είναι το μήκος του δεσμού, $l_{i,0}$ η τιμή ισορροπίας του και k_i είναι η τιμή μιας σταθεράς. Ο δεύτερος όρος είναι το άθροισμα των δεσμικών γωνιών. Ο όρος δεσμική γωνία αποδίδει τη γωνία

που σχηματίζεται μεταξύ τριών ατόμων A-B-Γ, όπου τα A και Γ σχηματίζουν χημικό δεσμό με το B και είναι και αυτός ένα αρμονικό δυναμικό. Τέλος, ο τρίτος όρος είναι ένα δυναμικό στρέψης και περιγράφει τη μεταβολή της ενέργειας καθώς ο κάθε απλός δεσμός περιστρέφεται. V_n είναι η σταθερά στρέψης, ω είναι η γωνία στρέψης που σχηματίζεται από τα άτομα, n είναι ο αριθμός των ελαχίστων σημείων που παρουσιάζονται στην περιστροφή του δεσμού κατά 360° . Τέλος η σταθερά γ είναι ο παράγοντας φάσης και ορίζει τότε η γωνία στρέψης έχει την ελάχιστη τιμή της. Για τις μονές τιμές του n ο παράγοντας γ έχει τιμή 0° και για τις ζυγές τιμές έχει τιμή 180° . Οι παράμετροι k_i , k_θ και V_n , προσδιορίζονται από πειραματικά δεδομένα ή με υπολογισμούς *ab initio*. Η προσεγγιστική αυτή τεχνική δίνει ικανοποιητικές προβλέψεις και επιτρέπει την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων σε ένα μακρομοριακό σύστημα (πχ πρωτεΐνη).



Σχήμα 2.1: Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών όρων που εμφανίζονται στην εξίσωση 2.12.

Σε όλους τους υπολογισμούς ΜΔ με το λογισμικό AMBER,¹²⁰ για την αναπαράσταση του νερού χρησιμοποιήσαμε το δυναμικό TIP3P (Transferable Intermolecular Potential 3P) όπως περιγράφεται από τους Jorgensen *et al.* (1983).^{121,122}

Κατά τη διενέργεια των υπολογισμών ΜΔ στα διάφορα σύμπλοκα ακολουθήσαμε σε γενικές γραμμές την ακόλουθη στρατηγική. Χρησιμοποιήσαμε τις κρυσταλλικές δομές των πρωτεϊνών, HIV-1 πρωτεάσης και ρενίνης, από τη βάση δεδομένων Protein Brookhaven Databank (PDB).¹²³ Οι κωδικοί για την HIV-1 πρωτεάση είναι: 1AID (Κεφάλαιο 4), 3OXC

(Κεφάλαιο 5) και 2IEN (Κεφάλαιο 7) ενώ για τη ρενίνη είναι: 2V0Z (Κεφάλαια 6 και 7). Λόγω έλλειψης κρυσταλλογραφικών δομών συμπλόκων της HIV-1 πρωτεάσης με φουλερένια, επιλέξαμε τη δομή 1AID, επειδή ο προσδέτης 1THK έχει παρόμοιο μέγεθος με το φουλερένιο.

Αρκετές εργασίες έχουν δημοσιευθεί αναφορικά με την κατάσταση (πρωτονιομένη ή όχι) των ασπαρτικών οξέων στο ενεργό κέντρο της HIV-1 πρωτεάσης και της ρενίνης.^{76,77,124-126} Είναι γενικά αποδεκτό ότι η φύση των ασπαρτικών οξέων (μονοπρωτονιομένα, διπρωτονιομένα ή όχι) παίζει σημαντικό ρόλο κατά την πρόσδεση στο ενεργό κέντρο. Στους υπολογισμούς μας θεωρήσαμε το ενεργό κέντρο μονοπρωτονιομένο στη θέση 25 για την HIV-1 πρωτεάση. Αυτό συμφωνεί με πειραματικές και θεωρητικές μελέτες.^{76,77,126} Αντίστοιχα στη ρενίνη η πρωτονίωση έγινε στο ασπαρτικό οξύ στη θέση 38. Το πεδίο δυνάμεων ff99SB¹¹⁶ χρησιμοποιήθηκε για τα ατομικά μερικά φορτία και τις παραμέτρους των πρωτεϊνών. Για τις παραμέτρους των διαφόρων προσδετών έγινε χρήση του γενικού πεδίου δυνάμεων GAFF (General AMBER Force Field)¹²⁷ και της μεθόδου AM1-BCC (Austin Model 1 with Bond Charge Correction) για τα ατομικά φορτία.¹²⁸ Το κάθε σύμπλοκο διαλύθηκε σε νερό με τη χρήση του tLeap. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στο σύστημα υπολογίστηκαν με τη μέθοδο PME (Particle Mesh Ewald).¹²⁹

Το πρώτο βήμα στη μοριακή δυναμική ήταν η ελαχιστοποίηση της ενέργειας των συστημάτων σε δύο στάδια. Στο πρώτο μισό κάθε σταδίου, έγινε χρήση της μεθόδου απότομης καταβύθισης «steepest descent» ενώ ακολούθως χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος συζυγών βαθμίδων «conjugate gradient». Το επόμενο βήμα ήταν η σταδιακή θέρμανση των συμπλόκων (σε σταθερό όγκο) από 0 K σε 300 K μέσα σε διάστημα 100 ps. Ο αλγόριθμος SHAKE¹³⁰ χρησιμοποιήθηκε για τη διατήρηση των δεσμών όπου συμμετέχουν υδρογόνα σε απόσταση ισορροπίας. Για τον έλεγχο της θερμοκρασίας έγινε χρήση του θερμοστάτη Langevin.¹³¹ Η προσομοίωση του συστήματος με μοριακή δυναμική είχε χρονική διάρκεια 20 ns και η μέση πίεση του συστήματος διατηρήθηκε στο 1 bar.

2.5 Ανάλυση ενέργειας με τη χρήση μοριακής μηχανικής PBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann surface area-MM-PBSA)

Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ($\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$) των διαφορετικών συμπλόκων υπολογίστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA.¹³² Συγκεκριμένα, υπολογίσαμε την ενέργεια αλληλεπίδρασης στην αέρια φάση με τη χρήση μοριακής μηχανικής και στην συνέχεια υπολογίσαμε την ελεύθερη ενέργεια διάλυσης με τη χρήση της μεθόδου Poisson-Boltzmann (PB). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας. Η χρήση της επιβάλλεται καθώς δεν είναι εφικτή η ακριβής περιγραφή όλων των πιθανών αλληλεπιδράσεων για ένα σύστημα αποτελούμενο από μεγάλο αριθμό ατόμων (διαλύτης, διαλυμένη ουσία, ιόντα). Γίνεται λοιπόν απαραίτητη η χρήση ενός μοντέλου συνεχούς μέσου, όπου οι διαφορετικές ιδιότητες του διαλύτη εκφράζονται ως μέσες τιμές.¹³³ Για τον ακριβέστερο υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων σε ένα σύστημα δύο ουσιών γίνεται χρήση δύο διαφορετικών διηλεκτρικών σταθερών. Μίας μεγάλης για το διαλύτη (πχ 80,0 στην περίπτωση του νερού) και μιας μικρής για τη διαλυμένη ουσία (πχ 1,0 για μια πρωτεΐνη). Επίσης, η μη-πολική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια υπολογίζεται μέσω ενός όρου επιφανείας, που μπορεί να διαχωριστεί σε ελκτικές (attractive) και απωστικές αλληλεπιδράσεις.^{134,135}

Ο διαχωρισμός της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης σε διαφορετικές συνεισφορές (π.χ. ηλεκτροστατικές, van der Waals κ.α.) συμβάλλει στην ευκολότερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων στα σύμπλοκα.^{136,137} Περιληπτικά η μέθοδος MM-PBSA εκφράζεται από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = G_{\text{σύμπλοκο}} - (G_{\text{πρωτεΐνη}} + G_{\text{προσδέτης}}) \quad (2.14)$$

Όπου $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$ είναι η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης, $G_{\text{σύμπλοκο}}$, $G_{\text{πρωτεΐνη}}$ και $G_{\text{προσδέτης}}$ είναι οι αντίστοιχες ελεύθερες ενέργειες για το σύμπλοκο, την πρωτεΐνη και τον προσδέτη. Επίσης η $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$ δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = \Delta H - T\Delta S \quad (2.15)$$

Όπου ΔH και ΔS είναι οι μεταβολές της ενθαλπίας και της εντροπίας, αντιστοίχως. Η χρήση του λογισμικού AMBER δίνει τη δυνατότητα του υπολογισμού της εντροπίας μέσω της υπορουτίνας nmode.^{136,138} Η μεταβολή της ενθαλπίας του συστήματος δίνεται από την εξίσωση:

$$\Delta H = \Delta E_{MM} + \Delta G_{sol} \quad (2.16)$$

Ο όρος ΔE_{MM} ορίζει την ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης και του προσδέτη όπως αυτή υπολογίζεται από τη μοριακή μηχανική και ΔG_{sol} είναι η ελεύθερη ενέργεια διάλυσης. Οι όροι ΔE_{MM} και ΔG_{sol} περιγράφονται από τις εξισώσεις:

$$\Delta G_{MM} = \Delta E_{elec} + \Delta E_{vdW} \quad (2.17)$$

και

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{PB} + \Delta G_{NP}, \quad (2.18)$$

όπου ΔE_{elec} και ΔE_{vdW} είναι η ηλεκτροστατική ενέργεια αλληλεπίδρασης και η van der Waals ενέργεια αλληλεπίδρασης, αντίστοιχα. ΔG_{PB} είναι η ηλεκτροστατική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια διάλυσης. Ο υπολογισμός του συγκεκριμένου όρου γίνεται με τη μέθοδο Poisson-Boltzmann. Ο όρος ΔG_{NP} αφορά τις μη-πολικές (υδροφοβικές) συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια διάλυσης. Η εξίσωση για τον υπολογισμό της ΔG_{NP} εισάγει τον όρο SASA (solvent-accessible surface area):

$$\Delta G_{NP} = \gamma SASA + \beta \quad (2.19)$$

Για την επιφανειακή τάση γ και τη σταθερά β , χρησιμοποιήσαμε τις αντίστοιχες τιμές $0,00542 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ και $0,92 \text{ kcal mol}^{-1}$.¹³⁹

Η μέθοδος MM-PBSA κάνει χρήση μιας σειράς από στιγμιότυπα της ΜΔ. Για τους υπολογισμούς μας, χρησιμοποιήθηκαν 2000 στιγμιότυπα (με χρονική απόσταση μεταξύ τους 20 ps) έτσι ώστε οι δομές να μην έχουν συσχέτιση και να επιτευχθεί μικρό στατιστικό σφάλμα. Οι τιμές της διηλεκτρικής σταθεράς για το διαλύτη και το σύμπλοκο ορίστηκαν, αντίστοιχα, σε 80,0 και 1,0.¹⁴⁰ Για τον

υπολογισμό της εντροπίας χρησιμοποιήθηκαν 200 στιγμιότυπα ώστε να περιοριστεί ο υπολογιστικός χρόνος. Η εγκυρότητα της μεθόδου αναλύθηκε πρόσφατα από τους Hou *et al.*¹⁴⁰ Η συγκεκριμένη ομάδα έλεγξε 6 διαφορετικά πρωτεϊνικά συστήματα χρησιμοποιώντας 59 προσδέτες. Σκοπός τους ήταν ο έλεγχος διαφόρων παραγόντων (όπως η χρονική διάρκεια της ΜΔ και η τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς του συμπλόκου) και η επίδρασή τους στα αποτελέσματα. Μεταξύ άλλων ανέλυσαν την επιρροή της εντροπίας στην πρόβλεψη της ενέργειας πρόσδεσης καθώς και την υπολογιστική ακρίβεια της μεθόδου MM-PBSA.

2.6 Μέθοδος θερμοδυναμικής ολοκλήρωσης (Thermodynamic integration-TI).

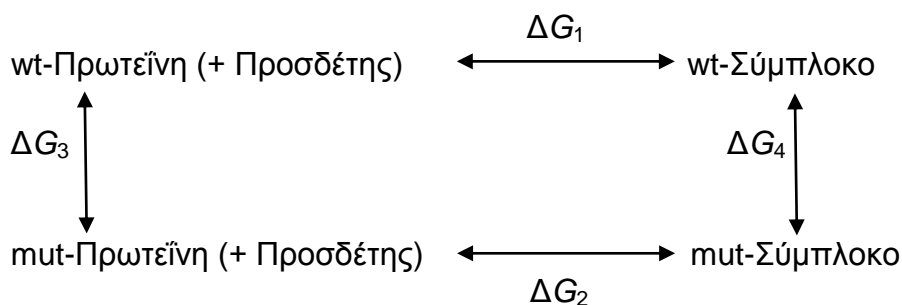
Ο υπολογισμός ΔG , μέσω μεθόδων όπως η MM-PBSA, προσφέρει πληροφορίες όσον αφορά το μηχανισμό πρόσδεσης ενός μορίου καθώς επίσης και των διαφορετικών συνεισφορών στην ενέργεια πρόσδεσης. Στην εφαρμογή της μεθόδου της θερμοδυναμικής ολοκλήρωσης (TI) σε αντίθεση με άλλες, δεν υπολογίζεται η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης μιας ουσίας. Η μέθοδος TI χρησιμοποιείται για την ανάλυση της επίδρασης δομικών τροποποιήσεων στη χημική δομή ενός μορίου. Με τη συγκεκριμένη τεχνική προσδιορίζουμε τη σχετική μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια ($\Delta\Delta G$) μεταξύ δυο δομών που διαφέρουν σε μικρό βαθμό.¹⁴¹ Η βασική αρχή της τεχνικής αυτής παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.2 μαζί με την εξίσωση 2.20.

$$\Delta\Delta G = \Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta G_4 - \Delta G_3 \quad (2.20)$$

ΔG_1 και ΔG_2 αντιπροσωπεύουν την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης των μορίων ενώ ΔG_3 και ΔG_4 αντιπροσωπεύουν τις αλλαγές από τη μια μορφή (προσδέτη ή πρωτεΐνης) στην άλλη, όπως περιγράφεται και από το Σχήμα 2.2. Η μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια ΔG υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση 2.21:

$$\Delta G = \sum_{i=1}^n W_i \left\langle \frac{\partial V}{\partial \lambda} \right\rangle_{\lambda_i} \quad (2.21)$$

Στον παραπάνω τύπο το λ εκφράζει την παράμετρο σύζευξης (coupling parameter) και V είναι το δυναμικό που σχετίζεται με την παράμετρο λ .¹⁴² Οι διαφορετικές τιμές του λ και των αντίστοιχων σχετιζομένων σταθερών (W) ορίζονται από τη δευτεροβάθμια Γκαουσιανή κατανομή.¹⁴³ Για $\lambda = 0$, το δυναμικό $V(0)$ αντιστοιχεί στην αρχική μορφή του συμπλόκου και για $\lambda = 1$, το δυναμικό $V(1)$ αντιστοιχεί στην τελική μορφή (Σχήμα 2.2). Η διαδικασία μετατροπής από την αρχική στην τελική μορφή εκφράζεται μέσα από διαφορετικές τιμές λ και W , που βρίσκονται μεταξύ του 0 και 1 (Πίνακας 2.1). Όσο περισσότερες είναι οι τιμές που χρησιμοποιούνται, τόσο αρτιότερη είναι η πρόβλεψη της μεταβολής $\Delta\Delta G$.



Σχήμα 2.2: Σχηματική αρχή της μεθόδου TI όσον αφορά σε διαφορετικές πρωτεΐνες.

Κατά τη διενέργεια των υπολογισμών TI, για κάθε τιμή λ ακολουθούμε τρία βήματα: α) αφαίρεση του φορτίου από τα άτομα που θα αλλάξουν, β) αλλαγή των ατόμων και γ) προσθήκη φορτίων στα νέα άτομα. Στην περίπτωση που υπάρχει διαφορά στον αριθμό των ατόμων μεταξύ των δύο καταστάσεων (πχ. από $-H$ σε $-OH$) τότε γίνεται χρήση μαλακών δυναμικών (soft core potentials)^{144,145} τα οποία περιγράφονται από την εξίσωση 2.22. Η ενεργοποίηση αυτής της επιλογής γίνεται κατά το δεύτερο βήμα στους υπολογισμούς.

$$V_{vdw} = 4\varepsilon(1 - \lambda) \left[\frac{1}{\left[\alpha\lambda + \left(\frac{r}{\sigma}\right)^6\right]^2} - \frac{1}{\alpha\lambda + \left(\frac{r}{\sigma}\right)^6} \right] \quad (2.22)$$

Όπου ϵ και σ είναι οι τυπικές παράμετροι του δυναμικού Lennard-Jones και r είναι η ατομική απόσταση. Ο όρος α αποτελεί μια εμπειρική σταθερά προσαρμογής για τον υπολογισμό των αλληλεπιδράσεων και η τιμή της διαφέρει από μελέτη σε μελέτη (ενδεικτικά $\alpha=0,5$). Όταν $\lambda=0$ τότε η εξίσωση εκφράζει το δυναμικό Lennard-Jones. Όταν οι τιμές για το λ πλησιάζουν το 1 τότε με τη χρήση της εξίσωσης 2.22 μπορούμε να εκφράσουμε με ομαλό τρόπο τις αλληλεπιδράσεις από τις αλλαγές των ατόμων. Στους δικούς μας υπολογισμούς χρησιμοποιήσαμε 12 διαφορετικές τιμές για το λ (Πίνακας 2.1) και για κάθε τιμή κάναμε 6 υπολογισμούς ΜΔ (3 βήματα για κάθε μια από τις διαφορετικές καταστάσεις) με χρονική διάρκεια 2 ns ο καθένας.

Πίνακας 2.1: Τιμές λ και W που χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς TI.

n	λ	1- λ	W
1	0,5	-	1,0
2	0,21132	0,78867	0,5
3	0,1127	0,88729	0,27777
	0,5		0,44444
5	0,04691	0,95308	0,11846
	0,23076	0,76923	0,23931
	0,5		0,28444
7	0,02544	0,97455	0,06474
	0,12923	0,87076	0,13985
	0,29707	0,70292	0,19091
	0,5		0,20897
	0,01592	0,98408	0,04064
9	0,08198	0,91802	0,09032
	0,19331	0,80669	0,13031
	0,33787	0,66213	0,15617
	0,5		0,16512
12	0,00922	0,99078	0,02359
	0,04794	0,95206	0,05347
	0,11503	0,88495	0,08004
	0,20634	0,79366	0,10158
	0,31608	0,68392	0,11675
	0,43738	0,56262	0,12457

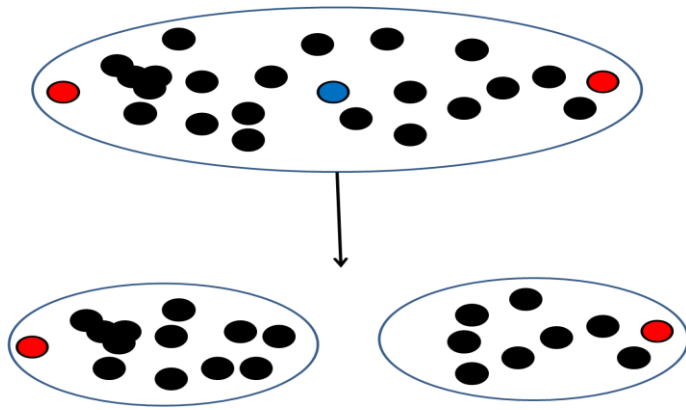
Τέλος, όσον αφορά τα αποτελέσματα των υπολογισμών με τη μέθοδο TI, οι τιμές $\Delta\Delta G$ μπορεί να είναι είτε θετικές είτε αρνητικές. Θετική τιμή στη

μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σημαίνει πως η αλλαγή στον προσδέτη ή στην πρωτεΐνη δεν επιφέρει ευνοϊκές αλλαγές στο σύστημα. Αντίθετα η αρνητικές τιμές καταδεικνύουν την ευνοϊκή επίδραση μιας αλλαγής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 4, όπου μελετάται η επίδραση της αλλαγής ενός αμινοξέος (από Gly σε Val) στην HIV-1 πρωτεάση και στην πρόσδεση του φαρμάκου της σακουιναβίρης.

2.7 Ανάλυση διαμορφώσεων-ομαδοποίηση (clustering)

Στα Κεφάλαια 5-7, εκτός από την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων στα διάφορα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, έγινε ομαδοποίηση των αντιπροσωπευτικών διαμορφώσεων των φαρμάκων σακουιναβίρης, αλισκιρένης και καναγλιφλοζίνης μέσα στα ένζυμα. Ομαδοποίηση είναι η διαίρεση ενός συνόλου αντικειμένων σε υποσύνολα (clusters) χρησιμοποιώντας ένα κριτήριο ομοιότητας (πχ θερμοκρασία, ενέργεια, rmsd). Στη ΜΔ μπορεί να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές μέθοδοι ομαδοποίησης όπως η ιεραρχική (hierarchical), μέσης σύνδεσης (average linkage), σύνδεσης (linkage) κλπ.¹⁴⁶

Η ανάλυση των διαμορφώσεων του προσδέτη, προσφέρει πληροφορίες σχετικά με το μηχανισμό πρόσδεσης. Στην παρούσα μελέτη για την ανάλυση των διαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκε η ιεραρχική μέθοδος.^{147,148} Η περιγραφή της μεθόδου παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.3. Στο πρώτο βήμα, όλες οι διαμορφώσεις τοποθετούνται σε συστάδα (cluster). Στη συνέχεια, ορίζονται τα άκρα της καθώς και το κέντρο (centroid) της ομάδας (Σχήμα 3, κόκκινο και μπλε, αντίστοιχα). Στο επόμενο βήμα, τα άκρα αντιπροσωπεύουν τα κέντρα δύο νέων ομάδων και τα υπόλοιπα σημεία τοποθετούνται στις νέες ομάδες ανάλογα με το πόσο κοντά βρίσκονται στα αντιπροσωπευτικά αυτά σημεία (κόκκινο). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να εκπληρωθούν τα κριτήρια που έχει ορίσει ο χρήστης. Στην παρούσα εργασία, κριτήριο επιλογής ήταν η διαφορά μεταξύ των διαμορφώσεων, όπως αυτή ορίζεται από το rmsd.



Σχήμα 2.3: Αναπαράσταση της ιεραρχικής μεθόδου. Με κόκκινο χρώμα ορίζονται τα άκρα του συνόλου και με μπλε το κέντρο του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (Κεφάλαιο 1), τα κλινικά και επιδημιολογικά στοιχεία για την υπέρταση και το AIDS καταδεικνύουν το εύρος του προβλήματος και τις επιπτώσεις που έχει στα συστήματα υγείας παγκοσμίως. Η αναγνώριση των πρωτεϊνών (Κεφ. 1, ενότητες 1.1 και 1.2), οι οποίες δρουν είτε μέσα στο κύτταρο (HIV-1 πρωτεάση) είτε στο οργανισμό (ρενίνη), συμβάλλει στην κατανόηση των παθήσεων και στην ανάπτυξη αναστολέων με ισχυρότερη ανασταλτική δράση. Τα αποτελέσματα των μελετών μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω αξιολόγηση και σύγκριση μεταξύ συγγενών πρωτεϊνών.

Η σημαντική τεχνολογική ανάπτυξη και η εφεύρεση διαφορετικών υπολογιστικών τεχνικών (βλ. Κεφάλαιο 2), έχει ανοίξει νέες προοπτικές στον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων αναστολέων. Στην παρούσα εργασία γίνεται μια προσπάθεια συστηματικής εκμετάλλευσης των προοπτικών αυτών για το σχεδιασμό νέων αναστολέων των ενζύμων HIV-1 πρωτεάσης και ρενίνης. Ξεκινώντας από δύο διαφορετικά ένζυμα, χρησιμοποιούνται τεχνικές, όπως η μοριακή δυναμική, για να περιγραφούν τα δομικά και λειτουργικά τους στοιχεία. Με την ανάλυση πληθώρας δεδομένων, γίνεται εφικτή η αποτύπωση δομικών γνωρισμάτων που συμβάλλουν στην ισχυρή πρόσδεση φαρμάκων στα ενεργά κέντρα των δύο ενζύμων (βλ. Κεφάλαια 5 και 6). Χρησιμοποιώντας αυτά τα δεδομένα μπορούν να αναγνωριστούν τα κοινά λειτουργικά χαρακτηριστικά των δύο πρωτεϊνών. Λογική απόρροια είναι η αναζήτηση/σχεδίαση αναστολέων που να συνδυάζουν συγκεκριμένα γνωρίσματα και να δρουν ταυτόχρονα στα δύο ένζυμα (βλ. Κεφάλαιο 7). Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η μελέτη της διασύνδεσης διαφορετικών ασθενειών και ο σχεδιασμός ή ανακάλυψη καινοτόμων μορίων με διπλή δράση. Τελικός σκοπός δηλαδή της διδακτορικής διατριβής είναι η συνεισφορά στη μείωση του φαρμακευτικού βάρους ενός ασθενή και κατά συνέπεια στην ελάττωση των παρενεργειών λόγω λήψης πολλαπλών σκευασμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

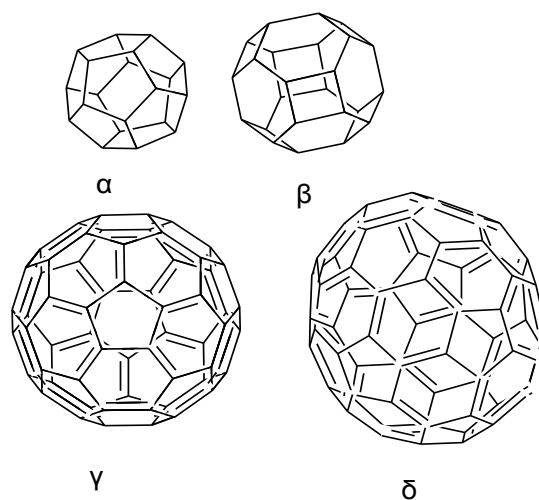
Σχεδιασμός φουλερενικών παραγώγων ως αναστολέων της HIV-1 πρωτεάσης⁸⁰

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο σχεδιασμός αναστολέων της HIV-1 πρωτεάσης με βάση τη δομή των φουλερενίων (fullerene). Ο σχεδιασμός τους βασίστηκε στη χρήση των υπολογιστικών μοντέλων 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA, ενώ η ΜΔ χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των διάφορων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αναστολέα-πρωτεάσης. Επίσης υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης των παραγώγων με τη χρήση της μεθόδου MM-PBSA και εκτιμήθηκαν οι συνεισφορές στην ενέργεια πρόσδεσης. Παράλληλα, αναλύθηκαν με τη χρήση των κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων οι διαφορετικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες τους (μεταβολισμός, απορρόφηση, τοξικότητα). Ο συνδυασμός των παραπάνω αποτελεσμάτων υπέδειξε τις ενώσεις **87** και **96** ως τους αποτελεσματικότερους αναστολείς της πρωτεάσης.

4.1 Φουλερενικά παράγωγα ως αναστολείς της HIV-1 πρωτεάσης

Ουσίες βασισμένες στη δομή του φουλερενίου, έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια ως αναστολείς σε διάφορα ένζυμα. Υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν ότι τα φουλερένια μπορούν να προσδεθούν σε πρωτεΐνες όπως οι σερινικές και κυστεϊνικές πρωτεάσες και η ακετυλοχολινεστεράση.¹⁴⁹ Ειδικότερα έχουν ελεγχθεί και για τη δράση τους στην πρωτεάση του ιού HIV-1.¹⁵⁰

Τα φουλερένια αποτελούν μια ομάδα χημικών ουσιών με ιδιαίτερες φυσικοχημικές και δομικές ιδιότητες (Εικόνα 4.1). Αποτελούνται από άτομα άνθρακα (C) τα οποία ενώνονται είτε με απλούς (Εικόνα 4.1 α, β) είτε με διπλούς δεσμούς (Εικόνα 4.1 γ, δ).¹⁵¹ Ο αριθμός των ατόμων άνθρακα που τα αποτελούν ποικίλει (N= 20, 24, 60, 70, 72, 76, 84, 100....). Τα πιο κοινά φουλερένια με συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες αποτελούνται από 60 άτομα άνθρακα. Βασικό δομικό τους χαρακτηριστικό είναι πως παρουσιάζουν εναλλαγή πενταμελών και εξαμελών δακτυλίων.¹⁵²



Εικόνα 4.1: Παραδείγματα φουλερενίων αποτελούμενα από (α) 20 C (β) 24 C (γ) 60 C (δ) 70 C

Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα όσο αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φουλερενίων. Παράδειγμα αποτελεί η πολύ χαμηλή διαλυτότητά τους σε πολικούς διαλύτες, όπως το νερό. Έτσι, για να βελτιωθεί η διαλυτότητα τους στο νερό, γίνεται προσθήκη διαφόρων πολικών ομάδων στο βασικό τους σκελετό.^{153,154} Μια επιπλέον σημαντική ιδιότητα των φουλερενίων αφορά η ύπαρξη αρωματικών δακτυλίων, αλλά και η απουσία υπέρ-αρωματικότητας (super-aromaticity).¹⁴⁹ Όσον αφορά τη διαλυτότητα ενός φουλερενίου στο νερό, ο γενικός κανόνας που χρησιμοποιείται είναι πως όσο περισσότερες υδροφιλικές ομάδες προστίθενται, τόσο περισσότερο αυξάνεται η διαλυτότητα του.¹⁵⁴ Μέχρι σήμερα έχουν παραχθεί και μελετηθεί για βιολογική δράση αρκετά φουλερενικά παράγωγα.

Στο σημείο αυτό πρέπει να επισημανθεί πως στη μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας μιας ουσίας πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένες παράμετροι όπως:

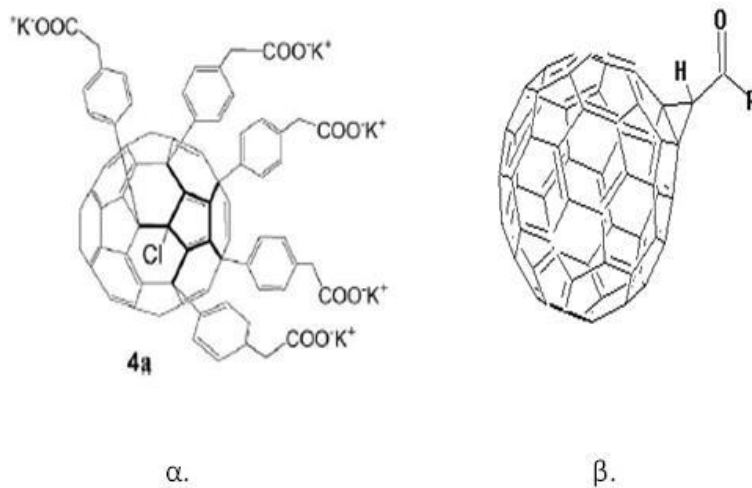
- χαμηλή τοξικότητα
- υψηλή απορρόφηση
- κατανομή μέσα στο κύτταρο ή τον οργανισμό
- μεταβολισμός

-βιοδραστικές ιδιότητες.

Κάποιες από αυτές τις παραμέτρους όπως η τοξικότητα και ο μεταβολισμός, δε μπορούν να προβλεφθούν με ακρίβεια.¹⁵⁵ Ιδιότητες όπως η απορρόφηση μιας ένωσης μπορούν να επηρεαστούν θετικά ή αρνητικά από τη λιποφιλικότητα και την υδροφιλικότητα διαφόρων ομάδων.¹⁵⁶ Βασικός στόχος στο σχεδιασμό φαρμακευτικών ουσιών είναι να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ αυτών των χαρακτηριστικών ώστε να επιτευχθεί η ισχυρότερη δυνατή βιολογική δράση. Υπάρχουν παράγοντες που μπορούν να δώσουν στοιχεία γύρω από τη φύση μιας χημικής ένωσης.¹⁵⁷ Η λιποφιλικότητα μιας ουσίας μετριέται ως συντελεστής κατανομής (partition coefficient- $\log P$) σε σύστημα διαλυτών οκτανόλης/ νερού. Οι τιμές $\log P$ που συνδέονται με την ικανοποιητική απορρόφηση μιας φαρμακευτικής ουσίας κυμαίνονται από -1 μέχρι 2 για το $\log P$.¹⁵⁸

Τα φουλερένια έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε διάφορες μελέτες^{159,160}. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση παραγώγων φουλερενίου ως αναστολέων της πρωτεάσης του ιού HIV-1.¹⁶⁰ Τα φουλερένια αποτέλεσαν αντικείμενο ευρείας μελέτης για την αναστολή της πρωτεάσης λόγω του μεγέθους τους (διάμετρος $\approx 7 \text{ \AA}$), το οποίο ταιριάζει στην κοιλότητα ($\approx 10 \text{ \AA}$) του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης σύμφωνα με αρκετές μελέτες μοριακής δυναμικής.¹²⁴

Το βασικότερο πρόβλημα που πρέπει να λυθεί ώστε ένα παράγωγο του φουλερενίου να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικά δραστική ουσία, είναι η ενίσχυση του υδροφιλικού του χαρακτήρα. Οι Troshina *et al.* (2007)¹⁶¹ συνέθεσαν την ένωση στην Εικόνα 4.2α, προσθέτοντας ένα μέταλλο (-K) για να ενισχύσουν την υδροφιλικότητα του μορίου και μελέτησαν την αντιϊκή δράση της συγκεκριμένης ουσίας. Τα πρώτα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά καθώς εκτός της ανασταλτικής δράσης του μορίου, παρατηρήθηκε επιπλέον και χαμηλή τοξικότητα. Μία άλλη προσέγγιση (Tonio *et al.* 1994)¹⁶⁰ ήταν η προσθήκη αμινοξέων ή και πεπτιδίων στο σκελετό του φουλερενίου, όπως για παράδειγμα το αμινοξύ τυροσίνη (Tyr) (Εικόνα 4.2β) και στη συνέχεια η μελέτη της αλληλεπίδρασης με το ενεργό κέντρο της πρωτεάσης.



Εικόνα 4.2: (α) Φουλερενικό παράγωγο που συντέθηκε με σκοπό την αύξηση του υδροφιλικού χαρακτήρα του σκελετού C_{60} και (β) Φουλερενικό παράγωγο με προσθήκη πεπτιδίου όπου $R = (Tyr)_n$ με $n=1-8$.

Οι Bosi *et al.*¹⁶² έλεγξαν τη σχέση μεταξύ της δομής φουλερενικών παραγώγων και της βιολογικής δράσης τους, με τη μέθοδο της ποσοτικής σχέσης δομής-δραστηριότητας (QSAR). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα φουλερενικά παράγωγα παρουσίασαν βιολογική δράση κατά των δύο τύπων του ιού HIV 1 και 2. Παρουσιάστηκαν όμως διαφορές όσον αφορά τη δραστηριότητα τους: αυτό οφείλεται στις μικρές αλλά βασικές δομικές διαφορές στις δομές των αντίστοιχων πρωτεασών.

Από τις αρχικές μελέτες της επίδρασης των φουλερενίων στην αναστολή της πρωτεάσης είναι η εργασία των Friedman *et al.*¹⁶³ στην οποία ερευνούν την έντονη βιολογική δράση διαφόρων παραγώγων του φουλερενίου. Έλεγξαν την συμβατότητα των θεωρητικών μοντέλων τους με βιολογικές μετρήσεις των εν λόγω ουσιών. Σε μια μεταγενέστερη εργασία τους, χρησιμοποίησαν υπολογιστικά προγράμματα (όπως το DOCK) για να ελέγξουν τη συμπεριφορά διαφορετικών φουλερενικών παραγώγων και την αλληλεπίδραση τους με το ενεργό κέντρο της.¹⁶⁴

Παράλληλα με της πειραματικές μελέτες, αναφέρθηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία αρκετές θεωρητικές εργασίες που σχετίζονται με τη βιολογική δράση των φουλερενίων. Μία χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραγώγων στην HIV-1 πρωτεάση, με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων πρόσδεσης και μοριακής μοντελοποίησης.¹⁶⁵ Συγκεκριμένα, γίνεται εκτεταμένη μελέτη παραγώγων όσον αφορά τη σχέση

της δομής τους με τη βιολογική τους δράση, χρησιμοποιώντας στατιστικά υπολογιστικά εργαλεία όπως η μέθοδος QSAR^{165,166}, ώστε να καταστεί δυνατή η επιλογή κατάλληλων φαρμακοφόρων ομάδων που να μπορούν να προσδώσουν στο μόριο μεγάλη βιολογική δραστικότητα. Σε μια άλλη μελέτη (Lee *et al.* 2007) χρησιμοποιείται ένα παράγωγο του φουλερενίου με τη διφαινυλική αλκοόλη και με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων μοριακής δυναμικής μελετούνται οι αλληλεπιδράσεις και η δραστικότητα του μορίου με την πρωτεΐνη.¹⁶⁷ Με τις θεωρητικές αυτές τεχνικές –μοριακή δυναμική, QSAR– γίνεται εφικτή η ανάλυση πιθανών μηχανισμών αλληλεπίδρασης καθώς και της επίδρασης διαφορετικών χημικών ομάδων στην πρόσδεση του μορίου με την πρωτεάση. Τέλος τα διάφορα υπολογιστικά μοντέλα μοριακής δυναμικής μπορούν να δώσουν μια εικόνα για τις διάφορες δομικές αλλαγές που μπορεί να προκύψουν στην πρωτεΐνη κατά την πρόσδεση.

Έχει μελετηθεί επίσης από τους Promsri *et al.* (2005) η επίδραση της γεωμετρίας και της συνεισφοράς των διαφορετικών χημικών ομάδων στην ενέργεια πρόσδεσης τους στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης. Οι Marchesan, *et al.* (2005)¹⁶⁸ μελέτησαν την επίδραση των κατιονικών παραγώγων φουλερενίου στην αναστολή της πρωτεάσης του HIV. Επίσης συγκρίνουν διάφορα παράγωγα όσον αφορά τη βιολογική δραστικότητά τους όχι μόνο κατά του ιού HIV αλλά και κατά άλλων DNA και RNA ιών. Επιπροσθέτως, οι Marcorin *et al.* (2000)¹⁶⁹ ερευνούν την επίδραση φορτισμένων ομάδων στη βιολογική δράση του φουλερενίου. Στη συγκεκριμένη μελέτη έχουν συνθέσει τις εν λόγω ουσίες, ενώ προχώρησαν σε υπολογιστικές μελέτες της βιολογικής τους δράσης, στηριζόμενοι στο γεγονός πως οι συγκεκριμένες ομάδες αυξάνουν την υδροφιλικότητα του μορίου. Η ανασταλτική δράση των φουλερενίων έχει μελετηθεί εκτενέστατα και από τους Zhu και Schuster (2003).¹²⁴ Με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων μοριακής δυναμικής, οι συγκεκριμένοι ερευνητές, ανέπτυξαν το μηχανισμό με τον οποίο αλληλεπιδρούν τα διάφορα φουλερενικά παράγωγα με την πρωτεΐνη καθώς και τις δομικές αλλαγές στο μόριο της πρωτεάσης.

4.2 Μέθοδοι

Βελτιστοποίηση γεωμετρίας και υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης. Ο αρχικός σχεδιασμός και η ελαχιστοποίηση της ενέργειας των χημικών μορίων έγιναν με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος ArgusLab.¹⁷⁰ Κατά τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας χρησιμοποιήθηκε το ενοποιημένο πεδίο δυνάμεων (United force field).¹⁷¹ Τα δύο στάδια της διαδικασίας ήταν:

(α) 1000 βήματα με την μέθοδο ελαχιστοποίησης απότομης κατάδυσης (steepest descent) και

(β) 1000 βήματα με τη μέθοδο Broyden-Fletcher-Golfarb-Shanno (BFGS),¹⁷² στην οποία γίνεται χρήση ενός προσεγγιστικού πίνακα Hessian (Hessian matrix).

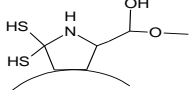
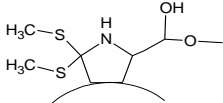
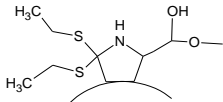
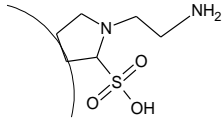
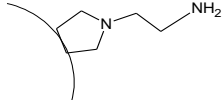
Το κριτήριο σύγκλισης της ελαχιστοποίησης της ενέργειας ορίστηκε στα 10^{-2} kcal mol⁻¹.

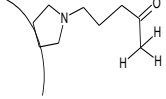
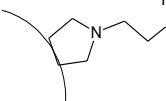
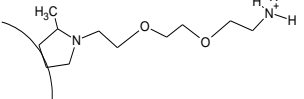
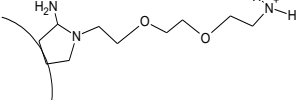
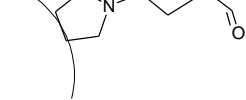

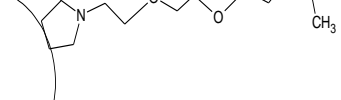
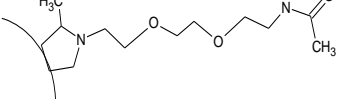
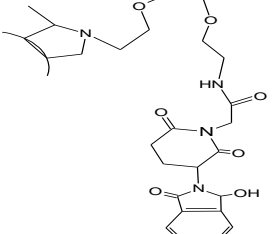
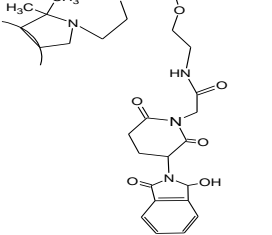
Το ενεργό κέντρο του ενζύμου ορίστηκε με την επιλογή των αμινοξέων, Asp25/25', Thr26/26' και Gly27/27' και αποτελεί το κέντρο ενός κυβικού χώρου με διαστάσεις 20 Å X 20 Å X 20 Å. Μέσα στα όρια του κυβικού αυτού κουτιού, το μόριο προσδέτης μπορούσε να κινηθεί ελεύθερα ενώ η πρωτεάση παρέμενε σταθερή.

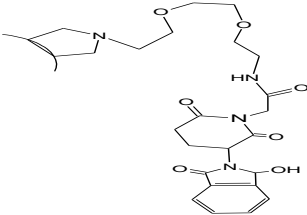
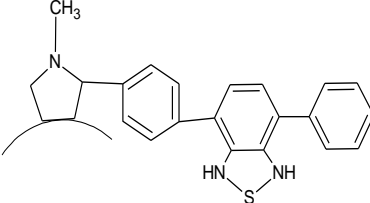
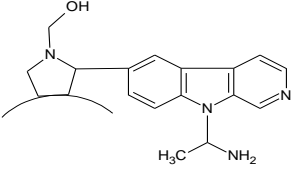
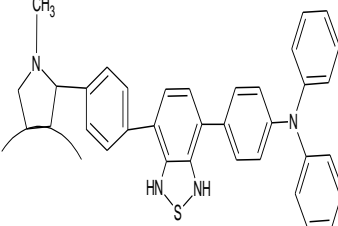
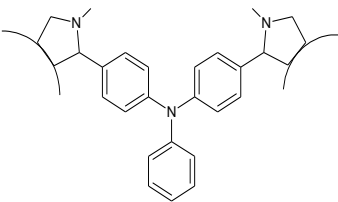
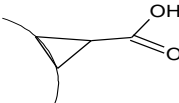
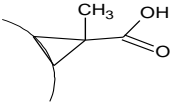
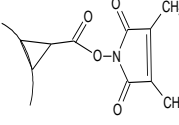
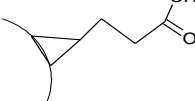
3D-QSAR μοντέλα. Για την ανάπτυξη των μοντέλων 3D-QSAR έγινε χρήση των μεθόδων CoMFA και CoMSIA (βλ. Κεφάλαιο 2). Στη δημιουργία αυτών των μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν 51 παράγωγα φουλερενίου, των οποίων υπολογίστηκε η ενέργεια πρόσδεσης (Πίνακας 4.1). Οι ενώσεις στην ομάδα «εκμάθησης» (training set) αποτελούν ένα αντιπροσωπευτικό τμήμα δομών με μεγάλο εύρος τιμών ενεργειών πρόσδεσης, οι οποίες ποικίλουν από πολύ χαμηλές έως πολύ υψηλές.¹⁰⁹ Από τις ενώσεις αυτές, οι 46 έχουν συντεθεί για διάφορους ερευνητικούς σκοπούς και οι υπόλοιπες 5 σχεδιάστηκαν ώστε να παρουσιάζουν την ευνοϊκότερη ενέργεια πρόσδεσης στο ένζυμο. Η επιλογή των υποκαταστατών στα φουλερένια περιλάμβανε αρωματικούς δακτυλίους (ένωση **18**) ή ομάδες που μπορούν να σχηματίσουν υδρογονοδεσμούς (π.χ. -NH₂ ή -OH). Οι θεωρητικές τιμές της ενέργειας πρόσδεσης μετατράπηκαν σε σταθερές πρόσδεσης (K_i) σύμφωνα με την εξίσωση $\Delta G = -RT \ln K_i$,¹⁶⁵ βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι η τιμή K_i, όταν γνωρίζουμε την τιμή K_m, είναι ίση με την τιμή IC₅₀.¹⁷³ Οι τιμές IC₅₀

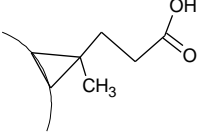
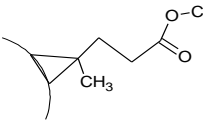
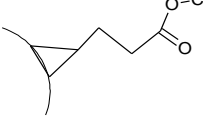
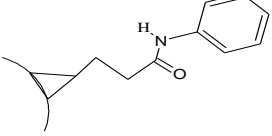
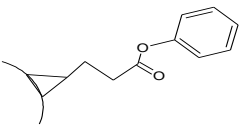
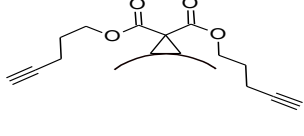
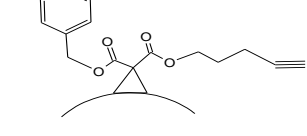
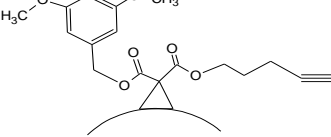
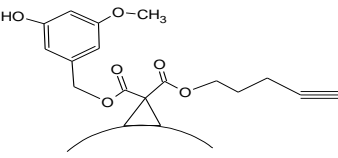
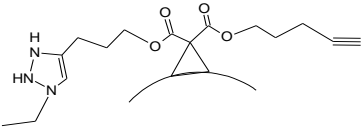
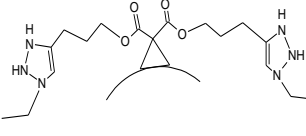
μετατράπηκαν σε rIC_{50} για την ανάπτυξη του μοντέλου. Το όριο για της στεरिकές και ηλεκτροστατικές συνεισφορές ορίστηκε σε 30 kcal mol^{-1} . Στο σημείο αυτό επαναλαμβάνεται ότι στο μοντέλο CoMFA λαμβάνονται υπόψη μόνο οι στερικές και ηλεκτροστατικές συνεισφορές ενώ στο μοντέλο CoMSIA υπολογίζονται, επιπροσθέτως, οι υδροφοβικές συνεισφορές καθώς και η δυνατότητα δημιουργίας υδρογονοδεσμών. Τα μοντέλα QSAR αναπτύχθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Tripos CoMFA/ CoMSIA του λογισμικού SYBYL 8.0.¹⁷⁴ Για την επιβεβαίωση του μοντέλου έγινε χρήση μιας ομάδας δοκιμής (test set) φουλερενικών παραγώγων, των οποίων οι ενέργειες πρόσδεσης έχουν υπολογιστεί πειραματικά.

Πίνακας 4.1: Ομάδα «εκμάθησης», η οποία χρησιμοποιήθηκε ώστε να παραχθεί το μοντέλο QSAR. Στον πίνακα αναφέρονται οι υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης, IC_{50} καθώς και προβλεπόμενες τιμές IC_{50} από τα μοντέλα CoMFA/CoMSIA, όπως υπολογίστηκαν από την τιμή rIC_{50} .

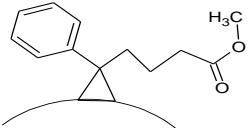
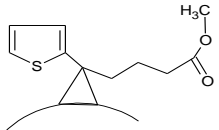
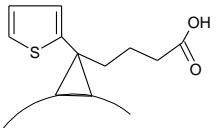
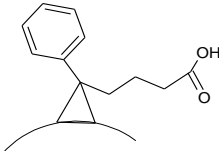
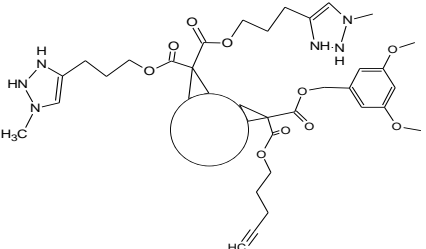
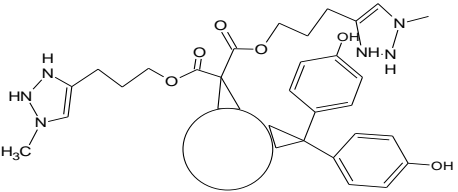
Αρ. ^α	Ένωση	Υπολογισμοί		Πρόβλεψη IC_{50} (μM)	
		Ενέργεια πρόσδεσης (kJ/mol)	IC_{50} (μM)	CoMFA	CoMSIA
1		-21.05	216.25	230.09	215.2
2		-23.20	91.33	65.61	82.1
3		-20.1	316.49	271.2	349.27
4		-18.25	664.46	440.97	616.34
5		-19.25	444.99	520.19	504.08

6^β		-19.67	376.04	295.45	342.83
7^β		-21.00	220.63	191.69	230.1
8		-23.20	91.33	83.20	92.05
9		-24.30	58.76	71.02	61.25
10		-25.35	38.57	47.15	39.97
11		-24.70	50.06	91.11	46.58
12		-33.64	1.39	1.16	1.45
13		-35.57	0.64	0.53	0.63
14		-37.20	0.33	0.60	0.19
15		-29.85	6.35	4.99	6.02

16		-35.30	0.71	1.44	1.08
17		-35.02	0.80	0.84	0.79
18 ^B		-45.21	0.01	0.02	0.02
19		-32.04	2.64	2.34	2.45
20		-34.41	1.02	0.95	0.74
21		-35.20	0.74	0.32	0.71
22		-31.00	4.00	3.03	4.22
23		-34.00	1.20	0.91	1.95
24		-30.00	5.98	7.57	4.75

25		-32.30	2.38	2.04	2.04
26		-34.35	1.05	0.84	1.29
27		-33.10	1.73	1.16	2.01
28		-34.70	0.91	1.37	0.84
29		-33.12	1.71	3.84	1.67
30		-34.20	1.11	0.64	0.92
31		-33.17	1.68	1.25	1.27
32		-28.61	10.44	16.9	10.20
33		-27.54	16.03	13.8	16.30
34		-28.82	9.59	6.59	6.17
35		-36.13	0.51	0.37	0.43

36		-32.15	2.53	3.12	2.28
37		-35.00	0.81	0.69	1.03
38		-34.40	1.02	1.27	1.67
39		-34.00	1.20	1.34	1.7
40		-36.67	0.41	0.53	0.39
41		-43.13	0.03	0.04	0.03
42		-44.98	0.01	0.02	0.01
43		-45.21	0.01	0.10	0.03
44		-46.15	0.009	0.03	0.005
45		-46.33	0.008	0.01	0.011

46		-46.03	0.009	0.008	0.01
47		-35.75	0.59	0.48	0.49
48		-44.03	0.02	0.03	0.02
49		-50.95	0.001	0.001	0.002
50 ^β		-34.50	0.98	0.9	0.81
51 ^β		-35.10	0.77	0.69	0.43
MRE				0.36	0.23

^α Ενώσεις 1-3 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁷⁵

Ενώσεις 4-5 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁷⁶

Ενώσεις 8-9 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁷⁷

Ενώσεις 10-11 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁷⁸

Ενώσεις 12-16 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁷⁹

Ενώσεις 17, 19 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁸⁰

Ένωση 20 έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁸¹

Ενώσεις 21-29 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁸²

Ενώσεις 30-44 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁸³

Ενώσεις 45-49 έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁸⁴

^β Οι ενώσεις αυτές αξιοποιούν τα δομικά χαρακτηριστικά που έχουν υπάρχουσες δομές φουλερενίων.

MRE: Mean Relative Error (Μέσο σχετικό λάθος).

Υπολογισμοί φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Toxicity, ADMET). Για την ανάλυση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των φουλερενικών παραγώγων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα QikProp (έκδοση 3.4.109) του λογισμικού Schrödinger.¹⁸⁵ Το πρόγραμμα συμβάλλει στην πρόβλεψη φαρμακευτικών ιδιοτήτων, όπως κυτταρική διαπερατότητα βασιζόμενο σε αποτελέσματα από κύτταρα καρκινώματος παχέους εντέρου (colorectal carcinoma-Caco-2)¹⁸⁶ και νεφρικά κύτταρα Madin-Darby (Madin-Darby canine kidney-MDCK).¹⁸⁷ Επίσης ελέγχθηκε η αναστολή στο δίαυλο ιόντων καλίου (K⁺) hERG (human ether-a-go-go-related gene)¹⁸⁸ και η διαπερατότητα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (central nervous system-CNS).¹⁸⁹ Σκοπός αυτού του ελέγχου ήταν η πρόβλεψη της τοξικότητας των φουλερενικών παραγώγων. Συγκεκριμένα, στο QikProp πρόγραμμα χρησιμοποιούνται τα πειραματικά αποτελέσματα από 710 χημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων 500 φαρμάκων, και συναφών ετεροκυκλικών ενώσεων. Έτσι μέσω της χρήσης του λογισμικού προβλέπονται σημαντικές φυσικές και φαρμακευτικές ιδιότητες οργανικών μορίων είτε μεμονωμένα είτε σε ομάδες. Επίσης, συγκρίνονται οι ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων με αυτές του 95% γνωστών φαρμάκων.

Ο αλγόριθμος ακολουθεί την ακόλουθη διαδικασία. Τα οργανικά μόρια υποβάλλονται σε υπολογισμούς Monte-Carlo (MC) σε διαλύτη, με τη χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS-AA (Optimised Potentials for Liquid Simulations-All Atom).¹¹⁸ Στη συνέχεια λαμβάνονται μέσες τιμές για διάφορες σταθερές όπως οι τάσεις για υδρογονοδεσμούς και τιμές SASA. Στο επόμενο βήμα συσχετίζονται οι υπολογισμένες τιμές με τις αντίστοιχες πειραματικές. Κατά την ανάλυση μιας ιδιότητας, το πρόγραμμα επιτρέπει την ανάλυση του τύπου των ατόμων και των φορτίων τους, τον όγκο και την επιφάνεια του μορίου.

4.3 Αποτελέσματα

Ανάλυση αποτελεσμάτων μοριακής πρόσδεσης. Η μέθοδος μοριακής πρόσδεσης που περιγράφηκε για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της ενέργειας πρόσδεσης των εμπορικά διαθέσιμων αναστολέων της HIV-1 πρωτεάσης (Πίνακας 4.2). Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η σύγκριση των θεωρητικών ενεργειών

πρόσδεσης (binding free energy, ΔG) με αυτές που έχουν υπολογιστεί πειραματικά. Είναι εμφανές από τα αποτελέσματα στον πίνακα πως οι υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης των φαρμάκων είναι σε ικανοποιητική συμφωνία με τις πειραματικές τιμές. Το μέσο σχετικό λάθος μεταξύ των θεωρητικών και πειραματικών τιμών είναι 0,19, τιμή που δηλώνει ικανοποιητική πρόβλεψη των πειραματικών τιμών. Στις θεωρητικές και στις πειραματικές ενέργειες πρόσδεσης ακολουθείται παρόμοια σειρά κατάταξης. Μόνη εξαίρεση αποτελεί η σειρά στα φάρμακα αμπρεναβίρη και νελφίναβιρη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η υπολογιζόμενη ενέργεια πρόσδεσης παρουσιάζει τη νελφίναβιρη ως πιο αποτελεσματικό αναστολέα της ιικής πρωτεάσης σε σχέση με την αμπρεναβίρη. Ένα σημείο που αξίζει να τονισθεί είναι ότι το υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται, εμφανίζει τις υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης των φαρμάκων μειωμένες (σε απόλυτες τιμές) σε σχέση με τις αντίστοιχες πειραματικές. Η μέση διαφορά όλων των τιμών είναι $-2,73 \text{ kcal mol}^{-1}$.

3D-QSAR CoMFA και CoMSIA αποτελέσματα. Όπως έχει ήδη σημειωθεί η ομάδα εκμάθησης από 51 φουλερενικά παράγωγα (Πίνακας 4.1), παρουσιάζει ποικιλότητα στις χημικές δομές. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων επιτεύχθηκε με τη χρήση PLS (Partial Least Square). Έγινε χρήση της μεθόδου LOO ("leave-one-out") για να επικυρωθεί η εγκυρότητα του μοντέλου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3. Τα αποτελέσματα για το μοντέλο CoMFA δίνουν τιμή διασταυρούμενου συντελεστή συσχέτισης (cross-validation) $r_{cv}^2 = 0,613$ ενώ μη διασταυρούμενη (non-cross validation) τιμή $r^2 = 0,977$. Οι αντίστοιχες τιμές για το μοντέλο CoMSIA είναι 0,763 και 0,991. Η διαφορά αυτή των δύο μοντέλων καταδεικνύει πως η μέθοδος CoMSIA οδηγεί σε επιτυχέστερες προβλέψεις όσον αφορά τη δράση των ουσιών στο ένζυμο. Οι τιμές αυτές καταδεικνύουν επίσης πως τα 3D-QSAR μοντέλα μπορούν να προβλέψουν επιτυχώς, αν κάποιο φουλερενικό παράγωγο παρουσιάζει ανασταλτική δράση κατά του ιικού ενζύμου.

Πίνακας 4.2: Σύγκριση θεωρητικών τιμών μοριακής πρόσδεσης και πειραματικών ενεργειών πρόσδεσης των εμπορικά διαθέσιμων αναστολέων της HIV-1 πρωτεάσης.

Όνομα	$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)}$	
	Θεωρητική	Πειραματική
Σακουιναβίρη	-11,37	-14,24 ^α
Αμπρεναβίρη	-9,83	-13,04 ^β
Ιντιναβίρη	-11,29	-13,24 ^γ
Νελφίναβίρη	-11,18	-12,34 ^δ
Λοπιναβίρη	-12,69	-16,13 ^ε
Ριτοναβίρη	-11,51	-14,84 ^ε
Νταρουναβίρη	-12,57	-15,59 ^{στ}
Τιπραναβίρη	-11,49	-14,36 ^ζ
MRE ^η	0,19	

α. Έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹³⁹

β. Έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁹⁰

γ. Έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁹¹

δ. Έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁹²

ε. Έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁹³

στ. Έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁹⁴

ζ. Έχει ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή ¹⁹⁵

η. Σχετικό λάθος (relative error-RE) = $|V_i - V_e| / |V_e|$

Μέσο Σχετικό λάθος (Mean Relative Error- MRE) = $1/n \sum(\text{RE})$

V_i = θεωρητική τιμή (CoMFA/CoMSIA ή τιμή λαμβανόμενη από πειράματα μοριακής πρόσδεσης).

V_e = πειραματική τιμή.

n = μέγεθος δείγματος.

Στο μοντέλο CoMFA, οι στερικές και οι ηλεκτροστατικές συνεισφορές είναι 72,9% και 27,1 %, αντίστοιχα. Στο μοντέλο CoMSIA, εκτός από στερικές και ηλεκτροστατικές συνεισφορές, λαμβάνονται υπόψη οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, η συνεισφορά των δωτών υδρογόνου και των δεκτών υδρογόνου. Αυτές υπολογίστηκαν να είναι αντίστοιχα 11,5%, 1,1%, 37,4%, 25,7% και 24,3%. Σημειώνουμε ότι:

(α) και στα δύο μοντέλα οι στερικές αλληλεπιδράσεις βρέθηκαν να είναι σημαντικά μεγαλύτερες από τις ηλεκτροστατικές (Πίνακας 4.3) και

(β) η μέθοδος CoMSIA καταδεικνύει τις υδροφοβικές συνεισφορές ως τις σημαντικότερες κατά την πρόσδεση των φουλερενίων στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐσης.

Αυτό το αποτέλεσμα βρίσκεται σε συμφωνία με τα πειράματα που δείχνουν ότι το φουλερένιο είναι κυρίως υδροφοβικό μόριο.¹⁶⁸

Πίνακας 4.3: Περίληψη των στατιστικών αποτελεσμάτων για τα μοντέλα CoMFA και CoMSIA.

	CoMFA	CoMSIA
$r_{cv}^{2,\alpha}$	0.613	0.763
$r_{ncv}^{2,\alpha}$	0.977	0.991
Αρ. κύριων συνιστωσών	5	6
SEE ^β	0.154	0.137
F_{test}^{γ}	128.614	278.614
Συνεισφορές		
Στερικές	0.729	0.115
Ηλεκτροστατικές	0.271	0.011
Υδροφοβικές	N/A	0.374
Δέκτες	N/A	0.257
Δότες	N/A	0.243

α. $r_{cv}^{2,\alpha}$ και $r_{ncv}^{2,\alpha}$ είναι οι τιμές διασταυρομένου συντελεστή συσχέτισης (cross-validated –cv-) και μη διασταυρομένου (non-cross validated –ncv-) αντίστοιχα.

β. SEE= Σταθερό σφάλμα εκτίμησης (Standard Error of Estimate).

γ. F_{test} = αναλογία εξηγήσιμων προς μη-εξηγήσιμων αποτελεσμάτων.

Η δυνατότητα των μοντέλων QSAR να προβλέπουν τις ενέργειες πρόσδεσης ενός φουλερενικού παραγώγου, ελέγχθηκε με τη χρήση μιας ομάδας δοκιμής (Πίνακας 4.4).^{164,196,197} Οι τιμές της ενέργειας πρόσδεσης όπως προβλέπονται από τα μοντέλα, παρουσιάζουν ικανοποιητική συσχέτιση

με τις πειραματικές τιμές. Είναι χαρακτηριστικό ότι το μοντέλο CoMSIA εμφανίζει ικανοποιητικότερη ικανότητα πρόβλεψης σε σχέση με το μοντέλο CoMFA. Επίσης σε σύγκριση με ένα προηγούμενο μοντέλο QSAR για φουλερενικά παράγωγα,¹⁶⁵ το μοντέλο που αναπτύχθηκε στη διδακτορική διατριβή παρουσιάζει βελτιωμένη συμπεριφορά όπως προσδιορίζεται από την επικυρωμένη τιμή μέσω διασταύρωσης $r^2=0,763$ σε σχέση με $r^2=0,670$ που δημοσιεύθηκε από τον καθηγητή S. Durdagi και τους συνεργάτες του.

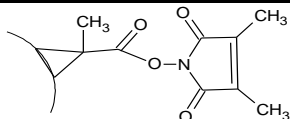
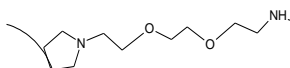
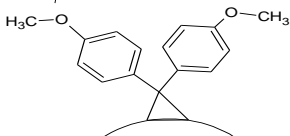
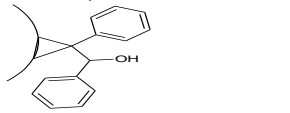
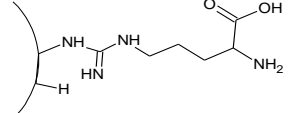
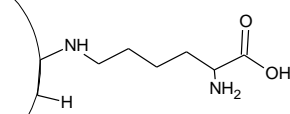
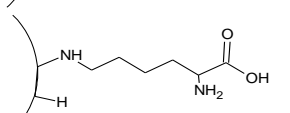
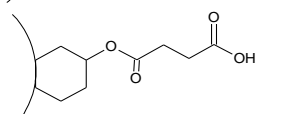
Οι διαφορετικές συνεισφορές, όπως υπολογίζονται από το μοντέλο CoMSIA παρουσιάζονται στους χάρτες ισούψων καμπύλων για την ένωση **18** (Πίνακας 4.1, Εικόνα 4.3 αριστερά) και για την ένωση **4** (Πίνακας 4.1, Εικόνα 4.3, δεξιά).

Για την ένωση **18**, η περιοχή στο σημείο επαφής με το φουλερενικό σκελετό παρουσιάζει μη ευνοϊκές (κίτρινο) στερικές αλληλεπιδράσεις, ενώ η περιοχή που βρίσκεται κοντά στους αρωματικούς δακτυλίους του υποκαταστάτη, ευνοεί (πράσινο) τις στερικές αλληλεπιδράσεις. Η αμινοομάδα ($-NH_2$) στον υποκαταστάτη ευνοεί (μπλε) τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 4.3β), παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζεται και για το $-N$ στο δακτύλιο Β. Όσον αφορά τις υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (Εικόνα 4.3γ) εμφανίζονται να ευνοούνται (κίτρινο) σημαντικά από το μεγαλύτερο τμήμα της ένωσης **18**. Οι υδρόξυ- ($-OH$) και αμινο- ($-NH_2$) ομάδες προσδίδουν τη δυνατότητα δημιουργίας υδρογονοδεσμών (Εικόνα 4.3δ-γαλάζιο) μέσω των αντίστοιχων υδρογόνων. Τέλος τα τμήματα των αρωματικών δακτυλίων Α και Β συμπεριφέρονται ως δότες για δεσμούς υδρογόνου, ενώ ο αρωματικός δακτύλιος Α έχει επίσης συμπεριφορά δέκτη ηλεκτρονίων (Εικόνα 4.3δ).

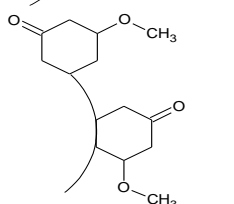
Η ένωση **4** παρουσιάζει μια από τις μικρότερες ενέργειες πρόσδεσης. Οι στερικές περιοχές με θετική συνεισφορά είναι κοντά στον δακτύλιο με το άζωτο και η στερική περιοχή με αρνητική συνεισφορά είναι κοντά στο φουλερενικό σκελετό και την ομάδα $-SO_2$ αντιστοίχως. Στην εικόνα 4.3β δεξιά με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η περιοχή που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Το γεγονός πως βρίσκεται μακριά από το βασικό κορμό της ένωσης **4**, εξηγεί την μειωμένη δραστηριότητα της ένωσης. Αντίστοιχα στις εικόνες 4.3δ και 4.3ε (δεξιά) παρουσιάζονται οι συνεισφορές για τις ομάδες

που μπορούν να δράσουν είτε ως δότες υδρογόνων είτε ως δέκτες. Οι θετικές συνεισφορές παρουσιάζονται με το μώβ χρώμα και προέρχονται από ομάδες όπως η αμινομάδα ($-NH_2$), ενώ η ομάδα $-SO_2$ δεν έχει αντίστοιχη θετική συνεισφορά.

Πίνακας 4.4: Ενώσεις δοκιμής για τον έλεγχο των μοντέλων QSAR: σύγκριση πειραματικών (ενώσεις **55-74**) και υπολογισμένων (ενώσεις **52-54**) ενεργειών πρόσδεσης, μέσω μοριακής πρόσδεσης, με τις αντίστοιχες προβλέψεις των μοντέλων CoMFA/CoMSIA.

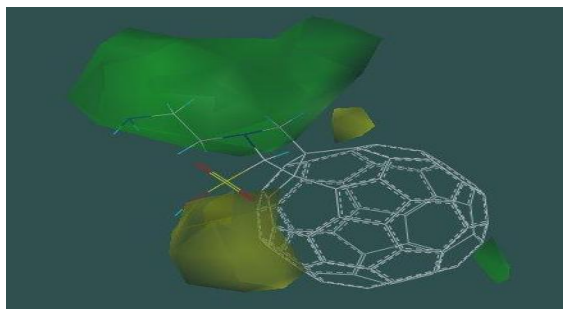
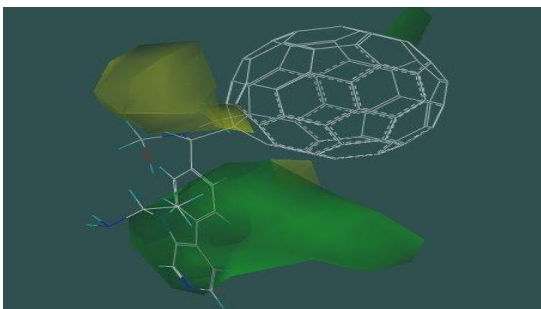
Ενώσεις	Ενέργεια πρόσδεσης (kcal/mol)	Πρόβλεψη Ενέργειας Πρόσδεσης (kcal/mol)	
		CoMFA	CoMSIA
	-8.27	-8.44	-8.35
	-6.38	-5.91	-6.11
	-5.51	-5.58	-5.56
	-9.61 ^a	-8.83	-9.06
	-4.99	-4.67	-5.08
	-5.66	-6.51	-5.83
	-7.26	-7.02	-7.06
	-9.38	-8.59	-8.63

60		-7.05	-6.88	-6.88
61		-8.65	-9.23	-9.14
62		-3.96	-3.48	-3.87
63		-5.28	-4.86	-4.97
64		-7.69	-7.98	-8.07
65		-8.29	-7.96	-7.96
66		-7.05	-7.90	-7.70
67		-7.76	-7.35	-7.44
68		-7.14	-6.52	-6.83
69		-7.60	-7.00	-7.02
70		-6.40	-5.89	-6.56
71		-5.31	-6.28	-5.79

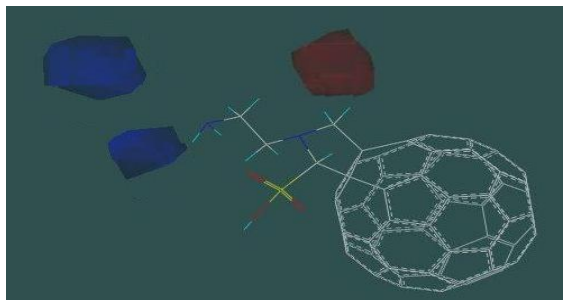
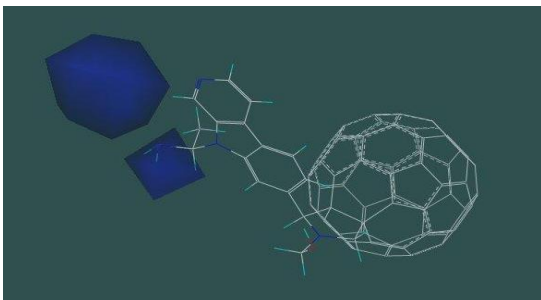
72		-6.52	-6.26	-6.90
73		-5.68	-5.93	-5.89
74		-7.03	-8.17	-7.49

^a. Πειραματικές τιμές ενέργειας πρόσδεσης (ενώσεις 55-74, που έχουν ληφθεί από τη βιβλιογραφική παραπομπή^{164,165,196,197}).

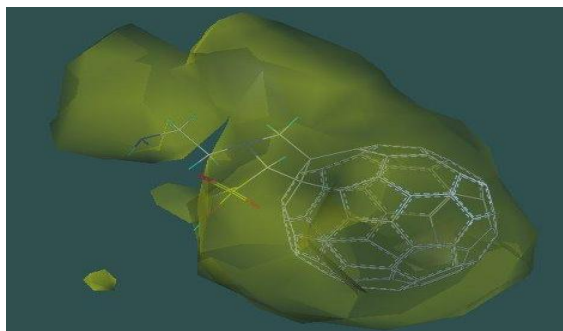
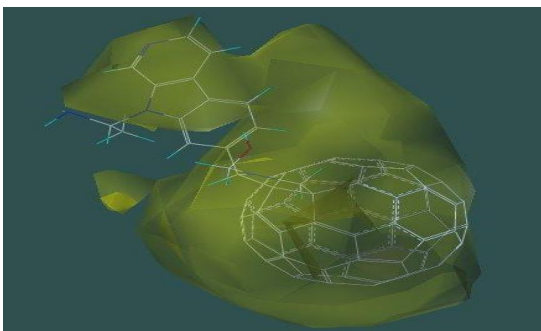
α.



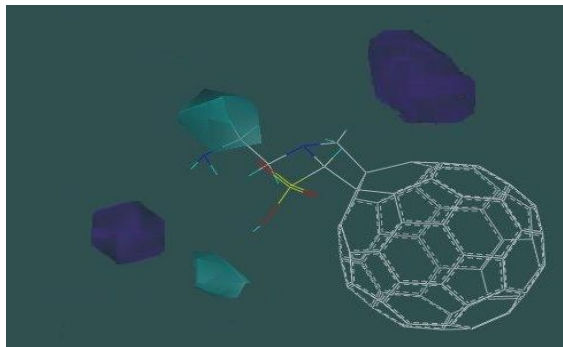
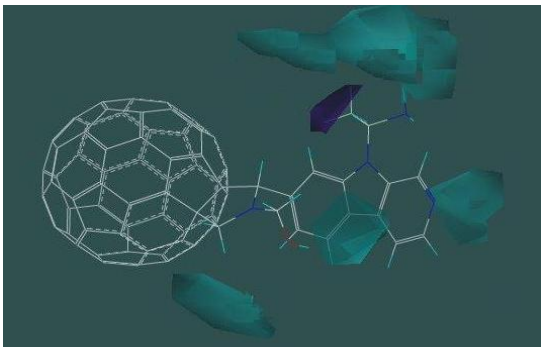
β.



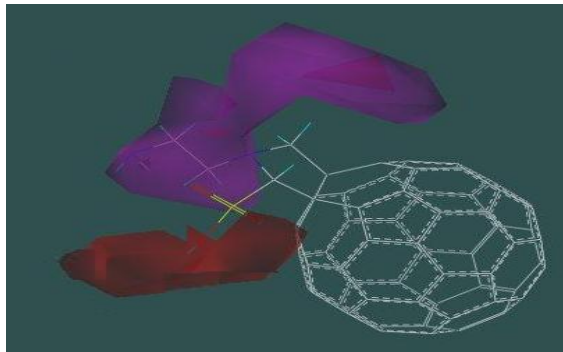
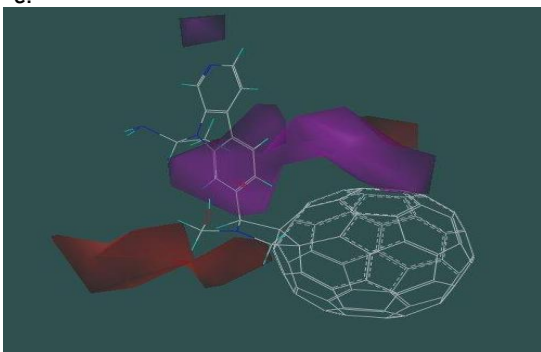
γ.



δ.



ε.



Εικόνα 4.3: Χάρτες ισοϋψών καμπύλων που προέκυψαν από τη χρήση του CoMSIA 3D-QSAR για: ένωση **18** (αριστερά) και ένωση **4** (δεξιά):

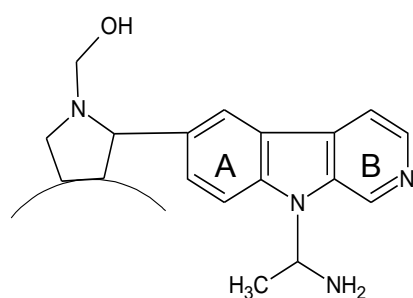
α. πράσινο (κίτρινο) χρώμα δείχνει τις στεरिकές περιοχές με θετική (αρνητική) συνεισφορά.

β. ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με μπλε (κόκκινο) όπου οι ηλεκτραρνητικές ομάδες αυξάνουν (μειώνουν) τη δράση του μορίου προσδέτη.

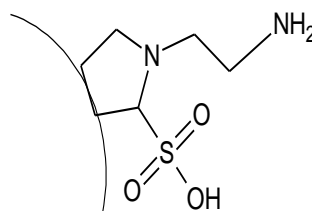
γ. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις σε κίτρινο (άσπρο) παρουσιάζουν την περιοχή όπου ομάδες αυξάνουν (μειώνουν) την αναστολική δράση.

δ. Ομάδες-δότες υδρογόνων σε γαλάζιο (σκούρο μπλε) οι περιοχές με θετική (αρνητική) συνεισφορά.

ε. Ομάδες-δέκτες υδρογόνων σε μωβ (κόκκινο) χρώμα οι περιοχές με θετική (αρνητική) συνεισφορά.



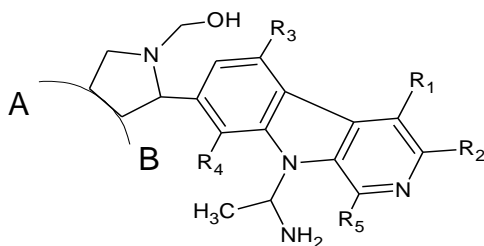
Ένωση 18

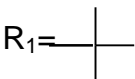
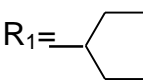
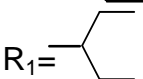
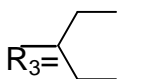
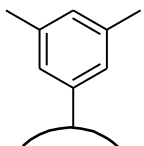
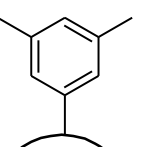
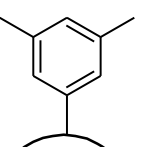
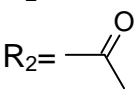


Ένωση 4

Πρώτη στρατηγική για το σχεδιασμό αναστολέων της HIV-1 PR. Τα αποτελέσματα του μοντέλου CoMSIA οδήγησαν στο σχεδιασμό νέων φουλερενικών παραγώγων με βάση την ένωση **18** (Πίνακας 4.5). Η προσθήκη στερικών ομάδων όπως: τριτοταγές βουτύλιο (**74**), πεντάνιο (**75**) και 1,3-διμέθυλο βενζόλιο (**77**) οδηγεί σε αύξηση της απόλυτης ενέργειας πρόσδεσης, όπως επιβεβαιώνουν οι τιμές -13,32, -14,02 και -13,45 kcal mol⁻¹ αντιστοίχως. Με την προσθήκη μιας δεύτερης στερικής ομάδας (Πίνακας 4.5, ενώσεις **76** και **78**), η ενέργεια πρόσδεσης ελαττώνεται σε σχέση με το μονο-υποκατεστημένο φουλερενικό παράγωγο (-13,25 και -12,03 kcal mol⁻¹). Η ελάττωση μπορεί να οφείλεται στο μέγεθος του φουλερενίου και συνεπώς στα στερικά εμπόδια μέσα στην κοιλότητα πρόσδεσης. Αντίθετα προσθήκη ηλεκτραρνητικών ομάδων όπως το καρβοξύλιο (-COOH) (Πίνακας 4.5, ένωση **79**) επίσης οδηγεί σε αύξηση της ενέργειας πρόσδεσης (-14,08 kcal mol⁻¹). Όμως αντικατάσταση με καρβονύλιο (-COCH₃, ένωση **80**) δε συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση της ενέργειας πρόσδεσης (-12,68 kcal mol⁻¹).

Πίνακας 4.5: Υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης των παραγώγων με βάση την ένωση **18** και τα αποτελέσματα CoMSIA.

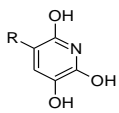


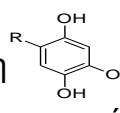
Ένωση	Υποκαταστάτες	Υπολογισμένη ενέργεια πρόσδεσης (kcal mol ⁻¹)
18	R ₁ = R ₂ = R ₃ = R ₄ =R ₅ = -H	-10.82
74	R ₁ = 	-13.32
75	R ₁ = 	-14.02
76	R ₁ =  R ₃ = 	-13.25
77	R ₃ = 	-13.45
78	R ₁ =  R ₃ = 	-12.03
79	R ₂ = -COOH	-14.08
80	R ₂ = 	-12.68

Δεύτερη στρατηγική για το σχεδιασμό αναστολέων της HIV-1 PR. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν εδώ είναι: (α) Επιλογή μιας ένωσης που έχει ικανοποιητική ενέργεια πρόσδεσης στην πρωτεάση. Για το σκοπό αυτό επιλέξαμε το αντιικό φάρμακο σακουιναβίρη (Πίνακας 4.2).

(β) Επιλογή τμημάτων της σακουιναβίρης, τα οποία με τις κατάλληλες αλλαγές θα προσαρτηθούν στο φουλερενικό σκελετό. Η επιλογή των τμημάτων φαίνεται στην εικόνα 4.4.

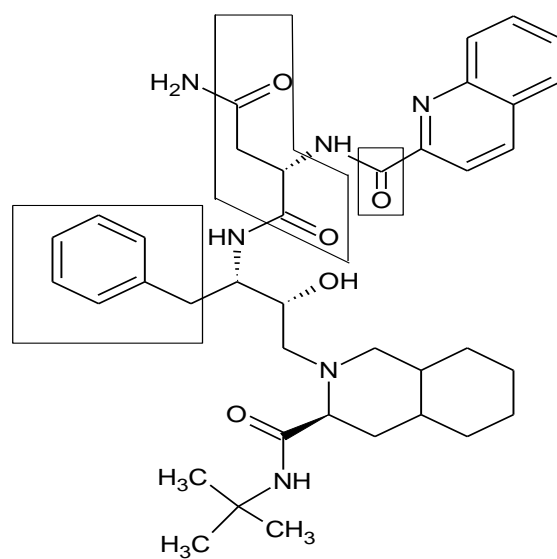
Τα αποτελέσματα για τα νέα φουλερενικά παράγωγα φαίνονται στον Πίνακα 4.6. Οι ενώσεις **84-87** καταδεικνύουν την επίδραση, στην ενέργεια πρόσδεσης, της υποκατάστασης ενός έως τεσσάρων –H του αρωματικού δακτυλίου από υδροξύλια (-OH). Μάλιστα, η μέγιστη συνεισφορά παρατηρείται στην ένωση **87** όπου έχουν αντικατασταθεί και τα 4 υδρογόνα. Αύξηση της ενέργειας πρόσδεσης επιτυγχάνεται με αντικατάσταση της ομάδας –C₆H₅ με την –C₆H₄N (ενώσεις **81** και **83**). Η σύγκριση των ενώσεων

82 και **86** καταδεικνύει ότι η ομάδα  έχει μεγαλύτερη επίδραση στην

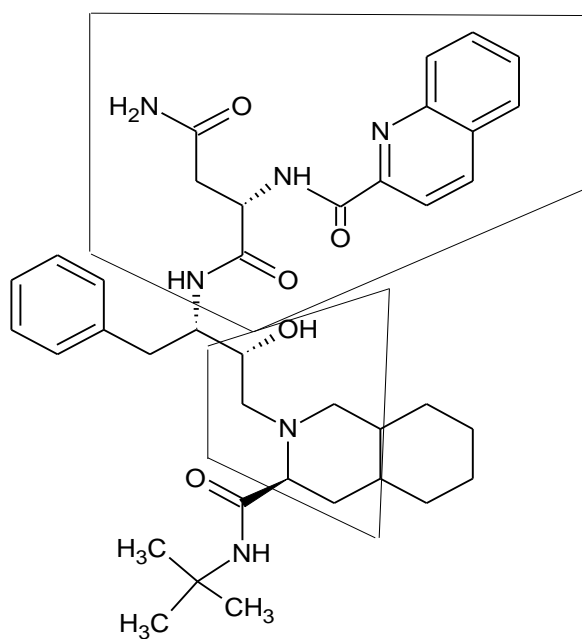
ενέργεια πρόσδεσης από την αντίστοιχη . Αντιθέτως οι ενώσεις **83/84** και **88/89** παρουσιάζουν μικρή μείωση της ενέργειας πρόσδεσης, λόγω της αντικατάστασης ενός –H από ένα υδροξύλιο. Η υποκατάσταση τριών –H από –OH (ένωση **92**) ή από –NH₂ (ένωση **93**) οδηγεί σε αύξηση της ενέργειας πρόσδεσης. Σημειώνουμε ότι για το σχεδιασμό των ενώσεων **95** και **96**, έγινε χρήση τμημάτων της σακουιναβίρης τα οποία έχουν πεπτιδικά χαρακτηριστικά. Η παρουσία του αμιδικού δεσμού αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου και συνεπώς μπορεί να εξηγήσει την αύξηση της ενέργειας πρόσδεσης των συγκεκριμένων ουσιών.

Οι ενώσεις **86**, **87**, **94**, **95** και **96** εμφανίζονται ως οι πιθανότερα ισχυρότεροι αναστολείς του ενζύμου και όπως αναφέρθηκε οι δύο τελευταίες περιλαμβάνουν αμιδικούς δεσμούς. Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι ο ισχυρότερος, ως σήμερα, φουλερενικός συνθετικός αναστολέας της πρωτεάσης παρουσιάζει δράση της τάξεως των 36 nM.¹⁶⁶ Οι ουσίες που σχεδιάστηκαν (Πίνακες 4.5 και 4.6) εμφανίζουν ανασταλτική δράση της τάξεως των pM. Για παράδειγμα η ένωση **87** έχει IC₅₀= 28,3 pM τιμή μικρότερη και από αυτή της λοπιναβίρης. Στον Πίνακα 4.2 οι υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης μέσω μοριακής πρόσδεσης, για τα προτεινόμενα παράγωγα είναι μικρότερες κατά 2,73 kcal mol⁻¹.

(α)

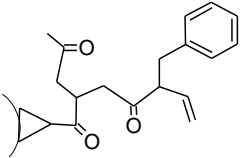
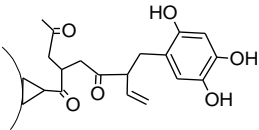
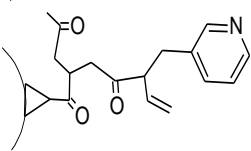
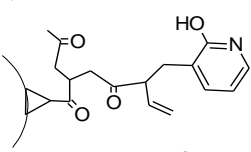
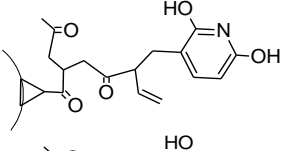
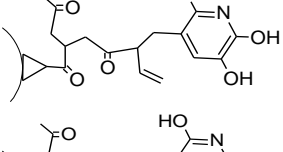
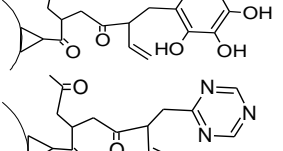
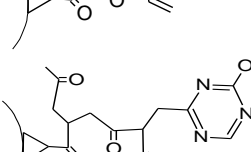
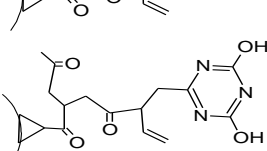
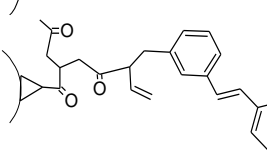



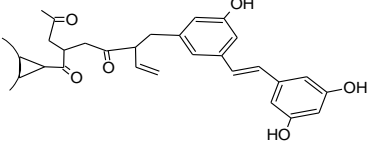
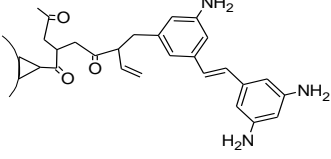
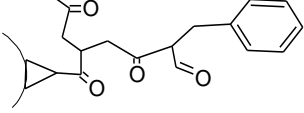
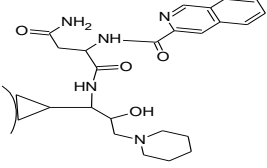
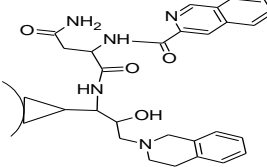
(β)



Εικόνα 4.4: Τμήματα της σακουιναβίρης (σε πλαίσιο) που χρησιμοποιήθηκαν για το σχεδιασμό φουλερενικών παραγώγων του Πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6: Προτεινόμενες δομές και υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης.

Αρ.	Ένωση	Υπολογισμένη ενέργεια πρόσδεσης (kcal mol ⁻¹)
81		-13.44
82		-14.34
83		-14.30
84		-14.05
85		-14.33
86		-15.03
87		-15.93
88		-14.48
89		-14.10
90		-14.57
91		-13.46

92		-14.35
93		-14.40
94		-14.23
95		-15.83
96		-16.03

Ανάλυση δεσμών υδρογόνου. Η ανάλυση των δεσμών υδρογόνου, που εμφανίζονται στα σύμπλοκα φουλερενίου-HIV-1 PR, καταδεικνύουν τις ομοιότητες και διαφορές τους στον τρόπο πρόσδεσης. Μία βασική παρατήρηση είναι ότι τα φουλερενικά παράγωγα αλληλεπιδρούν κυρίως με τα ακόλουθα αμινοξέα της πρωτεάσης: τα ασπαρτικά οξέα στις θέσεις 29/29', 30/30' και τις γλυκίνες στις θέσεις 48/48' (Πίνακας 4.7). Όλες οι βασικές αλληλεπιδράσεις αναφέρονται σε αμιδικά υδρογόνα (N-H) του σκελετού της πρωτεάσης και σε οξυγόνα των παραγώγων (OH, C-O-C ή C=O). Τα αποτελέσματα στον Πίνακα 4.7 καταγράφονται ως επί τοις εκατό (%) ποσοστό διατήρησης του υδρογονοδεσμού στο χρόνο προσομοίωσης. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση μεταξύ Asp29 και της ένωσης **52** εμφανίζεται στο 61% του ολικού χρόνου προσομοίωσης, ενώ ο δεσμός ανάμεσα στην ένωση **87** και στο Asp29' εμφανίζεται σχεδόν καθ' όλη την προσομοίωση (91%). Επίσης είναι σημαντικό να παρατηρηθεί ότι τα φουλερενικά παράγωγα τείνουν να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα μόνο στη μία από τις δύο αλυσίδες της πρωτεάσης. Στην ένωση **52** εμφανίζεται μια σημαντική αλληλεπίδραση με την περιοχή των πτερυγίων του ενζύμου κατά τα πρώτα 5 ns, μεταξύ του καρβονυλικού -O της ένωσης και της Gly48 (Πίνακας 4.7).

Είναι ενδιαφέρουσα η σχέση των δύο καρβονυλικών –Ο στην πλευρική αλυσίδα του φουλερενίου της ένωσης **54**. Στο πρώτο μισό της προσομοίωσης, η αλληλεπίδραση εμφανίζεται μεταξύ των Asp29 και Asp30 με το O1 και το O2, ενώ κατά τα τελευταία 5 ns η σχέση αυτή αντιστρέφεται (O1 με Asp30 και O2 με Asp29) (Εικόνα 4.5α και β). Η ένωση **87** εμφανίζει τους περισσότερους υδρογονοδεσμούς (Πίνακας 4.7, Εικόνα 4.6). Ο υδρογονοδεσμός του (O7) με το ένα πτερύγιο του ενζύμου (Gly48') και ένας ακόμα μεταξύ του (O4) με το αμινοξύ Asp29' είναι οι βασικές αλληλεπιδράσεις που προσδίδουν στην ένωση **87** ισχυρή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης.

Η ανάλυση του συμπλόκου με την ένωση **96** δείχνει την ύπαρξη μόνο δυο δεσμών υδρογόνου με την πρωτεάση. Η ένωση έχει παρόμοια χαρακτηριστικά με τις υπόλοιπες ενώσεις που μελετήσαμε. Συγκεκριμένα, δημιουργεί ένα δεσμό με τη Gly48' στα πτερύγια της πρωτεάσης (26% επί του συνολικού χρόνου της προσομοίωσης) και ένα λιγότερο συχνό (10%) δεσμό με το Asp25' στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης. Από όλα τα παράγωγα, η ένωση **96** ήταν η μόνη που αλληλεπιδρά με αμινοξέα στο ενεργό κέντρο. Είναι εμφανές, ότι ακόμα και αν τα παράγωγα δεν παρουσιάζουν κοινές αλληλεπιδράσεις, όλα σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με ένα ή περισσότερα αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο (θέσεις 29, 30, 29' και 30') καθώς και με αμινοξέα στα πτερύγια της πρωτεΐνης (θέσεις 48 και 48').

Πίνακας 4.7: Παρουσία (%) δεσμών υδρογόνου μεταξύ των φουλερενικών παραγώγων και της HIV-1 PR όπως υπολογίζονται από τη ΜΔ.

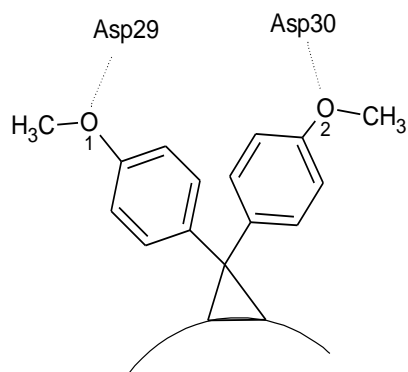
Ενώσεις ^α	Αμινοξέα ^β				
	52	53	54	87	96
Asp29	60,57	N/A ^γ	75,31	N/A	N/A
Asp30	22,14	N/A	12,78	N/A	N/A
Asp29'	N/A	78,42	N/A	93,51	N/A
Asp30'	N/A	39,97	N/A	47,71	N/A
Gly48	45,03	N/A	N/A	13,85	25,70
Gly48'	N/A	N/A	N/A	60,24	N/A
Asp25'	N/A	N/A	N/A	N/A	10,00
Υπολογισμένη ενέργεια (kcal mol ⁻¹)	-8,28	-6,38	-5,52	-15,93	-16,03

α. Ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για ΜΔ (Πίνακες 4.5 και 4.6).

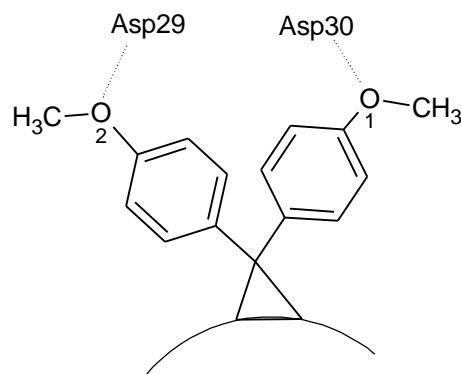
β. Αμιδομάδα (-NH) από τα αμινοξέα της πρωτεΐνης που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα παράγωγα.

γ. N/A: Υδρογονοδεσμοί με παρουσία μικρότερη του 10% δεν παρουσιάζονται.

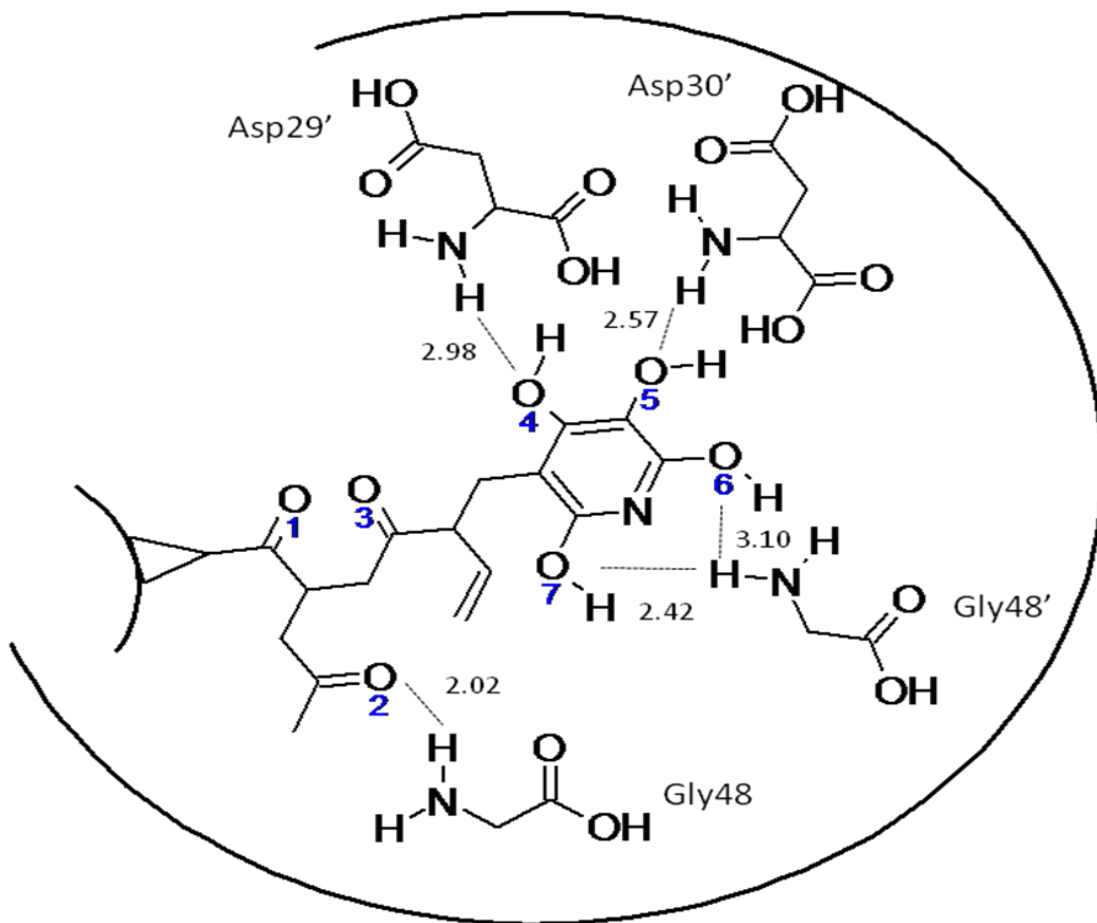
α.



β.



Εικόνα 4.5: Δομή του φουλερενικού παραγώγου **54** και των ατόμων που συμβάλλουν στους δεσμούς υδρογόνου με την πρωτεάση. α) στα πρώτα 5 ns και β) στα τελευταία 5 ns.

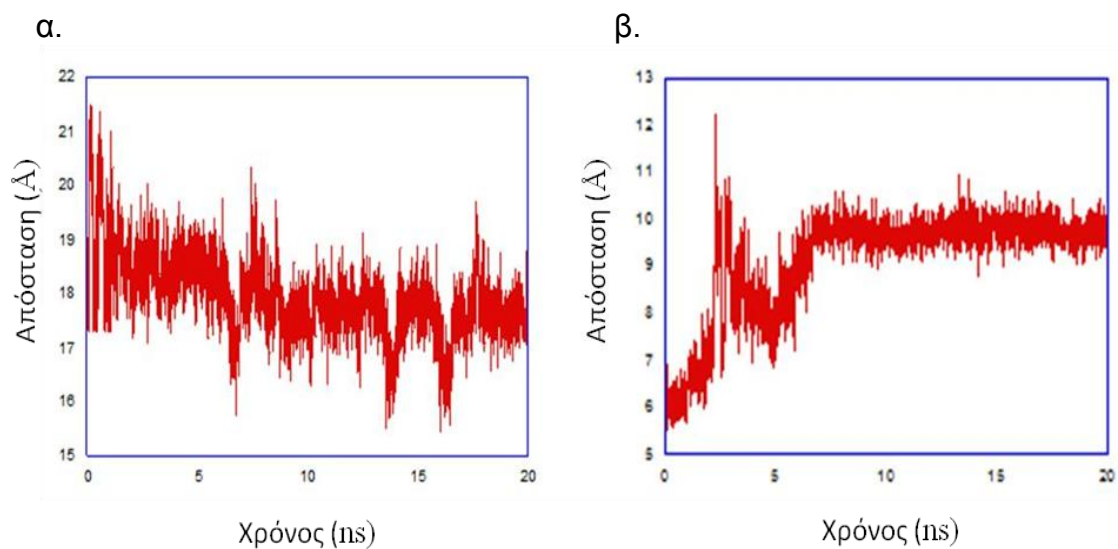


Εικόνα 4.6: Σχηματική παρουσίαση των υδρογονοδεσμών της ένωσης **87** και των αμινοξέων της πρωτεΐνης.

Ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών (αποστάσεων) στο ενεργό κέντρο και τα πτερύγια του ενζύμου. Στη συνέχεια αναλύσαμε τις αποστάσεις μεταξύ των ατόμων α-άνθρακα (C_α) του Asp25 στο ενεργό κέντρο και του αμινοξέους Ile50 στα πτερύγια της πρωτεάσης (Εικόνα 4.7α), καθώς και μεταξύ των αμινοξέων Ile50 και Ile50' (Εικόνα 4.7β). Η ανάλυση επικεντρώθηκε στο σύμπλοκο με την ένωση **87**, η οποία παρουσιάζει την υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης. Η απόσταση μεταξύ Asp25 και Ile50 εμφανίζεται μεγαλύτερη στα πρώτα νανοδευτερόλεπτα (Εικόνα 4.7α) και στη συνέχεια μειώνεται και σταθεροποιείται στα 17.5 Å περίπου. Υπάρχουν πειραματικές και θεωρητικές μελέτες που καταδεικνύουν αυτή τη μετακίνηση των πτερυγίων προς το ενεργό κέντρο, όπως φαίνεται και εδώ. Αυτό το γεγονός αποτελεί χαρακτηριστική συμπεριφορά της πρωτεάσης κατά την πρόσδεση ενός μορίου.^{67,68} Στα χρονικά σημεία 7 ns, 13 ns και 17 ns η απόσταση παρουσιάζει τη χαμηλότερη τιμή της ($\approx 15,5$ Å). Η μικρή διακύμανση της απόστασης μεταξύ των πτερυγίων μετά τα πρώτα 10 ns μπορεί να εξηγηθεί από την ύπαρξη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων Gly51 και Gly51' (παρουσία 65%) που εμφανίζεται περίπου στα 7,5 ns και μέχρι το τέλος της προσομοίωσης. Στην εικόνα 4.7β φαίνεται η αλλαγή στην απόσταση των δύο ισολευκίνων (Ile 50/50'). Κατά τα πρώτα 10 ns, η μεταξύ τους απόσταση αυξάνει φτάνοντας τα 10 Å και στη συνέχεια παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης. Η μεταβολή υποδηλώνει τη σταθεροποίηση της δομής των πτερυγίων της πρωτεάσης πάνω από το μόριο του προσδέτη, οδηγώντας σε μια κλειστή δομή της HIV-1 PR. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων μελετών, όπως των Zhu *et al.*¹²⁴

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης δείχνουν ότι τα φουλερενικά παράγωγα δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με την καταλυτική τριάδα (Asp-Thr-Gly) του ενζύμου, αλλά κυρίως με αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο (29/29' και 30/30') καθώς και με τα πτερύγια της πρωτεάσης (π.χ. Gly48/48'). Το σύμπλοκο της πρωτεΐνης με την ένωση **96** παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με αυτό της ένωσης **87**. Η μοναδική διαφορά στα δύο σύμπλοκα εμφανίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ Gly51-Gly51', η οποία είναι λιγότερο εμφανής (παρουσία 38%) στο σύμπλοκο της ένωσης **96**. Τα δύο διαφορετικά μόρια

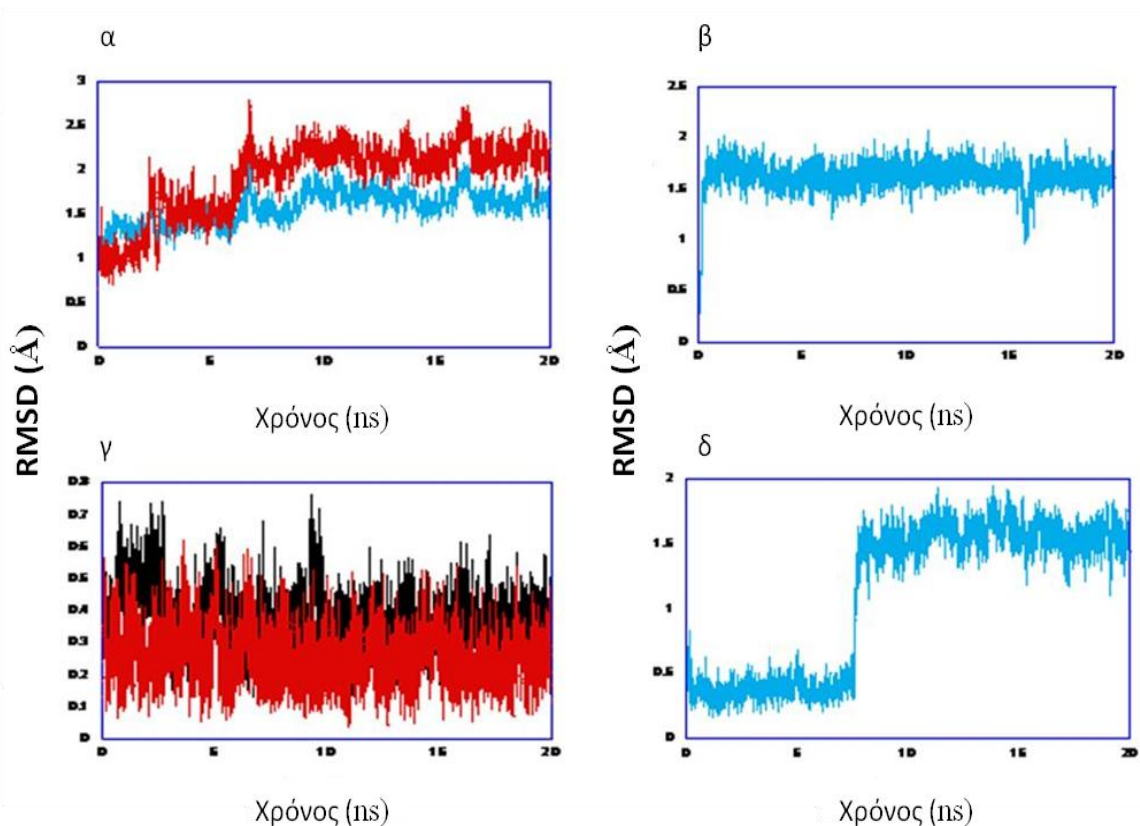
προσδέτες αλληλεπιδρούν με δύο διαφορετικές περιοχές της πρωτεάσης (πτερύγια και ενεργό κέντρο). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι πιθανόν υπεύθυνες για την αυξημένη ενέργεια πρόσδεσης των ενώσεων **87** και **96** με την HIV-1 PR.



Εικόνα 4.7: Υπολογισμένες αποστάσεις (στα 20 ns) μεταξύ ατόμων Ca για τα αμινοξέα Asp25 (ενεργό κέντρο), Ile50 και Ile50' (πτερύγια) στο σύμπλοκο HIV-1 PR-ένωση **87**:

(α) Απόσταση Asp25-Ile50.

(β) Απόσταση Ile50-Ile50'.



Εικόνα 4.8: Διακύμανση τιμών rmsd, για τα σύμπλοκα HIV-1PR-**87** (α, β, γ) και HIV-1 PR-**96** (δ).

(α) Πρωτεάση-ένωση **87** (μπλε) και αμινοξέα (44-55, 44'-55') στα πτερύγια (κόκκινα).

(β) και (δ). Αμινοξέα ενεργού κέντρου (Asp-Thr-Gly).

(γ) Αμινοξέα 79-83 (κόκκινο) και 79'-83' (μαύρο).

Ανάλυση τιμών απόκλισης της μέσης τιμής των τετραγώνων (*root mean square deviation-rmsd*). Για τον έλεγχο της σταθερότητας της δομής της πρωτεάσης αναλύθηκαν οι τιμές rmsd για τα άτομα άνθρακα (Ca) του συμπλόκου πρωτεάσης- ένωσης **87**. Ως δομή αναφορά για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η δομή του συμπλόκου από τους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης. Η ανάλυση των τιμών δεν έδειξε κάποια σημαντική δομική αλλαγή στην πρωτεάση κατά το χρόνο προσομοίωσης της ΜΔ, η μέση τιμή υπολογίστηκε σε 1,9 Å (Εικόνα 4.8α μπλε). Η διακύμανση στις τιμές rmsd ελαχιστοποιήθηκε μετά από περίπου 10 ns. Επίσης, η ανάλυση των τιμών rmsd για την περιοχή των πτερυγίων (44-55 και 44'-55') του συμπλόκου,

έδειξε τη δομική αλλαγή που συντελείται (Εικόνα 4.8α κόκκινο). Η μέση τιμή υπολογίστηκε σε 2,6 Å. Στην αρχή της προσομοίωσης το συγκεκριμένο τμήμα εμφανίζεται πολύ ευκίνητο, ενώ με το πέρασμα του χρόνου η κινητικότητα μειώνεται. Αυτό παρατηρείται χάρη στην εμφάνιση σταθεροποιητικών δεσμών υδρογόνου μεταξύ του προσδέτη και του αμινοξέος Gly48' στο πτερύγιο (Πίνακας 4.7) και μεταξύ των δύο γλυκινών στα πτερύγια. Παρατηρείται ότι οι τιμές rmsd στην περιοχή των πτερυγίων είναι μεγαλύτερες σε σχέση με ολόκληρη την πρωτεάση. Οδηγούμαστε λοιπόν στο συμπέρασμα πως οι δομικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν σε όλο το ένζυμο, οφείλονται κυρίως στις αλλαγές των πτερυγίων του.

Το επόμενο βήμα ήταν η ανάλυση του ενεργού κέντρου της πρωτεάσης (Εικόνα 4.8β). Η μέση τιμή rmsd ($\approx 1,5$ Å) οδηγεί στην παρατήρηση ότι το ενεργό κέντρο δεν παρουσιάζει σημαντικές δομικές αλλαγές και είναι σχετικά σταθερό σε όλο το χρονικό διάστημα της προσομοίωσης της ΜΔ. Συνεπώς, θελήσαμε να παρατηρήσουμε αν υπάρχουν αλλαγές στη γειτονική περιοχή. Το τμήμα του ενζύμου που ορίζεται από τα αμινοξέα 79-83 (και 79'-83') περιβάλλει το ενεργό κέντρο και έχει άμεση επαφή με το διαλύτη. Στην ανάλυσή παρατηρήθηκε (Εικόνα 4.8γ) ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά σε αυτά τα δύο τμήματα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με άλλες μελέτες (όπως Zoete *et al.*) σε διαφορετικά σύμπλοκα της HIV-1 PR¹⁹⁸ και επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ομοιοτήτων στον τρόπο πρόσδεσης στην πρωτεάση. Αυτή η κοινή συμπεριφορά παρατηρείται και στο σύμπλοκο της ένωσης **96**, καθώς η περιοχή των πτερυγίων εμφανίζει και σε αυτήν την περίπτωση μεγαλύτερη διακύμανση σε σχέση με ολόκληρη την πρωτεΐνη. Η διαφορά στο σύμπλοκο με τη ένωση **96** εντοπίζεται στην περιοχή του ενεργού κέντρου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρείται μετά τα πρώτα 7 ns μια δομική αλλαγή που οφείλεται, πιθανότατα, στην εμφάνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ του Asp25 και της ένωσης **96** (Εικόνα 4.8δ).

Το συμπέρασμα από την ανάλυση των δομικών αλλαγών που παρουσιάζονται στην πρωτεάση είναι η έλλειψη σημαντικής διαφοροποίησης (εκτός από την περιοχή των πτερυγίων) κατά την πρόσδεση των φουλερενικών παραγώγων. Όπως είναι αναμενόμενο, η περιοχή των πτερυγίων, μετά τις αρχικές δομικές αλλαγές, σταθεροποιείται κυρίως λόγω

της παρουσίας αλληλεπιδράσεων με τα μόρια προσδέτες (υδρογονοδεσμοί με Gly48/48').

Ανάλυση MM-PBSA. Για την ακριβέστερη αξιολόγηση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MM-PBSA. Η επίτευξη της ενεργειακής ισορροπίας, για τα σύμπλοκα με τις ενώσεις **87**, **96** και C₆₀, έγινε μετά την πάροδο 7 ns. Η περίληψη των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.8. Είναι εμφανής η ποιοτική συμφωνία των αποτελεσμάτων της ενέργειας πρόσδεσης, όπως υπολογίζεται από τη μέθοδο MM-PBSA και από το λογισμικό μοριακής πρόσδεσης (ArgusLab). Και οι δύο μέθοδοι δείχνουν ότι: (α) οι ενώσεις **87** και **96** έχουν υψηλές ενέργειες πρόσδεσης $|\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}|$ και (β) η ένωση **96** παρουσιάζει ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης $|\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}|$ μεγαλύτερη από την ένωση **87**. Από τον πίνακα φαίνεται πως η τιμή ΔE_{MM} είναι παρόμοια και για τα δύο παράγωγα, αλλά οι συνεισφορές ΔE_{elec} και ΔE_{vdW} διαφέρουν. Όλες οι άλλες ενεργειακές συνεισφορές παρουσιάζουν ομοιότητες και για τις δύο ενώσεις. Η συνολική ηλεκτροστατική συνεισφορά ($\Delta E_{elec(tot)} = \Delta E_{elec} + \Delta G_{PB}$) είναι 45,18 kcal/mol για την ένωση **87** και 39,59 kcal/mol για την ένωση **96**. Επίσης παρατηρείται ότι η εντροπία (-TΔS) είναι παραπλήσια και για τα τρία σύμπλοκα (Πίνακας 4.8). Η πρόσδεση των φουλερενίων στην HIV-1 PR επηρεάζεται κυρίως από τις van der Waals συνεισφορές (ΔE_{vdW}) και από τις μη πολικές (ΔG_{NP}), με την ενέργεια ΔE_{vdW} να έχει τη μεγαλύτερη συνεισφορά. Το συγκεκριμένο μοτίβο στην πρόσδεση στο ένζυμο έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες.¹⁹⁸⁻²⁰⁰

Παρατηρείται, επίσης, πως ο φουλερενικός σκελετός (C₆₀) έχει θετική ενέργεια πρόσδεσης (Πίνακας 4.8). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι δεν υπάρχουν ομάδες που μπορεί να δημιουργήσουν αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα στην κοιλότητα της πρωτεάσης. Αυτό δείχνει πως οι υψηλές ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης των παραγώγων **87** και **96** οφείλονται κυρίως στις πλευρικές ομάδες του φουλερενίου. Η συνεισφορά του σκελετού είναι κυρίως συνυφασμένη με τις van der Waals αλληλεπιδράσεις στην ενέργεια πρόσδεσης.

Για τον υπολογισμό την ενέργειας διαλυτότητας (solvation) με τη μέθοδο MM-PBSA δεν υπολογίζεται ξεχωριστά η ενέργεια του κάθε μορίου νερού. Αντίθετα, γίνεται χρήση ενός μοντέλου (Poisson-Boltzmann) με

προκαθορισμένες παραμέτρους και την εισαγωγή νέων όρων για τον υπολογισμό της ενέργειας και της υδροφοβικότητας (βλ. εξισώσεις 2.17-2.19, Κεφάλαιο 2). Η χρήση των προκαθορισμένων τιμών μπορεί να εξηγήσει τη διαφορά μεταξύ θεωρητικής και πειραματικής τιμής. Αυτή η απόκλιση μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση της μεθόδου LCPO (Linear Combinations of Pairwise Overlaps) για τον υπολογισμό της υδροφοβικής συνεισφοράς (SASA, Εξίσωση 2.19, Κεφάλαιο 2). Ως αποτέλεσμα, εμφανίζεται ικανοποιητική αναπαραγωγή των πειραματικών τιμών σε υδροφοβικά συστήματα όπως αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες.^{140,141,201,202}

Πίνακας 4.8: Συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ($\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$) για τα σύμπλοκα της HIV-1 PR με τις ενώσεις **87**, **96** και C_{60} , όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο MM-PBSA.

Ανάλυση	$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$ (kcal mol ⁻¹)		
	Ένωση 87	Ένωση 96	C_{60}
ΔE_{elec}	-14.74 (3.01) ^a	-20.78 (2.70)	-5.24 (3.14)
ΔE_{vdW}	-83.90 (2.55)	-76.80 (2.61)	-65.37 (3.00)
ΔE_{MM}	-98.65 (2.48)	-97.58 (2.94)	-70.61 (2.89)
ΔG_{NP}	-26.35 (2.11)	-25.14 (2.16)	-34.25 (2.95)
ΔG_{PB}	59.92 (2.32)	60.37 (1.99)	56.59 (2.58)
ΔG_{sol}	33.57 (2.13)	35.23 (2.06)	22.34 (3.04)
$\Delta G_{\text{elec(tot)}}$	45.18 (2.44)	39.59 (2.02)	51.35 (2.76)
$\Delta H_{(\text{MM}+\text{solv})}$	-65.08 (2.87)	-62.35 (2.30)	-48.27 (2.92)
$-T\Delta S_{\text{tot}}$	53.11 (2.24)	49.60 (1.95)	49.52 (3.14)
$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$	-11.97	-12.75	1.25

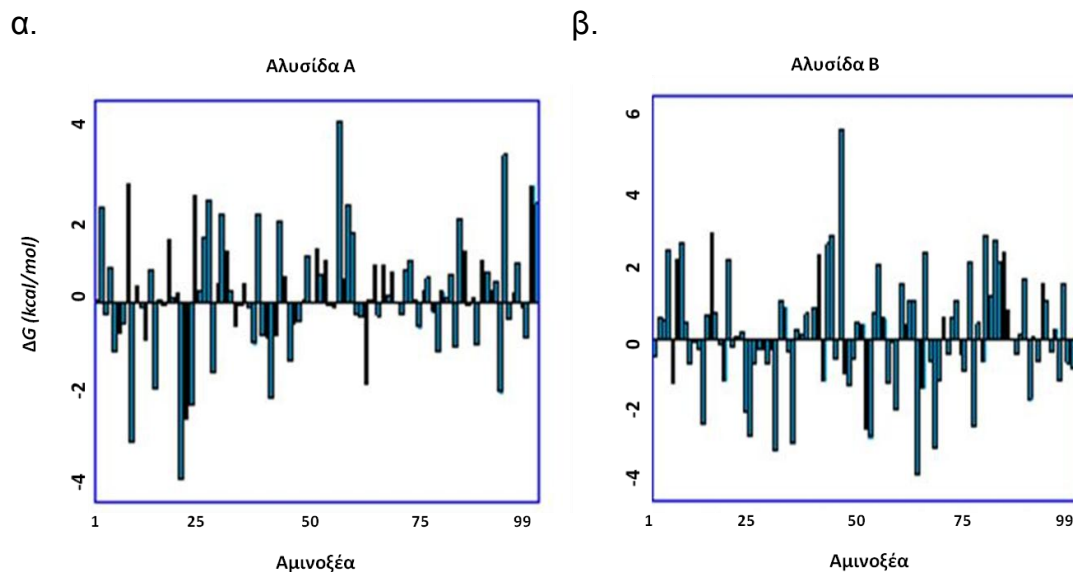
Σημείωση: $\Delta G_{\text{elec(tot)}} = \Delta E_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{PB}}$ και $\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{NP}}$

^a Οι αριθμοί στις παρενθέσεις εκφράζουν τη μεταβλητότητα (standard deviation).

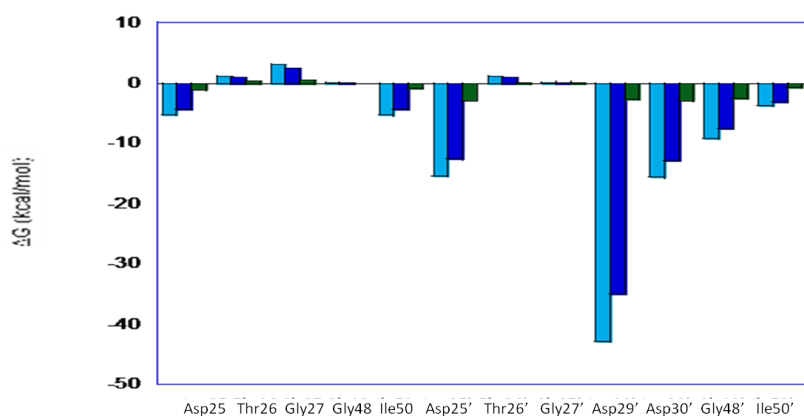
Ανάλυση ενεργειακής συνεισφοράς ανά αμινοξύ. Το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση της ενεργειακής συνεισφοράς κάθε αμινοξέους. Η εικόνα 3.9 παρουσιάζει τις συνεισφορές όλων των αμινοξέων στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ($\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$). Το αποτέλεσμα καταδεικνύουν ότι αμινοξέα σε συγκεκριμένες περιοχές των πτερυγίων (στην αλυσίδα Β) έχουν ευνοϊκή συνεισφορά στην ενέργεια πρόσδεσης. Για παράδειγμα η Gly48' και η Gly51' συνεισφέρουν κατά -2,7 και -2,4 kcal mol⁻¹ αντίστοιχα. Επίσης παρατηρήθηκε πως οι δεσμοί υδρογόνου της ένωσης **87** με αμινοξέα των πτερυγίων της

αλυσίδας B οδηγούν σε μεγαλύτερη συνεισφορά σε σχέση με αυτά της αλυσίδας A. Επίσης ευνοϊκή συνεισφορά κατά $-3,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ παρουσιάζεται και από τα αμινοξέα Glu και Ile στις θέσεις 21 και 62' (Εικόνα 4.9). Τέλος, παρατηρείται αυξημένη συνεισφορά των αμινοξέων του ενεργού κέντρου.

Η εικόνα 4.10 δείχνει τον καταμερισμό της ενέργειας ($\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$, πράσινο), για το σύμπλοκο με την ένωση **87**, σε μεταβολή ενθαλπίας (ΔH , γαλάζιο) και μεταβολή εντροπίας ($-T\Delta S$, μπλε). Σ' αυτήν παρουσιάζονται τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου (Asp25/25'-Thr26/26'-Gly27/27'), των πτερυγίων (Ile50/50') και των αμινοξέων που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την ένωση (Asp29/29' και Gly48/48'). Το Asp25' εμφανίζει την υψηλότερη συνεισφορά ($-2,7 \text{ kcal mol}^{-1}$), απ' όλα τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, παρόλο που δεν αλληλεπιδρά με την ένωση **87**. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4.10 ο δεσμός υδρογόνου με το αμινοξύ Asp29' είναι κυρίως υπεύθυνος για τη μεγάλη συνεισφορά στην ολική ενέργεια ($\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$). Συμπερασματικά, μπορούμε να τονίσουμε πως η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων (όπως οι δεσμοί υδρογόνου) δε σημαίνει αυτομάτως και υψηλή συνεισφορά στην ενέργεια πρόσδεσης. Η συνεισφορά της ενθαλπίας (Εικ. 4.10, γαλάζιο) είναι συγκρίσιμη με ελαφρά υψηλότερες τιμές σε σχέση με αυτές της εντροπίας (Εικ. 4.10, μπλε). Από την εικόνα 3.9 φαίνεται ότι πολλά αμινοξέα, χωρίς άμεση αλληλεπίδραση με το μόριο προσδέτη, έχουν υψηλή συνεισφορά στην ενέργεια πρόσδεσης. Γενικώς, τα αμινοξέα με τις υψηλότερες συνεισφορές βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο και τα πτερύγια τους ενζύμου.



Εικόνα 4.9: Ανάλυση ενεργειακής συνεισφοράς στην ενέργεια πρόσδεσης (ΔG , πράσινο) ανά αμινοξύ για (α) την αλυσίδα A και (β) την αλυσίδα B της πρωτεΐνης στο σύμπλοκο με την ένωση **87**.



Εικόνα 4.10: Ενεργειακή συνεισφορά, ΔH (γαλάζιο), $T\Delta S$ (μπλε), ΔG (πράσινο) για τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο (Asp-Thr-Gly) και τα πτερύγια (Ile50/50'), καθώς και για τα αμινοξέα που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την ένωση **87** (Asp29', Asp30', Gly48, Gly48').

Φαρμακοκινητικές ιδιότητες (ADMET) φουλερενικών παραγώγων. Τα φουλερενικά παράγωγα που έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναστολείς της HIV-1 πρωτεάσης, έχουν σχετικά χαμηλή τοξικότητα.¹⁵⁹ Όμως η χρήση λειτουργικών ομάδων (π.χ. τμήματα της σακουιναβίρης) ως πλευρικές αλυσίδες μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα τοξικότητας. Επειδή η σακουιναβίρη έχει

σημαντικές παρενέργειες,²⁰³ υπολογίσθησαν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες (Πίνακας 3.9) των φουλερενικών παραγώγων **81-96** (Πίνακας 4.7).

Οι κυτταρικές σειρές Caco-2 και MDCK χρησιμοποιούνται για τη μελέτη και την πρόβλεψη της διαπερατότητας νέων φαρμάκων μέσω κυτταρικών μεμβρανών. Οι ιδανικές τιμές της ταχύτητας για τη διαπερατότητα είναι > 500 nm/s, ενώ ταχύτητες μικρότερες των 25 nm/s αντιστοιχούν σε μικρή διαπερατότητα.²⁰⁴ Συνεπώς τα περισσότερα παράγωγα που προτείνουμε (ενώσεις **83-85**, **88**, **89**, **93** και ιδιαίτερα οι ενώσεις **81**, **91**, **94**) έχουν ικανοποιητική διαπερατότητα (Πίνακας 4.9). Οι ενώσεις με πολικές ομάδες (όπως -OH στα παράγωγα **86**, **87**, **92**) εμφανίζουν μικρή διαπερατότητα. Αντίθετα, ενώσεις με μειωμένο πολικό χαρακτήρα παρουσιάζουν αυξημένη διαπερατότητα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση του τμήματος της σακουιναβίρης που χρησιμοποιήθηκε κατά το σχεδιασμό (Εικόνα 4.4). Οι ενώσεις **95** και **96** έχουν μικρή διαπερατότητα σε σχέση με τις υπόλοιπες λόγω της προσθήκης μεγαλύτερων τμημάτων του φαρμάκου ως πλευρικές αλυσίδες. Το αποτέλεσμα είναι λογικό καθώς η σακουιναβίρη εμφανίζει πολύ μικρή διαπερατότητα σε κύτταρα Caco-2 και MDCK ($9,31 \pm 1$ nm/s και $4,63 \pm 0,25$ nm/s, αντιστοίχως).²⁰⁵ Συμπεραίνεται πως η αύξηση του πολικού χαρακτήρα και η χρήση μεγάλων τμημάτων του φαρμάκου ως πλευρικές αλυσίδες, μειώνει την κυτταρική διαπερατότητα των παραγώγων. Όμως, οι πολικές ομάδες είναι απαραίτητες καθώς αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης αλληλεπιδράσεων (υδρογονοδεσμοί) με την πρωτεάση. Επομένως, για τον επιτυχημένο σχεδιασμό νέων αναστολέων δεν πρέπει να υπάρχει ισχυρή πολικότητα που να παρεμποδίζει την αυξημένη κυτταρική διαπερατότητα.

Επιπροσθέτως, υπολογίστηκε τη δράση των ουσιών **81-96** στο κεντρικό νευρικό σύστημα σε μια κλίμακα από -2 (αδρανής) έως +2 (ενεργή). Οι ενώσεις **81** και **94** είναι οι περισσότερο ενεργές, αλλά γενικά όλα τα παράγωγα έχουν πολύ μικρή δραστηριότητα στο CNS. Αυτό σημαίνει πως εμφανίζουν λίγες ανεπιθύμητες ενέργειες συνδεδεμένες με το κεντρικό νευρικό σύστημα.¹⁵⁷

Το κανάλι ιόντων καλίου K^+ hERG έχει συνδεθεί με την καρδιοτοξικότητα. Συνεπώς, είναι σημαντικό να ελεγχθεί η δράση νέων φαρμάκων στο συγκεκριμένο στόχο για να κατανοηθεί πληρέστερα η ύπαρξη

ή όχι τοξικότητας. Μελέτες έχουν δείξει πως η αναστολή του καναλιού hERG οδηγεί στο σύνδρομο μακρού QT (Long QT syndrome).¹⁶⁴ Όλα τα παράγωγα (εκτός από τις ενώσεις **91-93**) παρουσιάζουν τιμές IC₅₀ της τάξης των μΜ. Αυτό καταδεικνύει την αυξημένη τοξικότητα των συγκεκριμένων ουσιών. Επιπλέον, οι ενώσεις **87**, **95** και **96** εμφανίζουν τη χαμηλότερη τοξικότητα. Αυτό αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι περιέχουν μεγαλύτερα τμήματα της σακουιναβίρης ως πλευρικές αλυσίδες (βλ. Πίνακα 4.6). Οι πειραματικές τιμές που αφορούν στην αναστολή του καναλιού για τη σακουιναβίρη είναι IC₅₀ = 15,3 μΜ (logIC₅₀ = -4,82).¹⁹⁰

Πίνακας 4.9: Φαρμακοκινητικές ιδιότητες των προτεινόμενων φουλερενικών παραγώγων **81-96**^a.

Ένωση	Δραστικότητα CNS (-- έως ++)	Αναστολή διάυλου K ⁺ hERG (log IC ₅₀)	Διαπερατότητα Caco-2 (nm/s) (<25 μικρή, >500 μεγάλη)	Διαπερατότητα MDCK (nm/s) (<25 μικρή, >500 μεγάλη)
81	-	-7.746	1365	692
82	--	-7.323	65	26
83	--	-7.389	736	355
84	--	-7.372	341	155
85	--	-7.271	104	43
86	--	-7.068	40	15
87	--	-6.977	22	8
88	--	-7.195	423	195
89	--	-7.090	133	55
90	--	-7.006	43	16
91	--	-9.501	1447	737
92	--	-9.064	39	14
93	--	-9.220	102	42
94	-	-7.587	1482	756
95	--	-6.606	9	14
96	--	-6.848	14	19

^a Οι ιδιότητες των ενώσεων υπολογιστήκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα QikProp (Βλ. Μέθοδοι)

4.4 Συμπεράσματα

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν: (α) Η χρήση αποτελεσματικών στρατηγικών για το σχεδιασμό νέων φουλερενικών παραγώγων ως αναστολείς της HIV-1 πρωτεάσης και (β) Η κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της πρόσδεσης στο ένζυμο.

Αναπτύχθηκαν δυο μοντέλα 3D-QSAR, CoMFA και CoMSIA για 51 φουλερενικά παράγωγα. Η προγνωστική ικανότητα των μοντέλων ελέγχθηκε με μια ομάδα ουσιών με προσδιορισμένες πειραματικά ενέργειες πρόσδεσης. Οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συνεισφορά στο μοντέλο CoMSIA. Χρησιμοποιώντας την τεχνική CoMSIA σχεδιάσθηκε μια σειρά φουλερενικών παραγώγων, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα. Η δεύτερη στρατηγική δίνει έμφαση στη χρήση τμημάτων από το φάρμακο σακουιναβίρη στο σχεδιασμό νέων πλευρικών αλυσίδων για το φουλερένιο. Τα περισσότερα από τα παράγωγα που σχεδιάσθηκαν παρουσιάζουν υψηλές ενέργειες πρόσδεσης στην πρωτεάση.

Μελετήθηκαν επίσης, οι δεσμοί υδρογόνου που εμφανίζονται στα σύμπλοκα του ενζύμου στα παράγωγα **87** και **96**, τα οποία εμφανίζουν την ευνοϊκότερη ενέργεια πρόσδεσης την πρωτεάση. Παρατηρήθηκε ότι, τα φουλερένια παράγωγα:

- (α) σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με διαφορετικά αμινοξέα
- (β) αλληλεπιδρούν με αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο (Asp29/29', Asp30/30') ή με αμινοξέα στα πτερύγια (Gly48/48') και
- (γ) δεν αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα Asp-Thr-Gly στο ενεργό κέντρο

Είδαμε πως τα πτερύγια της πρωτεάσης εμφανίζουν διαμορφωτικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Η σταθεροποίηση της δομής τους, που παρατηρείται, οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πτερυγίων και των ενώσεων (π.χ. δεσμοί υδρογόνου με Gly48/48'). Η ενεργειακή ανάλυση, μέσω της μεθόδου MM-PBSA, έδειξε ότι η πρόσδεση των φουλερενικών παραγώγων (**87**, **96** και C₆₀) οφείλεται κυρίως σε συνεισφορές μέσω van der Waals και μη πολικών αλληλεπιδράσεων (ΔE_{vdW} και ΔG_{NP}). Επίσης στην υψηλή ενέργεια πρόσδεσης $|\Delta G_{πρόσδεσης}|$ των

ενώσεων **87** και **96** συμβάλλουν σημαντικά οι πλευρικές αλυσίδες των φουλερενικών παραγώγων και η μεγάλη συνεισφορά ΔE_{vdW} προέρχεται κυρίως από το φουλερενικό σκελετό (C_{60}).

Κατά την ανάλυση των ενεργειακών συνεισφορών καταγράφηκε η μεγαλύτερη επίδραση της ενθαλπίας σε σχέση με την εντροπία του συστήματος. Επίσης παρατηρήθηκε ότι κάποια αμινοξέα, όπως το αμινοξύ Asp25' (συνεισφορά στην ενέργεια πρόσδεση $-2,7$ kcal/mol), τα οποία δεν αλληλεπιδρούν με το μόριο προσδέτη, έχουν σημαντική συνεισφορά στην ενέργεια πρόσδεσης. Τέλος, σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση ενός μορίου παίζουν οι περιοχές κοντά στο ενεργό κέντρο και τα πτερύγια του ενζύμου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Συγκριτική μελέτη των μεταλλάξεων L10I, G48V, L63P, A71V, G73S, V82A και I84V σε σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης με τη σακουιναβίρη ⁸¹.

5.1 Εισαγωγή

Ένα σημαντικό πρόβλημα που παρουσιάζεται κατά τη θεραπεία του AIDS είναι η εμφάνιση ανθεκτικών ιών στα φάρμακα που χορηγούνται. Η ανθεκτικότητα του ιού κατά των αναστολέων της HIV-1 πρωτεάσης οφείλεται σε μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο γονίδιο του ενζύμου. Μάλιστα έχει παρατηρηθεί ότι αρχικά παρουσιάζεται μια μόνο μετάλλαξη η οποία προσδίδει στον ιό χαμηλού επιπέδου αντίσταση.²⁰⁶ Στη συνέχεια παρουσιάζονται και άλλες μεταλλάξεις στο ένζυμο με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται ακόμα περισσότερο ανθεκτικά ιικά στελέχη.²⁰⁷ Η εμφάνιση των ανθεκτικότερων στελεχών δεν περιορίζεται μόνο σε ένα συγκεκριμένο φάρμακο αλλά και σε άλλα αντιικά φάρμακα (cross-resistance). Ένα από τα πρώτης γενιάς φάρμακα κατά της φυσιολογικής HIV-1 πρωτεάσης (wild type ή wt HIV-1 πρωτεάση) είναι η σακουιναβίρη, η οποία, όπως έχει ήδη αναφερθεί δρα ως ένα πεπτιδομιμητικό ανάλογο του φυσιολογικού υποστρώματος της πρωτεάσης.^{7,208}

Επειδή η σακουιναβίρη είναι από τους πρώτους αναστολείς της πρωτεάσης, υπάρχει μεγάλη ποσότητα κλινικών δεδομένων όσο αφορά στην ανθεκτικότητα του ιού HIV-1. Ένας από τους λόγους εμφάνισης ανθεκτικών ιών είναι η υδροφοβική φύση των φαρμάκων. Όλοι οι αναστολείς της πρωτεάσης σχεδιάζονται ώστε να μπορούν να αλληλεπιδρούν με την υδροφοβική κοιλότητά της. Κατά συνέπεια τα φάρμακα παρουσιάζουν χαμηλή διαθεσιμότητα από το στόμα (oral bioavailability).²⁰⁹ Για να υπερκεραστεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, η σακουιναβίρη χορηγείται σε μεγάλες δόσεις. Αυτή η τακτική χορήγησης συμβάλλει στην εμφάνιση παρενεργειών, όπως είναι η λιποδυστροφία και η υπέρταση.²¹⁰ και οδηγεί στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του ιού.

Βασιζόμενοι σε αυτές τις κλινικές μελέτες, οι ερευνητές έχουν απομονώσει διάφορες μεταλλάξεις της πρωτεάσης, που επιφέρουν ανθεκτικότητα στη σακουιναβίρη.²¹¹ Η παρούσα ερευνητική μελέτη επικεντρώθηκε στη σύγκριση των χαρακτηριστικών επτά απλών μεταλλάξεων της HIV-1 πρωτεάσης στις θέσεις 10/10' (L10I), 48/48' (G48V), 63/63' (L63P), 71/71' (A71V), 73/73' (G73S), 82/82' (V82A) and 84/84' (I84V). Μέσα στην παρένθεση το πρώτο αμινοξύ αποτελεί το απαντώμενο στη wt HIV-1 πρωτεάση που θα μεταλλαχθεί. Ο αριθμός που ακολουθεί υποδεικνύει τη θέση μετάλλαξης και ακολουθεί το μεταλλαγμένο αμινοξύ. Η θέση των συγκεκριμένων αμινοξέων και οι δομές τους παρουσιάζονται στην εικόνα 5.1 και στον Πίνακα 5.1. Η μετάλλαξη από Gly σε Val στις θέσεις 48/48' έχει τη μεγαλύτερη επίδραση όσον αφορά την ανθεκτικότητα στη σακουιναβίρη.²¹² Το συγκεκριμένο αμινοξύ βρίσκεται στα πτερύγια της πρωτεάσης, τα οποία ελέγχουν την είσοδο υποστρωμάτων στην κοιλότητα πρόσδεσης του ενζύμου. Η ανάλυση των ενεργειακών χαρακτηριστικών των διαφορετικών μεταλλάξεων έγινε με τη χρήση της μεθόδου MM-PBSA, ενώ η επίδραση της μετάλλαξης G48V στην πρόσδεση της σακουιναβίρης υπολογίστηκε με τη μέθοδο της θερμοδυναμικής ολοκλήρωσης (TI, βλ. Ενότητα 2.6).

5.2 Μέθοδοι

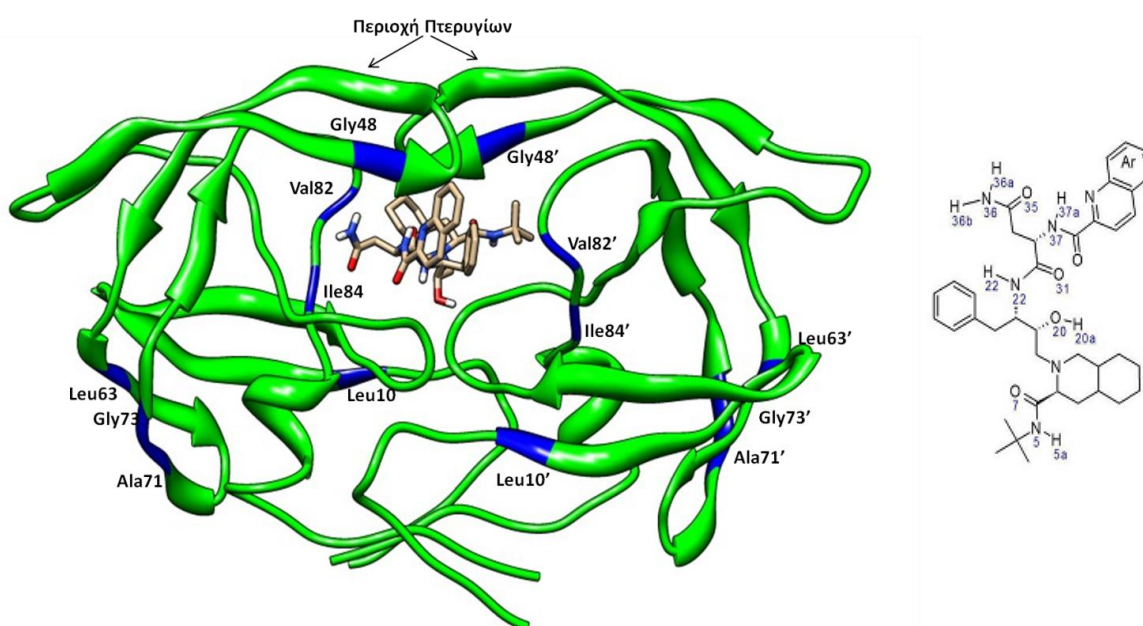
Για τους θεωρητικούς υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή της πρωτεάσης HIV-1 σε σύμπλοκο με τη σακουιναβίρη (κωδικός PDB: 3OXC, με ανάλυση 1.16 Å). Για τα μεταλλαγμένα σύμπλοκα της πρωτεΐνης αντικαταστάθηκαν στην κρυσταλλική δομή τα αμινοξέα στις θέσεις 10/10', 48/48', 63/63', 71/71', 73/73', 82/82' και 84/84' (Πίνακας 5.1).

5.3 Αποτελέσματα

Μια περίληψη των αποτελεσμάτων της σύγκρισης μεταξύ wt HIV-1 πρωτεάσης και των μεταλλάξεων της παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.2. Οι συνέπειες της μοριακής πρόσδεσης του φαρμάκου στην πρωτεάση αποτελούν αντικείμενο έρευνας στη συγκεκριμένη μελέτη.

Ανάλυση των διαμορφωτικών χαρακτηριστικών της πρωτεάσης και της σακουιναβίρης στην κοιλότητα πρόσδεσης στα διάφορα σύμπλοκα. Οι

υπολογισμοί των τιμών rmsd για τα άτομα άνθρακα C_α της wt HIV-1 πρωτεάσης και όλων των αντίστοιχων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, έδειξαν ότι τα συστήματα παρουσιάζουν μια σταθεροποίηση μετά από περίπου 10 ns (Εικόνα 5.2). Επίσης, οι τιμές rmsd για το φάρμακο μέσα στην πρωτεάση παρέχουν αρκετές πληροφορίες όσον αφορά τις διαμορφωτικές του μεταβολές. Στην Εικόνα 5.3 παρουσιάζονται οι τιμές rmsd, ως προς το χρόνο, για όλα τα άτομα της σακουιναβίρης (σε σύγκριση με την αρχική της δομή) στα υπό μελέτη σύμπλοκα.

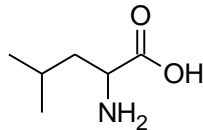
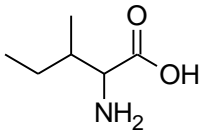
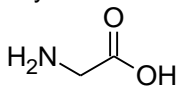
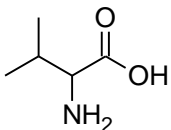
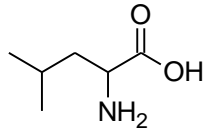
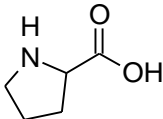
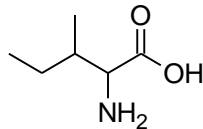
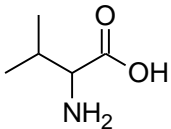
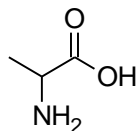
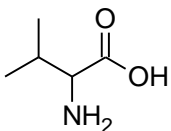
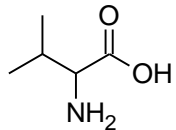
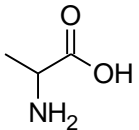
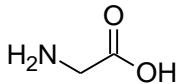
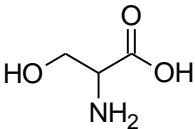


Εικόνα 5.1: Αντιπροσωπευτική τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου της wt HIV-1 πρωτεάσης με τη σακουιναβίρη (αριστερά). Η χημική δομή του φαρμάκου παρουσιάζεται στα δεξιά. Με μπλε χρώμα παρουσιάζονται οι θέσεις των αμινοξέων που έχουν υποστεί μεταλλάξεις.

Η σημαντικότερη μεταβολή στη διαμόρφωση της σακουιναβίρης, παρατηρείται στη μετάλλαξη A71V, με την τιμή rmsd να σταθεροποιείται στα $\approx 1.8 \text{ \AA}$ στο τέλος της προσομοίωσης (Εικόνα 5.3β). Σε όλα τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα σύμπλοκα, το φάρμακο δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με την αρχική του διαμόρφωση, με τις τιμές rmsd να κυμαίνονται μεταξύ 1,29-1,5 \AA . Η μοναδική εξαίρεση παρουσιάζεται στο

μεταλλαγμένο στέλεχος V82A, όπου η σακουιναβίρη μέσα στην κοιλότητα εμφανίζει τη χαμηλότερη διακύμανση rmsd με μια μέση τιμή ≈ 0.9 Å. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν επηρεάζει τη διαμόρφωση του φαρμάκου καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.

Πίνακας 5.1: Δομές των αμινοξέων στην HIV-1 πρωτεάση (wt) και οι αντίστοιχες μεταλλάξεις που μελετήθηκαν.

wt HIV-1 PR	Μεταλλάξεις
Leu10 	Ile 
Gly48 	Val 
Leu63 	Pro 
Ile84 	Val 
Ala71 	Val 
Val82 	Ala 
Gly73 	Ser 

Πίνακας 5.2: Περίληψη των σημαντικότερων αποτελεσμάτων της συγκριτικής μελέτης για τα διαφορετικά σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης και της σακουιναβίρης.

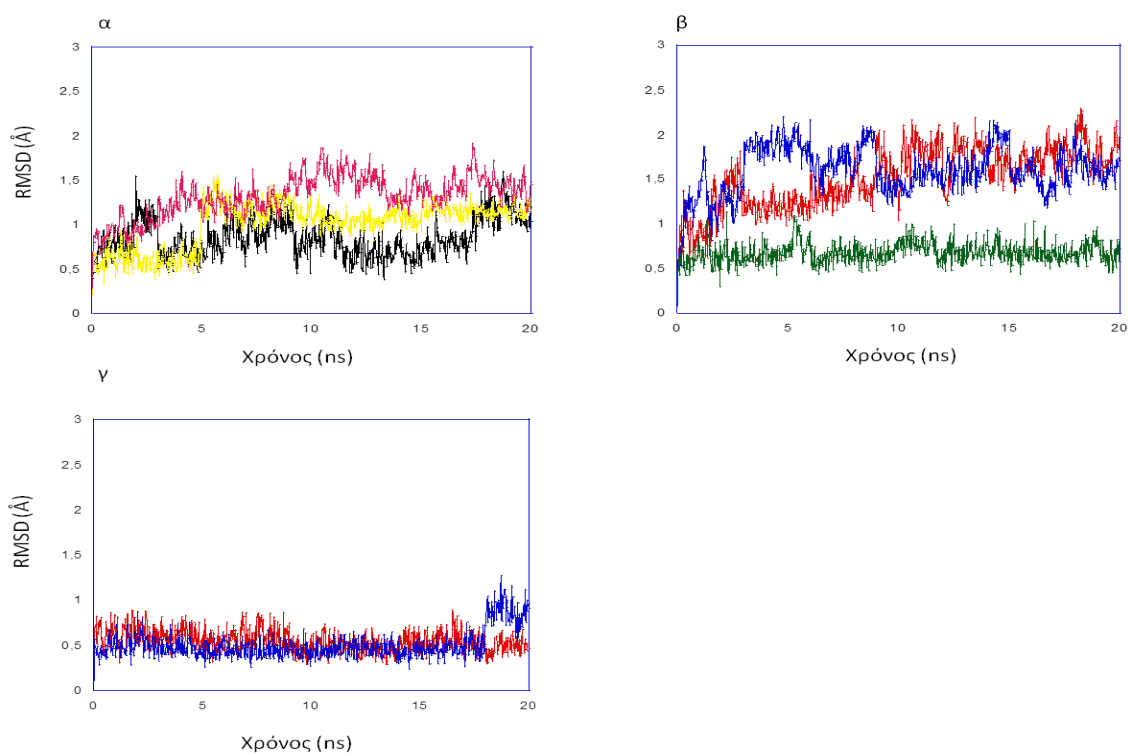
HIV-1 πρωτεάση	Μέση τιμή rmsd (Å) της περιοχής των πτερυγίων	Rmsd (Å) της σακουιναβίρης ^α	Αριθμός ΔΥ ^β	Αλληλεπιδράσεις με τη συμμετοχή νερού ^γ	$\Delta G_{MM-PBSA}$ (kcal/mol)	$K_i^{MM-PBSA}$ (nM)	K_i^{exp} (nM)
<i>Wt</i>	0.52	-	7	2	-12.25	2.5	0.42 ^δ
<i>G48V</i>	0.55	3.16	3	-	-11.10	14.5	36 ^δ
<i>L10I</i>	0.99	1.67	5	2	-11.53	7.4	-
<i>L63P</i>	1.39	4.03	4	1	-10.89	21	-
<i>A71V</i>	1.45	3.99	4	2	-12.04	3.2	-
<i>G73S</i>	0.68	1.73	5	4	-11.82	4.6	-
<i>V82A</i>	0.87	4.21	3	-	-11.76	5.1	-
<i>I84V</i>	0.86	1.29	3	-	-10.90	20.6	-

^αRmsd μεταξύ της δομής του φαρμάκου στη wt HIV-1 πρωτεάση και των αντίστοιχων δομών της σακουιναβίρης στα μεταλλαγμένα σύμπλοκα (Εικόνα 5.4).

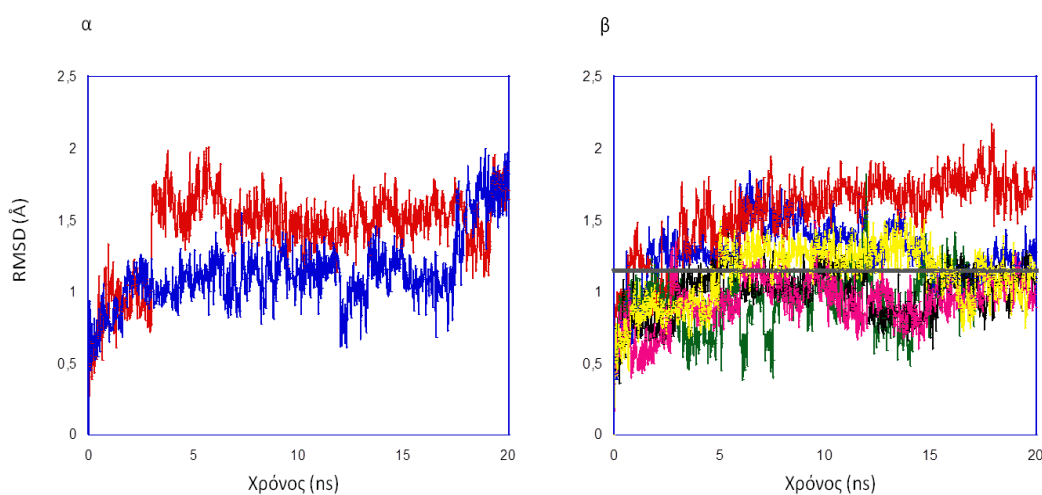
^βΔΥ: Δεσμοί Υδρογόνου.

^γΓια την περιγραφή των συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων δείτε την Εικόνα 5.8.

^δΟι πειραματικές τιμές ελήφθησαν από τη βιβλιογραφική παραπομπή.²¹²



Εικόνα 5.2: Τιμές rmsd για τα άτομα άνθρακα Ca της HIV-1 PR wt και των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. (α) I84V-μαύρο, L10I-κίτρινο, V82A-μωβ (β) L63P-κόκκινο, A71V-μπλε, G73S-πράσινο (γ) wt-κόκκινο, G48V-μπλε.



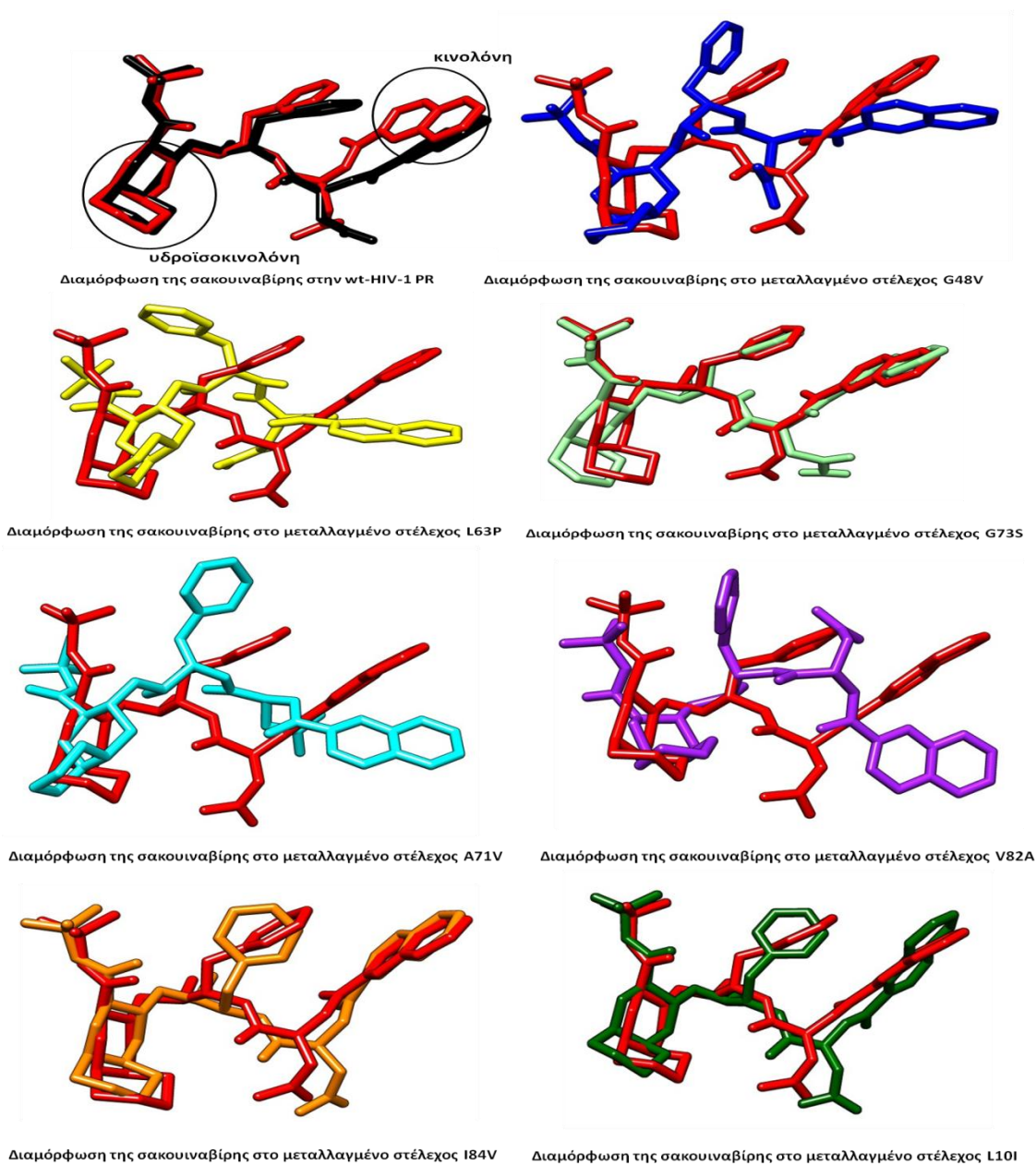
Εικόνα 5.3: Τιμές rmsd για τη σακουιναβίρη, σε σύγκριση με την αρχική της διαμόρφωση, μέσα στα σύμπλοκα με την HIV-1 πρωτεάση: (α) wt (μπλε) και G48V (κόκκινο) (β) L63P (μπλε), A71V (κόκκινο), V82A (πράσινο), G73S (μαύρο), I84V (μωβ) και L10I (κίτρινο). Η γκρι γραμμή δείχνει τη μέση τιμή rms για τη σακουιναβίρη στη wt-HIV-1 πρωτεάση.

Αν και η σακουιναβίρη παραμένει σχετικά σταθερή, κατά το πρώτο μισό της προσομοίωσης παρουσιάζεται περισσότερο κινητική σε σχέση με τα άλλα μεταλλαγμένα στελέχη. Επίσης από τα γραφήματα μπορεί να διαπιστωθεί ότι η σακουιναβίρη είναι περισσότερο κινητική όταν προσδένεται στο στέλεχος G48V σε σχέση με τη wt HIV-1 πρωτεάση.

Ανάλυση ομάδων δομών (clustering). Το επόμενο βήμα ήταν η ανάλυση των διαμορφώσεων του φαρμάκου μέσα στην κοιλότητα του ενζύμου για όλα τα σύμπλοκα. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των υπολογισμών ήταν η παρουσία μιας αντιπροσωπευτικής διαμόρφωσης της σακουιναβίρης σε όλα τα σύμπλοκα (Εικόνα 5.4). Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το φάρμακο υιοθετεί μια συγκεκριμένη διαμόρφωση κατά την πρόσδεση έτσι ώστε να διευκολύνει συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις με την πρωτεάση.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.4 (κόκκινο), η σακουιναβίρη στην wt HIV-1 πρωτεάση παίρνει μια ελαφρά «κυρτή» διαμόρφωση. Είναι εμφανές από την Εικόνα ότι η αντιπροσωπευτική διαμόρφωσή της είναι παραπλήσια με την κρυσταλλική δομή του φαρμάκου (rmsd 0,41 Å, Πίνακας 5.1). Παρόμοια χαρακτηριστικά έχει και η αντιπροσωπευτική διαμόρφωση του αναστολέα στο μεταλλαγμένο στέλεχος G73S, καθώς προσιδιάζει στην αντίστοιχη δομή της wt HIV-1 πρωτεάσης (Εικόνα 5.4, απαλό πράσινο) με συγκριτικό rmsd 1,73 Å. Μικρή διαφορά υπάρχει και μεταξύ των αντιπροσωπευτικών δομών της σακουιναβίρης στην wt HIV-1 πρωτεάση και στα στελέχη I84V (Εικ. 5.4 πορτοκαλί) και L10I (Εικ. 5.4 σκούρο πράσινο), με rmsd 1,29 και 1,67 Å, αντίστοιχα. Η σύγκριση των διαφορετικών διαμορφώσεων του φαρμάκου, έδειξε πως η μεγαλύτερη διαφορά εμφανίζεται στο στέλεχος V82A (rmsd 4,21 Å). Στο συγκεκριμένο σύμπλοκο ο αναστολέας παρουσιάζει μια πιο ανοιχτή διαμόρφωση (Εικ. 5.4 μωβ). Παρόμοια διαμόρφωση υπάρχει και στα στελέχη L63P (Εικ. 5.4 κίτρινο) και A71V (Εικ. 5.4 τρκουάζ) με διαφορά rmsd 4,0 Å (Πίνακας 5.1). Η παρατηρούμενη διαμόρφωση της σακουιναβίρης στο στέλεχος A71V μπορεί να εξηγήσει τη συνολική αλλαγή που παρατηρείται στις τιμές rmsd για το φάρμακο στην Εικόνα 5.3β. Η σχετική σταθερότητα της σακουιναβίρης μέσα στην κοιλότητα της πρωτεάσης, σε όλες τις περιπτώσεις, καταδεικνύει την επίδραση που

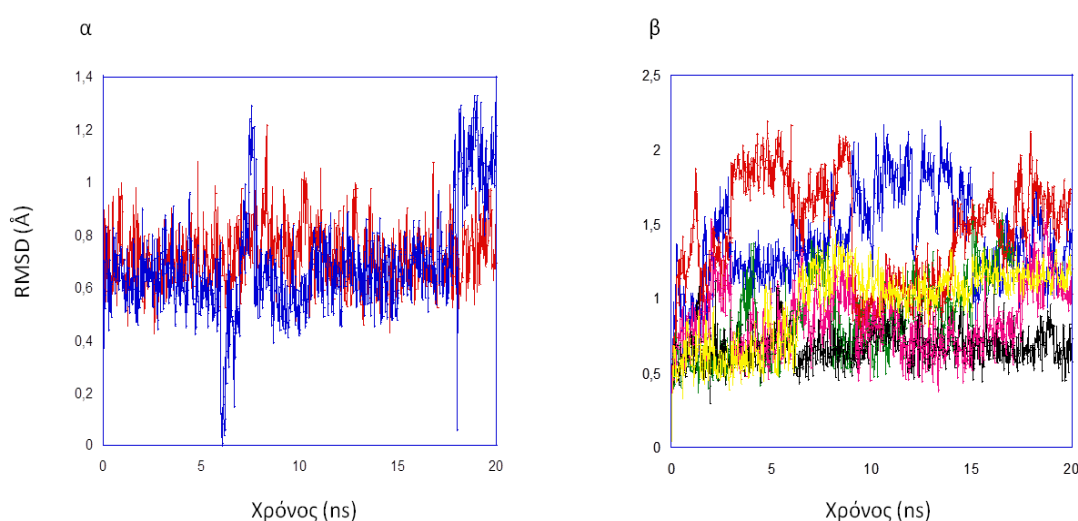
μπορεί να έχει στην πρόσδεση καθώς και στο μηχανισμό αναστολής του ενζύμου.



Εικόνα 5.4: Αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις της σακουιναβίρης στο ενεργό κέντρο της HIV-1 πρωτεάσης. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζεται η διαμόρφωση στην wt HIV-1 πρωτεάση και σε υπέρθεση οι αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις του φαρμάκου στις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες. Η κρυσταλλική δομή της σακουιναβίρης παρουσιάζεται με μαύρο χρώμα.

Διαμορφωτική ανάλυση της περιοχής των πτερυγίων. Διάφορες πειραματικές και θεωρητικές μελέτες έχουν συνδέσει την πρόσδεση ενός μορίου στην πρωτεάση με διαμορφωτικές αλλαγές που παρατηρούνται στην περιοχή των πτερυγίων.^{67,69} Η εν λόγω περιοχή του ενζύμου ορίζεται από τα αμινοξέα 44-55 και 44'-55' και έχει συνδεθεί με την είσοδο και παγίδευση των προσδετών στο καταλυτικό κέντρο της πρωτεΐνης.

Στην Εικόνα 5.5 παρουσιάζονται οι διακυμάνσεις rmsd για τη συγκεκριμένη περιοχή, κατά τη διάρκεια των προσομοιώσεων. Στο σημείο αυτό τονίζεται ότι από όλες τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες που έχουν μελετηθεί, μόνο το στέλεχος G48V περιλαμβάνει μεταλλάξεις στη συγκεκριμένη περιοχή. Συγκεκριμένα, το αμινοξύ στη θέση 48/48' βρίσκεται πολύ κοντά στην κορυφή των πτερυγίων. Συνεπώς, οι μεταλλάξεις στη συγκεκριμένη θέση μπορεί να επηρεάσουν άμεσα την πρωτεάση. Η ανάλυση των δεδομένων της ΜΔ για το G48V σε σύγκριση με τη wt HIV-1 πρωτεάσης παρουσιάζει μικρές δομικές αλλαγές στα πτερύγια (Εικόνα 5.5α). Υπάρχουν μελέτες που προτείνουν ότι η αλλαγή από τη Gly στην περισσότερο υδροφοβική Val μπορεί να δημιουργήσουν συγκεκριμένες διαμορφωτικές αλλαγές στην κορυφή των πτερυγίων (Ile50/50').^{212,213} Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι η κορυφή του πτερυγίου στο στέλεχος G48V εμφανίζει μια μικρή σπείρα (curl) με αποτέλεσμα να εμποδίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πτερυγίων.

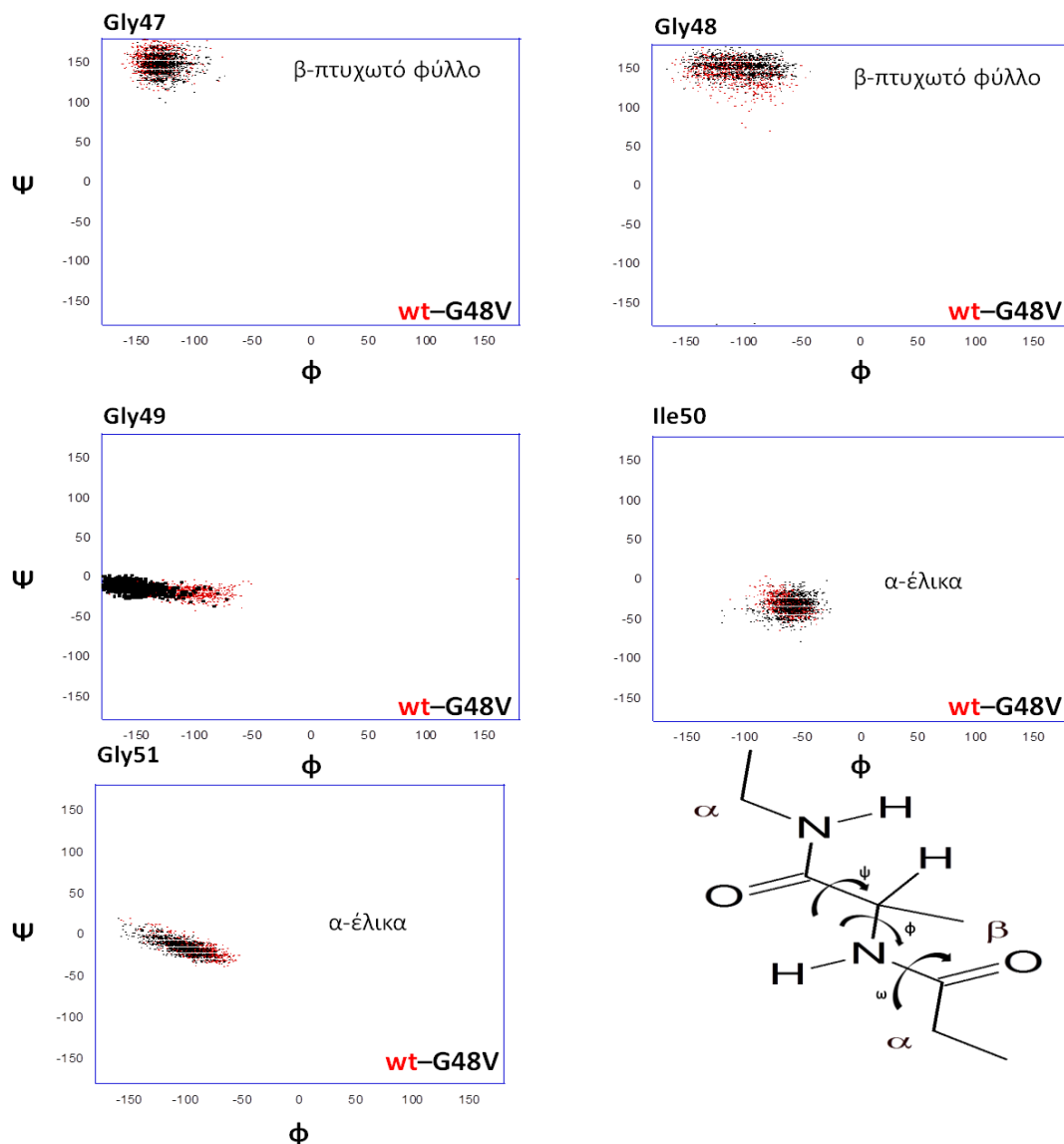


Εικόνα 5.5: Τιμές rmsd των ατόμων άνθρακα Ca για την περιοχή των πτερυγίων (αμινοξέα 44-55 και 44'-55'), σε σχέση με την αρχική δομή: (α) wt

(μπλε) και στελέχη G48V (κόκκινο) (β) L63P (μπλε), A71V (κόκκινο), V82A (πράσινο), G73S (μαύρο), I84V (μωβ) και L10I (κίτρινο).

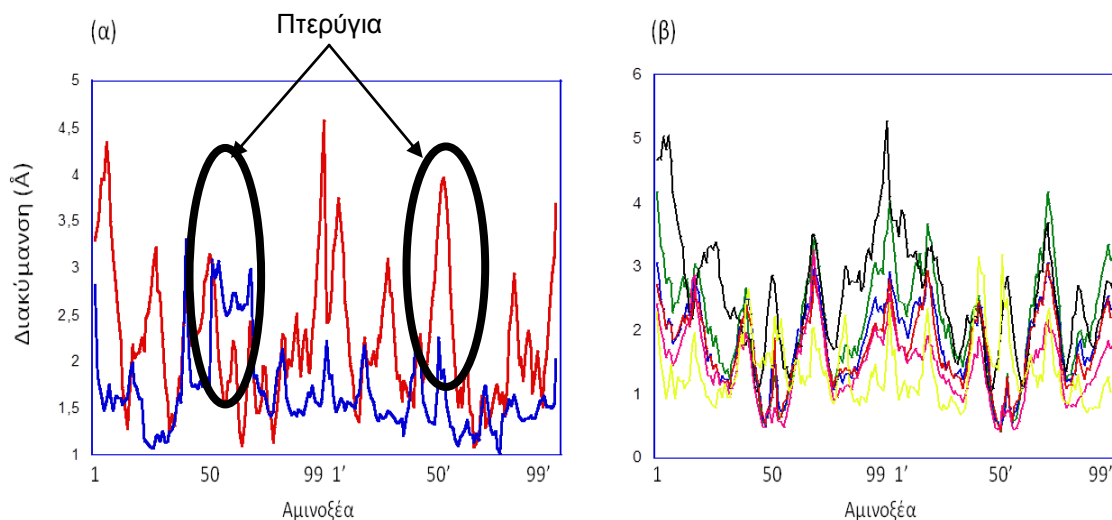
Αυτή η συμπεριφορά δεν παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση καθώς τα γραφήματα Ramachandran (γωνίες φ και ψ) για τα αμινοξέα 47-51 έδειξαν μικρές αλλαγές μεταξύ της wt HIV-1 πρωτεάσης και του στελέχους G48V (Εικόνα 5.6). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.6 η μοναδική εξαίρεση παρατηρείται στη Gly49 (γωνία φ). Ειδικά παρατηρείται ότι η γωνία φ στο μεταλλαγμένο στέλεχος παρουσιάζει μια μικρή απόκλιση από την α-έλικα που εμφανίζεται στη δομή της wt πρωτεάσης. Όμως οι διακυμάνσεις των ατόμων Ca για τα αμινοξέα της wt πρωτεάσης και του στελέχους G48V (Εικόνα 5.7α) καταδεικνύουν ότι τα πτερύγια έχουν μεγαλύτερη κινητικότητα στη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να υποδηλώνει την έλλειψη σημαντικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πτερυγίων στο στέλεχος G48V και κατ' επέκταση να επηρεάζει την πρόσδεση της σακουιναβίρης στην κοιλότητα.

Κατ' αντιστοιχία, μελετήθηκε η περιοχή των πτερυγίων και στις άλλες μεταλλαγμένες πρωτεάσες. Σε όλα παρατηρήθηκε ότι οι διακυμάνσεις των τιμών rmsd των πτερυγίων ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με το στέλεχος wt της πρωτεάσης (Εικόνα 5.5β). Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το στέλεχος G73S το οποίο εμφανίζει τιμές rmsd παρόμοιες με τη wt μορφή του ενζύμου. Οι μεγαλύτερες αλλαγές παρατηρούνται στα στελέχη L63P και A71V. Σε αυτές τις δύο πρωτεΐνες οι τιμές rmsd των πτερυγίων φτάνουν μέχρι τα 2 Å σε σχέση με την αρχική τους διαμόρφωση. Επίσης παρατηρείται ότι κατά διαστήματα οι τιμές κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα, γεγονός που καταδεικνύει την πιθανή εναλλαγή μεταξύ «κλειστής» και «ημι-ανοιχτής» διαμόρφωσης της πρωτεάσης κατά την προσομοίωση. Όμως οι αντίστοιχες διακυμάνσεις των ατόμων άνθρακα Ca δεν είναι μεγάλες στα διάφορα μεταλλαγμένα στελέχη (Εικόνα 5.7β) και παρουσιάζουν ομοιότητες με τις αντίστοιχες της wt πρωτεάσης. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι τα πτερύγια της πρωτεΐνης παρ' όλες τις διαμορφωτικές αλλαγές τους παραμένουν σχετικά σταθερά κατά την προσομοίωση της ΜΔ.



Εικόνα 5.6: Γραφήματα Ramachandran (γωνίες ϕ και ψ) για τα αμινοξέα 47-51 στη wt πρωτεάση (κόκκινο) και στο στέλεχος G48V (μαύρο) των συμπλόκων με τη σακουιναβίρη. Κάτω δεξιά παρουσιάζονται οι γωνίες ϕ , ψ και ω στο σκελετό ενός πεπτιδίου.

Κατά την ανάλυση, παρατηρήθηκε ότι η περιοχή του ενζύμου που αποτελείται από τα αμινοξέα 80-99 και 1'-20' εμφανίζει αυξημένη κινητικότητα στα περισσότερα σύμπλοκα της πρωτεάσης. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα βρίσκονται στο σημείο επαφής των δύο μονομερών της πρωτεΐνης. Αρκετές από τις μεταλλάξεις που εξετάζονται είναι κοντά σε αυτήν την περιοχή. Συνεπώς, οποιαδήποτε αλλαγή σε αυτά τα αμινοξέα μπορεί να επηρεάσει τη σταθερότητα του ενζύμου (διμερές βλ. Εισαγωγή) και κατ' επέκταση τη λειτουργία του.



Εικόνα 5.7: Διακυμάνσεις ατόμων άνθρακα Ca για τα αμινοξέα της HIV-1 πρωτεάσης στα σύμπλοκα: (α) wt (μπλε) και στα στελέχη G48V (κόκκινο) (β) L63P (μπλε), A71V (κόκκινο), V82A (πράσινο), G73S (μαύρο), I84V (μωβ) και L10I (κίτρινο).

Είναι χαρακτηριστικό πως ενώ οι μεταλλάξεις G48V, G73S και L10I δεν επιφέρουν σημαντικές δομικές αλλαγές στην περιοχή των πτερυγίων (Εικόνα 5.5), οι διακυμάνσεις τον ατόμων άνθρακα Ca για τα αμινοξέα Ile50/50' είναι μεγαλύτερες σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες μεταλλάξεις. Η ανάλυση έδειξε επίσης, ότι στα στελέχη I84V και G73S, τόσο η σακουιναβίρη όσο και τα πτερύγια της πρωτεάσης εμφανίζουν παρόμοια διαμορφωτική συμπεριφορά (Εικόνες 4.3 και 5.5). Αυτό σημαίνει πως οι μεταλλάξεις στις θέσεις 73 και 84 δεν οδηγούν σε σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές στο ένζυμο.

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ της σακουιναβίρης και της πρωτεάσης. Το αμέσως επόμενο βήμα στην ανάλυση είναι ο έλεγχος των αλληλεπιδράσεων στα διαφορετικά σύμπλοκα. Η παρουσία ή απουσία ΔΥ μεταξύ φαρμάκου και πρωτεάσης προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τις αλλαγές που επιτελούνται από τις διάφορες μεταλλάξεις καθώς και για τη συμπεριφορά της σακουιναβίρης. Από την ανάλυση της προσομοίωσης της ΜΔ στη wt μορφή της πρωτεάσης παρατηρούμε το σχηματισμό 7 ΔΥ με τη σακουιναβίρη (Πίνακας 5.3 και Εικόνα 5.8α). Η «κυρτή» δομή της σακουιναβίρης (Εικ. 5.4, κόκκινο) ευνοεί το σχηματισμό ΔΥ με τη Gly48' στα πτερύγια της πρωτεάσης καθώς και με την Arg8 και τα δύο ασπαρτικά οξέα (Asp25/25') στο ενεργό κέντρο. Η ύπαρξη αυτών των αλληλεπιδράσεων συμβάλλει στη

σταθεροποίηση της σακουιναβίρης στην κοιλότητα του ενζύμου. Ο ΔΥ με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίζεται με τη Gly48' (81%: ποσοστό που δηλώνει την παρουσία του ΔΥ στη ΜΔ) και ακολουθείται από το δεσμό με το Asp25 (58%).

Η επιπλέον παρουσία τριών ΔΥ με το καταλυτικό ασπαρτικό οξύ στη θέση 25' μπορεί να εξηγήσει την ύπαρξη μιας μόνο αντιπροσωπευτικής δομής της σακουιναβίρης στη wt πρωτεάση (Εικόνα 5.8α, κόκκινο). Επίσης ο δεσμός υδρογόνου με την Arg8 (29%) ενδυναμώνει περαιτέρω την αλληλεπίδραση του φαρμάκου μέσα στην κοιλότητα του ενζύμου. Τέλος ο ΔΥ με τη Gly48' επιτείνει την ορθότητα της άποψης ότι τα πτερύγια της πρωτεάσης συμβάλλουν στην παγίδευση του αναστολέα.^{67,69}

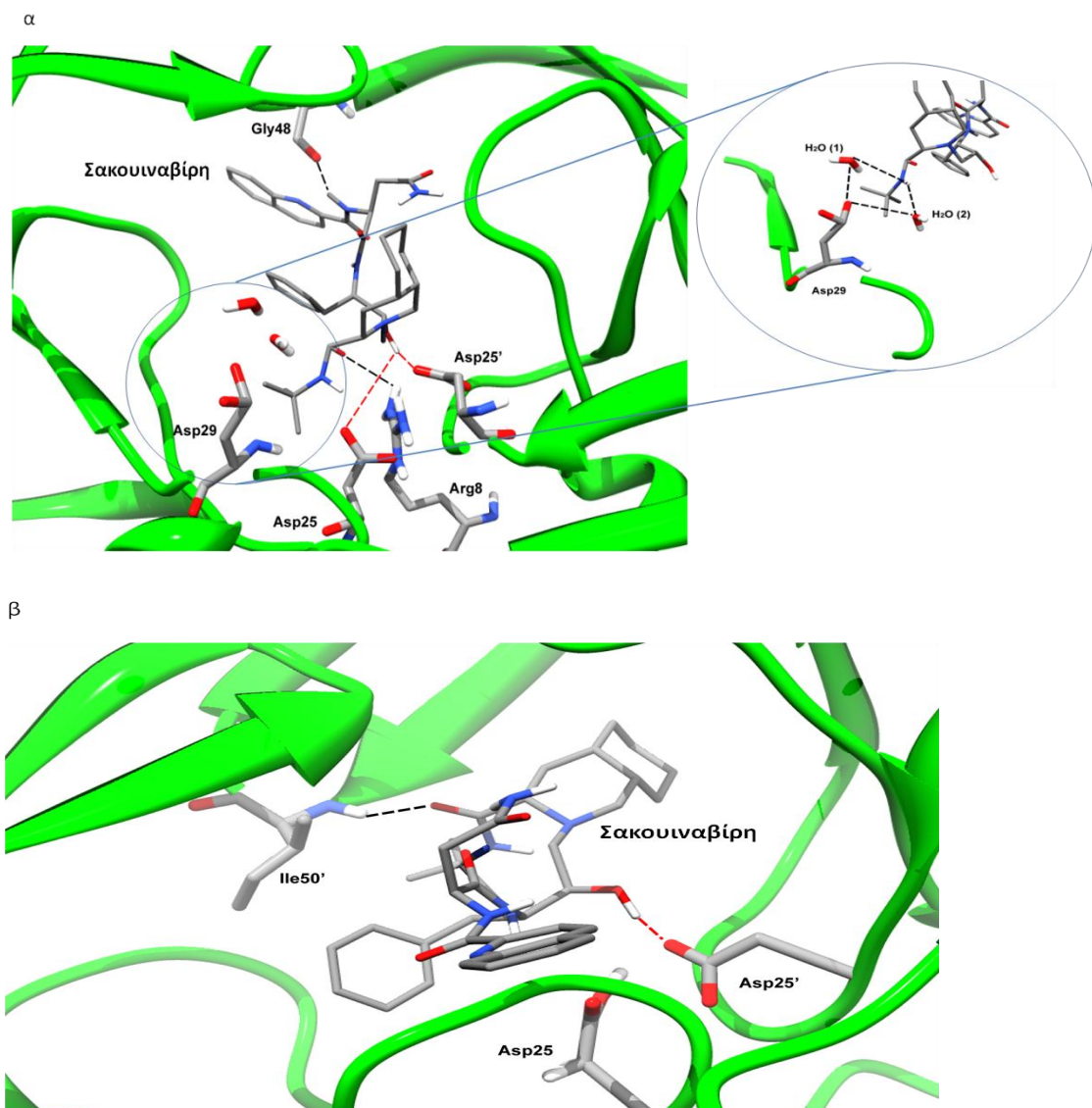
Σημειώνουμε την αλληλεπίδραση της σακουιναβίρης με 5 μόρια νερού μέσα στην κοιλότητα. Από τις πέντε αυτές αλληλεπιδράσεις, δύο έχουν ιδιαίτερη σημασία (Πίνακας 5.3). Τα δύο αυτά μόρια νερού δημιουργούν μια γέφυρα, μέσω ΔΥ, μεταξύ του αναστολέα και του Asp29 κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 5.8α-ένθετο). Η αλληλεπίδραση του νερού με τη σακουιναβίρη και την πρωτεΐνη μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό πρόσδεσης στην πρωτεάση. Σε σύγκριση με τη wt, στη μεταλλαγμένη μορφή G48V οι ΔΥ είναι εμφανώς λιγότεροι (μόνο 3) όπως παριστάνεται στον Πίνακα 5.3 και στην Εικόνα 5.8β. Όπως και προηγουμένως, υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της σακουιναβίρης και αμινοξέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η σακουιναβίρη δημιουργεί ένα διπλό ΔΥ με το Asp25' (παρουσία 30% και 15%). Αντιθέτως η αλληλεπίδραση σακουιναβίρης-Gly48', που παρατηρείται στο σύμπλοκο με το στέλεχος wt έχει αντικατασταθεί με το ΔΥ μεταξύ φαρμάκου και του αμινοξέος Ile50' (56%) στα πτερύγια. Στο στέλεχος της πρωτεάσης G48V, η μετάλλαξη από τη Gly στην περισσότερο υδροφοβική Val προκαλεί την απώλεια συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στον αναστολέα και το ένζυμο²¹⁴: ο ΔΥ φαρμάκου-Ile50' δεν είναι τόσο κυρίαρχος όσο ο ΔΥ φαρμάκου-Gly48' στην πρωτεάση wt. Αυτή η αλλαγή μπορεί να επηρεάζει τη σταθερότητα της περιοχής των πτερυγίων και συνεπώς να οδηγεί σε μείωση της αποτελεσματικότητας της πρόσδεσης της σακουιναβίρης στο ένζυμο.¹³⁹

Πίνακας 5.3: ΔΥ και Π-αλληλεπιδράσεις* στα διάφορα σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης.

	Αλληλεπιδράσεις	Παρ. ^β (%)		Αλληλεπιδράσεις	Παρ. ^β (%)
wt	Gly48' O ^α -Saq N37 H37a	81	G73S	Asp25 OD2/OD1-Saq O20 H20a	88/39
	Asp25 OD1-Saq O20 H20a	58		Gly48' O-Saq N37 H37a	60
	Arg8 N2 H2-Saq O7	29		Asp30' OD2-Saq N36 H36a	30
	Arg8 NE HE-Saq O7	28		Thr26 OG1-Saq N37 H37a	11
	Asp25' OD2/OD1-Saq O80 H20a	29/21		Asp29 N H-Νερό1-Saq N5 H5a	28
	Asp25' OD1-Saq N22 H22a	15		Asp29 N H-Νερό2-Saq N5 H5a	27
	Asp29 N H-Νερό1-Saq N5 H5a	27		Asp29 N H-Νερό3-Saq N5 H5a	25
	Asp29 N H-Νερό2-Saq N5 H5a	12		Asp29 N H-Νερό4-Saq N22 H22a	14
G48V	Ile50' N H ^α -Saq O7	56	V82A	Asp29' N H-Saq O7	100
	Asp25' OD2/OD1-Saq O20 H20a	30/15		Asp25' OD1-Saq O20 H20a	100
L63P	Arg8' NH1 H11/H12-Saq O5	21/15	I84V	Thr80' OG1-Saq N36 H36a	12
	Thr26 O-Saq N36 H36a	20		Asp29' O-Saq N37 H37a	61
	Asp25' OD2-Saq N36 H36b	19		Asp29 N H-Saq O35	30
	Asp30 N H-Saq π-Αρ.*	13		Thr80' O-Saq N36 H36a	24
A71V	Asp25 OD2-Νερό-Saq N36 H36b	19	L10I	Asp29' O-Saq N36 H36a	89
	Asp25' OD2-Saq N36 H36a	88		Asp29' N H-Saq O35	63
	Asp30 N H-Saq π-Αρ.*	17		Met46' O-Saq N37 H37a	42
	Asp29' N H-Saq N5	13		Asp25 OD2/OD1-Saq O20 H20a	33/23
	Thr26 N H-Saq N5	11		Asp29 N H-Νερό1-Saq N22 H22a	27
	Ile50' N H-Νερό1-Saq N2 2H22a	36		Asp29 N H-Νερό2-Saq N22 H22a	16
	Asp29 N H-Νερό2-Saq N36 H36b	12			

^αN και O αναφέρονται σε άτομα αζώτου και καρβονυλικά οξυγόνα του κορμού της αλυσίδας της πρωτεάσης, OD1 και OD2 είναι ισοδύναμα καρβοξυλικά οξυγόνα (με εξαίρεση: στο Asp25, όπου το OD1 είναι από-πρωτονιομένο και το OD2 είναι πρωτονιομένο). Στην Arg, NE και N2 υποδηλώνουν το ε-άζωτο και το τερματικό άζωτο την ομάδα γουανιδίνης, αντίστοιχα.

^βΠαρουσία: Επί τοις εκατό ποσοστό του χρόνου προσομοίωσης όπου εμφανίζεται η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση. Αλληλεπιδράσεις με ποσοστό μικρότερο του 10% παρελήφθησαν.



Εικόνα 5.8: Κύριοι ΔΥ ανάμεσα στη σακουιναβίρη στα σύμπλοκα: (α) με την wt HIV-1 πρωτεάση και (β) με το στέλεχος G48V. Οι κόκκινες διακεκομμένες γραμμές παρουσιάζουν τους ΔΥ με τα καταλυτικά αμινοξέα Asp25/25'.

Το αποτέλεσμα της μείωσης των αλληλεπιδράσεων και της διαμορφωτικής σταθερότητας στο στέλεχος G48V, σε σχέση με τη wt πρωτεάση, μπορεί να εξηγήσει γιατί η συγκεκριμένη μετάλλαξη προσδίδει αντίσταση στη σακουιναβίρη καθώς και σε άλλους αναστολείς (πχ ριτοναβίρη και αταζαναβίρη).^{211,212}

Σε σύγκριση και με τις υπόλοιπες μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, η G48V έχει τους λιγότερους ΔΥ. Αυτό ίσως σημαίνει ότι εκτός των αλλαγών που μπορεί να παρουσιάζονται στα πτερύγια, μπορεί επίσης να διαταράσσει και τις

αλληλεπιδράσεις μέσα στην κοιλότητα πρόσδεσης. Είναι χαρακτηριστικό ότι στο συγκεκριμένο στέλεχος δεν εμφανίζονται δεσμοί με τη διαμεσολάβηση μορίων νερού. Ένα γενικό χαρακτηριστικό όλων των μεταλλάξεων αποτελεί η σταθερή μείωση των ΔΥ σε σχέση με την wt πρωτεΐνη. Το πιο εντυπωσιακό γνώρισμα στα στελέχη L63P, V82A, A71V και I84V είναι η απουσία ΔΥ μεταξύ σακουιναβίρης και πτερυγίων (Πίνακας 5.3). Αυτό συνεπάγεται πως στα μεταλλαγμένα στελέχη είναι λιγότερο ικανοποιητική η πρόσδεση σε σχέση με το στέλεχος wt. Επίσης η έλλειψη αλληλεπιδράσεων με τα πτερύγια μπορεί μερικώς να επηρεάζει, την ενέργεια πρόσδεσης της σακουιναβίρης στην πρωτεΐνη καθώς και τη σταθερότητα (αυξημένες τιμές rmsd) των πτερυγίων (Πίνακας 5.2) σε σχέση με τη wt μορφή. Συγκεκριμένα στο στέλεχος L63P, η σακουιναβίρη αλληλεπιδρά μόνο με αμινοξέα στο ενεργό κέντρο ή κοντά σε αυτό (Thr26, Asp25', Asp30 και Arg8'). Η- αλληλεπίδραση με το Asp30 γίνεται μέσω του αρωματικού δακτυλίου (π-αλληλεπίδραση) του φαρμάκου. Παρόμοια αλληλεπίδραση παρατηρείται και στο στέλεχος A71V.

Ήδη προαναφέρθηκε ο ρόλος του νερού κατά την πρόσδεση του αναστολέα.²¹⁵ Όπως φαίνεται και σε άλλες μελέτες, εκτός από την πρόσδεση του αναστολέα, το νερό μπορεί να έχει ενεργό ρόλο και στο μηχανισμό δράσης της πρωτεάσης.^{63,77} Επόμενο είναι να ελεγχθεί η εμφάνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεάσης– νερού– σακουιναβίρης και στα υπόλοιπα σύμπλοκα. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι αυτού του τύπου δεσμοί εμφανίζονται μόνο στα στελέχη A71V, G73S, L63P και L10I και πως δημιουργούνται στην περιοχή του ενεργού κέντρου (Asp25/29). Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μεταλλαγμένες πρωτεάσες, στη V82A δημιουργούνται δύο ΔΥ με τα ασπαρτικά οξέα στις θέσεις 25' και 29' με παρουσία καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης (Πίνακας 5.3). Αυτή η αλληλεπίδραση συμβάλλει στην καλύτερη τοποθέτηση του αναστολέα μέσα στην κοιλότητα και δικαιολογεί προηγούμενες εργασίες που δεν χαρακτηρίζουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη σημαντική όσον αφορά τη σακουιναβίρη.²¹⁶

Το γενικό χαρακτηριστικό σε όλα τα σύμπλοκα είναι πως οι αλληλεπιδράσεις γίνονται με αμινοξέα κοντά ή και στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης. Επίσης ένα άλλο κοινό σημείο με τη wt μορφή της πρωτεΐνης είναι οι ΔΥ μεταξύ της σακουιναβίρης και των αμινοξέων Asp25/25' και

Thr26/26' στα στελέχη L10I, A71V και G73S. Στα L10I και G73S παρατηρείται ένας ΔΥ με τη Gly48'. Αν και στο στέλεχος A71V αυτός ο ΔΥ λείπει, υπάρχει μια αλληλεπίδραση μεταξύ του αμινοξέος Ile50'-νερού-σακουιναβίρης. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις καταδεικνύουν την συμβολή των αμινοξέων του ενεργού κέντρου και των πτερυγίων στην αποτελεσματική πρόσδεση του φαρμάκου και κατ' επέκταση την επιτυχή ανασταλτική δράση του.

Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πτερυγίων. Η σημαντική επίδραση της συγκεκριμένης περιοχής στην πρόσδεση ενός φαρμάκου επιτάσσει την ανάλυση των συνεπειών που μπορεί να έχουν διάφορες μεταλλάξεις ¹⁴¹. Επόμενο είναι να επικεντρωθούμε στις αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ των πτερυγίων της πρωτεάσης και πιο συγκεκριμένα στο στέλεχος G48V. Σκοπός είναι να κατανοηθούν τα διαμορφωτικά χαρακτηριστικά της περιοχής των πτερυγίων, ειδικά στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν μεταλλάξεις στα αμινοξέα που την αποτελούν (πχ Gly48/48'). Έχει ήδη αναφερθεί ότι η μετάλλαξη από Gly σε Val στη θέση 48/48' αποτελεί μια από τις κύριες μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στη σακουιναβίρη.²¹¹ Στον Πίνακα 5.4 παρουσιάζονται οι διαφορές στους ΔΥ μεταξύ των πτερυγίων για της πρωτεάσης wt και το στέλεχος G48V. Παρατηρείται ότι στη φυσιολογική μορφή της πρωτεάσης υπάρχει ένα μεγαλύτερο δίκτυο δεσμών μεταξύ των δύο πτερυγίων της πρωτεάσης σε σχέση με το μεταλλαγμένο στέλεχος G48V.

Ένα από τα σημαντικότερα δομικά στοιχεία στη φυσιολογική πρωτεάση αποτελεί η ύπαρξη ενός μορίου νερού μεταξύ των πτερυγίων. Το μόριο αυτό λειτουργεί ως γέφυρα αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων Ile50 και Ile50' (Πίνακας 5.4). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από άλλες ερευνητικές εργασίες στις οποίες έχει μελετηθεί ο ρόλος του νερού σε διαφορετικά σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης.^{79,217,218} Η μετάλλαξη από Gly σε Val στη θέση 48, ελαττώνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πτερυγίων. Για παράδειγμα, στο σύμπλοκο wt–σακουιναβίρης ο ΔΥ μεταξύ Ile50-Ile50' έχει ποσοστό 76% κατά την προσομοίωση της ΜΔ, στο σύμπλοκο G48V–σακουιναβίρης η αντίστοιχη αλληλεπίδραση είναι απύσχα. Μπορεί, λοιπόν, να

γίνει η υπόθεση ότι η συγκεκριμένη αντικατάσταση προκαλεί διαμορφωτικές αλλαγές στην περιοχή των πτερυγίων.

Πίνακας 5.4: ΔΥ μεταξύ των πτερυγίων στα σύμπλοκα wt και G48V με τη σακουιναβίρη.

Αμινοξύ 1	Αμινοξύ 2	wt	(%)	G48V
Ile50'	Ile50	76		-
Ile50'	Gly52	31/14		-
Ile50	Gly51'	-		42
Ile50–νερό–Ile50'		25		-

Η Val είναι περισσότερο υδροφοβική από τη Gly με αποτέλεσμα να οδηγεί σε διαμορφωτικές αλλαγές στα γειτονικά αμινοξέα και κατ' επέκταση να επηρεάζει την πρόσδεση του φαρμάκου. Παρόμοιες παρατηρήσεις για τα πτερύγια έχουν γίνει από πειραματικές μελέτες στη διπλά μεταλλαγμένη πρωτεάση G48V/L90M.²¹⁴ Από την κρυσταλλική δομή του στελέχους G48V/L90M μπορούν να αντληθούν πληροφορίες για το ρόλο της Gly48: συγκεκριμένα παρατηρείται πως η μετάλλαξη σε Val οδηγεί σε σημαντικές απώλειες στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ σακουιναβίρης και πρωτεάσης.²¹² Παράλληλα, η μετάλλαξη G48V επηρεάζει όπως προαναφέρθηκε, και τους άλλους ΔΥ ανάμεσα στα πτερύγια. Εκτός από την εξάλειψη της αλληλεπίδρασης Ile50' και Ile50, εξαλείφονται και οι ΔΥ μεταξύ Ile50' και Gly52 (Πίνακας 5.4). Γενικά, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.3, η σακουιναβίρη εμφανίζει λιγότερες αλληλεπιδράσεις (σε σχέση με τη φυσιολογική πρωτεάση) με τα πτερύγια. Μάλιστα ο ΔΥ με το αμινοξύ Ile50' στο στέλεχος G48V έχει παρουσία μόνο στο 56% της προσομοίωσης της ΜΔ. Αντίθετα στη φυσιολογική πρωτεάση ο δεσμός της σακουιναβίρης με τη Gly48' (στα πτερύγια) εμφανίζεται στο 86% της προσομοίωσης. Αυτή η διαφοροποίηση στις αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου στα δύο σύμπλοκα είναι πιθανό να οδήγησε σε ανακατατάξεις στις αλληλεπιδράσεις στα πτερύγια. Ο ΔΥ Ile50'–Ile50 (76%) στη φυσιολογική πρωτεάση αντικαθίσταται με το ΔΥ μεταξύ των

αμινοξέων Ile50 και Gly51' στο στέλεχος G48V, ο οποίος εμφανίζεται μόνο στο 42% της προσομοίωσης ΜΔ (Πίνακας 5.4).

Αναμένεται λοιπόν, τα ιικά στελέχη που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη να εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στη σακουιναβίρη. Οι διαμορφωτικές επιπτώσεις της μετάλλαξης στη θέση 48 φαίνονται και στις διακυμάνσεις των ατόμων Ca για τα αμινοξέα των πτερυγίων στην Εικόνα 5.7. Οι δομικές αλλαγές στη μορφή G48V καθώς και η εξάλειψη διαφορετικών αλληλεπιδράσεων, αυξάνει την κινητικότητα των πτερυγίων όπως φαίνεται στην εικόνα (κόκκινο χρώμα).

Ανάλυση των χαρακτηριστικών της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης. Για τη σύγκριση των διαφορετικών μεταλλάξεων και των επιπτώσεων τους στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης της σακουιναβίρης, χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι MM-PBSA και TI. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5.

Οι υπολογισμοί της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, επιβεβαιώνουν την επίδραση της μετάλλαξης G48V στην πρόσδεση της σακουιναβίρης στο ένζυμο σε σχέση με τη φυσιολογική πρωτεάση ($\Delta\Delta G_{MM-PBSA} = 1,15$ kcal/mol). Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα για τις μεταλλάξεις I84V και L63P, οι οποίες μειώνουν την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης κατά 1,35 kcal/mol. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις υπάρχουν αλλαγές από αμινοξέα με μακρές πλευρικές αλυσίδες (Ile και Leu) σε αμινοξέα με μικρότερες (Val) ή με άκαμπτες πλευρικές ομάδες (Pro). Η Ile84 βρίσκεται μέσα στην κοιλότητα πρόσδεσης του ενζύμου και παρατηρείται ότι η αλλαγή με τη Val, που έχει μικρότερη αλυσίδα μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια αρκετών ΔΥ (Πίνακας 5.3). Κατά συνέπεια ο αναστολέας δε θα μπορεί να προσδεθεί ικανοποιητικά στην κοιλότητα του ενζύμου. Στην περίπτωση της μετάλλαξης L63P, το αμινοξύ δεν έχει άμεση επαφή με κοιλότητα. Αποτελεί όμως τμήμα μιας β-πτυχωτής δομής (Εικόνα 5.1) που στηρίζει την περιοχή των πτερυγίων της πρωτεάσης. Συνεπώς οποιαδήποτε αλλαγή στην περιοχή αυτή, πιθανόν να επηρεάσει τη δομή των πτερυγίων και εμμέσως την πρόσδεση του αναστολέα.

Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα των υπολογισμών MM–PBSA και TI για τα σύμπλοκα της σακουιναβίρης με τα στελέχη L10I, G48V, L63P, A71V, G73S και I84V της HIV-1 πρωτεάσης.

Ενέργεια (kcal/mol)	Σακουιναβίρη–HIV-1 πρωτεάση							
	wt	L63P	V82A	G48V	A71V	G73S	I84V	L10I
ΔE_{elec}	-48.35	-45.18	-43.80	-45.54	-47.51	-46.53	-45.04	-47.45
ΔE_{vdw}	-52.18	-49.47	-54.23	-55.22	-50.67	-52.74	-55.69	-51.89
ΔE_{MM}	-100.53	-94.65	-98.03	-100.76	-98.18	-99.27	-100.73	-99.34
ΔG_{NP}	-9.35	-9.65	-9.04	-10.01	-8.74	-10.12	-9.77	-9.80
ΔG_{ele}	74.29	71.27	70.51	75.18	71.47	74.87	74.24	72.97
ΔG_{solv}	64.94	61.62	61.46	65.17	62.73	64.75	64.47	63.17
$\Delta H_{(MM+solv)}$	-35.59	-33.03	-36.63	-35.59	-35.45	-34.52	-36.26	-36.17
$-T\Delta S_{tot}$	23.34	22.14	24.87	24.49	23.41	22.70	25.36	24.64
$\Delta G_{προσδ.}^{PB}$	-12.25	-10.89	-11.76	-11.10	-12.04	-11.82	-10.90	-11.53
K_i (nM) ^α	2.5	21	5.1	14.5	3.2	4.6	20.6	7.4
$\Delta\Delta G_{TI}$				0.28				
$\Delta\Delta G_{MMPBSA}$		1.36	0.49	1.15	0.21	0.43	1.35	0.72
$\Delta\Delta G_{πειρ.}$				2.65				
K_i πειρ. (nM)	0.42 ^β			36 ^β				

^α Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν με βάση την εξίσωση $\Delta G = RT \ln K_i$.

^β Οι τιμές ελήφθησαν από τη βιβλιογραφική παραπομπή.²¹²

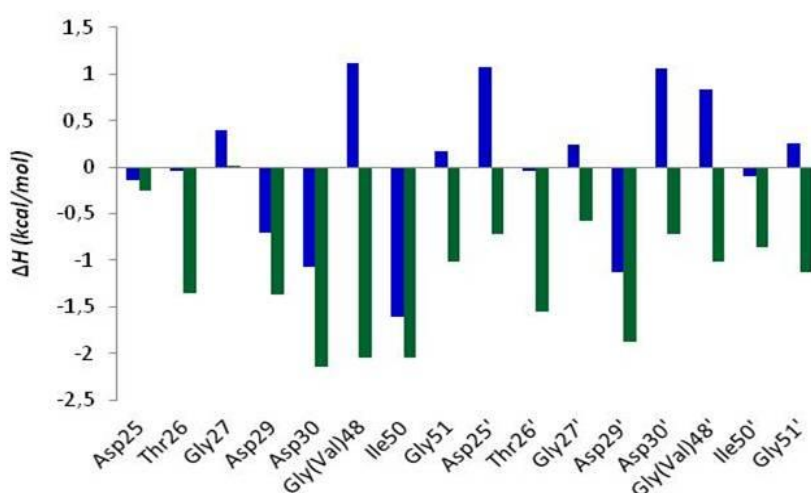
Η μικρότερη επίδραση στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης προέρχεται από τη μετάλλαξη A71V η οποία παρουσιάζει ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης -12,04 kcal/mol ($\Delta\Delta G_{MM-PBSA} = 0,21$ kcal/mol). Αυτή η μικρή διαφορά σε σχέση με τη φυσιολογική πρωτεάση μπορεί να οφείλεται στην ομοιότητα που παρουσιάζουν οι πλευρικές αλυσίδες της Ala και της Val στο μέγεθος και στην υδροφοβικότητα. Παρόμοιες επιπτώσεις έχουν και οι μεταλλάξεις L10I και V82A. Και οι δύο αυτές θέσεις βρίσκονται μέσα στην κοιλότητα πρόσδεσης και επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου. Παρατηρώντας το εκτεταμένο δίκτυο ΔΥ στο σύμπλοκο της φυσιολογικής πρωτεάσης, παρατηρείται η ύπαρξη ΔΥ σε δύο διαφορετικές πλευρές της κοιλότητας – Gly48' (πτερύγια) και Asp25 (ενεργό κέντρο)– που εξηγούν τη μεγάλη επίδραση στην πρόσδεση της σακουιναβίρης (Εικόνα 5.8α). Αυτή η συμπεριφορά στους ΔΥ δεν παρατηρείται σχεδόν καθόλου στις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης του αναστολέα.

Οι μεταλλάξεις (πχ V82A, I84V) που βρίσκονται κοντά στο σημείο σύνδεσης των δύο μονομερών του ενζύμου (δύο α-έλικες που στηρίζουν την κοιλότητα πρόσδεσης–αμινοξέα 84-94/84'-94'-)²⁰⁷ επηρεάζουν τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Επομένως αλλαγές σε αυτές τις περιοχές μπορεί να επιδρούν και στη λειτουργικότητα της πρωτεάσης. Στο στέλεχος V82A, όμως, οι δύο ΔΥ με τα ασπαρτικά οξέα στις θέσεις 25' και 29 εξηγούν τη μικρή διαφορά στη σταθερά πρόσδεσης (K_i) με το στέλεχος wt (2,5 nM και 5,1 nM, αντίστοιχα). Η τιμή αυτή δείχνει τη μικρή επίδραση της συγκεκριμένης μετάλλαξης. Έχει παρατηρηθεί ότι η αλλαγή στη θέση 82 προσφέρει ανθεκτικότητα στη σακουιναβίρη μόνο σε ασθενείς που έχουν λάβει τη θεραπεία για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Μάλιστα η συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν εμφανίζεται μόνη της αλλά ακολουθείται και από μετάλλαξη στη θέση 48 (G48V).^{211,215} Αντίθετα το στέλεχος V82A παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε άλλα φάρμακα, όπως την ιντιναβίρη και τη ριτοναβίρη.²¹⁹

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου MM-PBSA αποτελεί η ανάλυση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης σε επιμέρους συνεισφορές (Πίνακας 5.5). Είναι φανερό ότι οι διαφορετικοί ενεργειακοί όροι είναι παρόμοιοι στα μεταλλαγμένα ένζυμα, με τις συνεισφορές van der Waals να

έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στην $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$ και τις ηλεκτροστατικές συνεισφορές να ακολουθούν. Σημαντική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης παρατηρείται και από τις μη-πολικές αλληλεπιδράσεις (ΔG_{NP}), ιδιαίτερα στα σύμπλοκα G48V και G73S.

Για να κατανοηθεί καλύτερα η διαδικασία πρόσδεσης της σακουιναβίρης και η επίδραση των μεταλλάξεων, μπορεί να υπολογισθεί η συνεισφορά στην ενθαλπία για αμινοξέα που ενδιαφέρουν. Μία τέτοια σύγκριση μεταξύ του συμπλόκου φυσιολογικής πρωτεΐνης– σακουιναβίρης και του στελέχους G48V- σακουιναβίρης παρουσιάζεται στην Εικόνα 5.9.



Εικόνα 5.9: Συνεισφορές στην ΔH αμινοξέων του ενεργού κέντρου και των πτερυγίων για τα σύμπλοκα HIV-1_{wt} πρωτεάσης- σακουιναβίρης (πράσινο) και HIV-1_{G48V} πρωτεάσης- σακουιναβίρης (μπλε).

Το γράφημα εμφανίζει την επίδραση της μετάλλαξης με ενεργειακούς όρους σε σημαντικά αμινοξέα (ενεργό κέντρο και πτερύγια) της πρωτεάσης. Παρατηρείται ότι όλα τα αμινοξέα στη φυσιολογική πρωτεάση έχουν ευνοϊκές συνεισφορές που κυμαίνονται από $-0,1$ έως $-2,3$ kcal/mol. Αντίθετα στο στέλεχος G48V, αμινοξέα στο ενεργό κέντρο (Asp25' και Gly27/27') καθώς και στα πτερύγια (Val48/48' και Gly51/51') δεν έχουν ευνοϊκές συνεισφορές. Μάλιστα τη μεγαλύτερη επίδραση (μη ευνοϊκή) την εμφανίζουν τα μεταλλαγμένα αμινοξέα στις θέσεις 48 και 48'. Επίσης παρατηρείται πως τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο Thr26/26' και Gly27/27', παρόλο που δεν

αλληλεπιδρούν μέσω ΔΥ με τη σακουινάβιρη έχουν ευνοϊκή συνεισφορά κατά την πρόσδεση του στη φυσιολογική πρωτεΐνη. Αντιθέτως, εμφανίζουν πολύ χαμηλή ή και καθόλου ευνοϊκή συνεισφορά στο σύμπλοκο με το στέλεχος G48V. Επιπροσθέτως, στο στέλεχος G48V, παρά την ύπαρξη ΔΥ με το αμινοξύ Asp25' που διατηρείται, η συνεισφορά του συγκεκριμένου αμινοξέος παραμένει μη ευνοϊκή (σε σχέση με τη φυσιολογική πρωτεάση).

Για να ελεγχθούν με μεγαλύτερη ακρίβεια οι αλλαγές στην ενέργεια που οφείλονται στις μεταλλάξεις, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος TI και υπολογίστηκε η σχετική μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ($\Delta\Delta G$) μεταξύ της φυσιολογικής πρωτεάσης και του στελέχους G48V. Η αρνητική ή θετική τιμή του όρου $\Delta\Delta G$ υποδεικνύει αν μια μετάλλαξη έχει ευνοϊκή ή μη ευνοϊκή επίδραση, αντίστοιχα. Για το σύμπλοκο G48V–σακουινάβιρης η τιμή $\Delta\Delta G_{TI}$ είναι 0,28 kcal/mol. Αυτή τη τιμή υποδηλώνει τη μη ευνοϊκή επίδραση της αλλαγής από Gly σε Val στην ενέργεια πρόσδεσης. Σε συνδυασμό με τις προηγούμενες αναλύσεις (διαμορφωτικές αλλαγές, MM-PBSA) γίνεται εμφανής η σημαντική επίδραση των πτερυγίων της πρωτεάσης στο μηχανισμό πρόσδεσης της σακουινάβιρης. Η θεωρητική τιμή $\Delta\Delta G_{TI}$ βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες πειραματικές μελέτες που επίσης υποδεικνύουν τη μη ευνοϊκή επίδραση της μετάλλαξης.^{206,207,212}

5.4 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, οι αναλύσεις της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης σε όλα τα σύμπλοκα κατέδειξαν τη σημαντική αρνητική επίδραση των μεταλλάξεων G48V, L63P και I84V σε σχέση με την φυσιολογική πρωτεάση. Μεταλλάξεις όπως η A71V είχαν πολύ μικρή επίδραση στην πρόσδεση της σακουινάβιρης στο ένζυμο. Μέσα από την ανάλυση διαμορφωτικών αλλαγών και των ενεργειακών μεταβολών παρατηρείται ότι η επίδραση των μεταλλάξεων στην πρόσδεση της σακουινάβιρης οφείλεται:

(α) στο γεγονός πως ορισμένες αλλαγές (G48V, L63P, L10I, G73S) αυξάνουν την κινητικότητα των πτερυγίων με αποτέλεσμα τη αρνητική επίδραση στην πρόσδεση. Η εναλλαγή στα πτερύγια μεταξύ «κλειστής» και «ημι-ανοιχτής» μορφής παρατηρείται σε ορισμένες περιπτώσεις (A71V) χωρίς να επηρεάζεται σημαντικά η πρόσδεση, όσο τα πτερύγια διατηρούν σταθερή διαμόρφωση.

(β) Αλλαγές στη διαμόρφωση της σακουιναβίρης δεν επηρεάζουν σημαντικά την πρόσδεσή της (βλ V82A, A71V) εφόσον η δομή του αναστολέα σταθεροποιείται κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης της ΜΔ. Επίσης ο αναστολέας σε όλα τα σύμπλοκα υιοθετεί συγκεκριμένη διαμόρφωση και επηρεάζει ανάλογα τις αλληλεπιδράσεις με την πρωτεάση.

(γ) Οι αλληλεπιδράσεις της σακουιναβίρης με τα αμινοξέα στην περιοχή του ενεργού κέντρου (Asp25/25'/29/29'/30/30') και των πτερυγίων της πρωτεάσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεσή της. Μάλιστα οι μεταλλάξεις που έχουν σημαντική επίδραση στην ανθεκτικότητα (G48V, L63P, I84V) παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις στην αλληλεπίδραση με τις συγκεκριμένες περιοχές.

(δ) Η σύγκριση των διαφορετικών στελεχών της πρωτεάσης, καταδεικνύει και τη σημασία του νερού στην πρόσδεση του φαρμάκου. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός ΔΥ μεταξύ της σακουιναβίρης, ενός μορίου νερού και του αμινοξέος Asp29 (στο ενεργό κέντρο) στα σύμπλοκα της wt-HIV-1 πρωτεάσης και στα μεταλλαγμένα στελέχη A71V, G73S, L63P, L10I. Τα στελέχη που δεν παρουσιάζουν αυτήν την αλληλεπίδραση (G48V, I84V) εμφανίζουν σημαντική μεταβολή στην ενέργεια πρόσδεσης του φαρμάκου στο ένζυμο.

(ε) Τέλος, η ανάλυση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, μέσω της μεθόδου MM-PBSA, έδειξε πως οι σημαντικότερες συνεισφορές στην ενέργεια πρόσδεσης προέρχονται από τις αλληλεπιδράσεις van der Waals και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Μάλιστα, οι τιμές για όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη της πρωτεΐνης που μελετήθηκαν κυμαίνονται μεταξύ $-55,7 \text{ kcal/mol} < \Delta E_{vdW} < -49,5 \text{ kcal/mol}$ και $-48,4 \text{ kcal/mol} < \Delta E_{elec} < -43,8 \text{ kcal/mol}$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Διαμορφωτική και ενεργειακή μελέτη της αλισκιρένης σε διάλυμα καθώς και σε σύμπλοκο με τη ρενίνη⁷²

Η αλισκιρένη είναι το πιο πρόσφατο αντιυπερτασικό φάρμακο που κυκλοφορεί στο εμπόριο. Το μόριο δρα ως αναστολέας της ρενίνης και κατά συνέπεια παρεμποδίζει τη λειτουργία του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης-αλδοστερόνης που αποτελεί το σημαντικότερο βιοχημικό σύστημα στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης (βλ. Κεφάλαιο 1). Όπως και η HIV-1 πρωτεάση, η ρενίνη ανήκει στην οικογένεια των ασπαρτικών πρωτεασών. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται θεωρητικοί υπολογισμοί (ΜΔ και ΜΜ–PBSA) που αφορούν τα διαμορφωτικά και ενεργειακά χαρακτηριστικά της αλισκιρένης σε διάλυμα καθώς και του συμπλόκου ρενίνης-αλισκιρένης. Παρατηρήθηκε ότι η αλισκιρένη προσδένεται σε εκτεταμένη διαμόρφωση και σταθεροποιείται στην κοιλότητα της ρενίνης μέσω πολλαπλών δεσμών υδρογόνου, με το ενεργό κέντρο και με το περύγιο (Ser76) της πρωτεάσης. Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε στο πλαίσιο εφαρμογής πειραμάτων φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) για την εξεύρεση ευνοϊκών διαμορφώσεων του φαρμάκου στη ρενίνη.

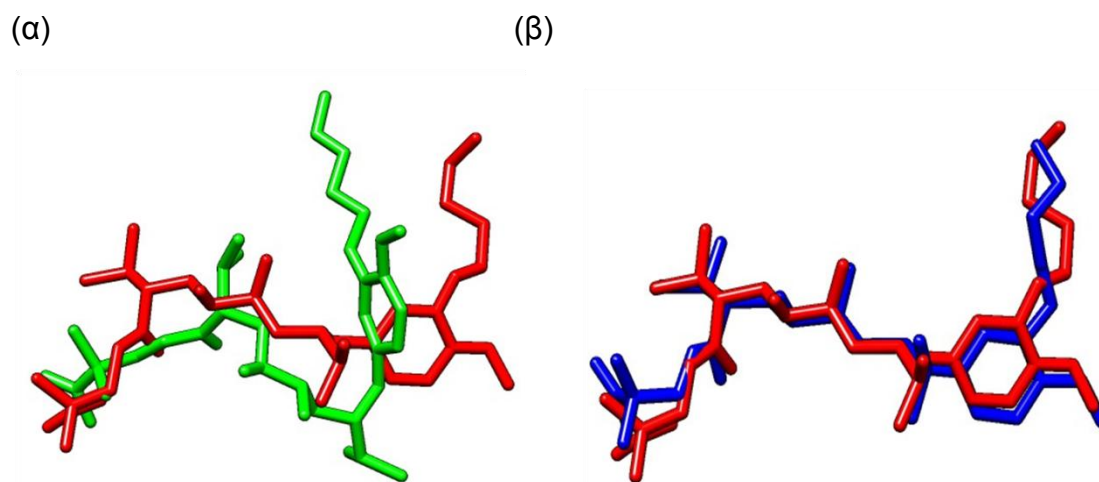
6.2 Μέθοδοι

Οι υπολογισμοί κβαντικής μηχανικής για το μόριο της αλισκιρένης έγιναν με τη χρήση του προγράμματος GAUSSIAN 09.²²⁰ Η βελτιστοποίηση της δομής της αλισκιρένης έγινε με τη χρήση της μεθόδου B3LYP και της βάσης 6-31(d).²²¹ Οι βελτιστοποιημένη δομή της αλισκιρένης χρησιμοποιήθηκε στους υπολογισμούς ΜΔ και ΜΜ–PBSA. Επίσης έγινε και ανάλυση των διαφορετικών διαμορφώσεων που μπορεί να λάβει το φάρμακο μέσα στο ενεργό κέντρο της ρενίνης, κατά την πρόσδεση. Για τη ΜΔ, η διάλυση της αλισκιρένης σε DMSO έγινε με τη χρήση του προγράμματος tLeap από το AMBER11. Για τα μόρια του DMSO έγινε χρήση των παραμέτρων από την ομάδα Bryce.²²² Το σύστημα αλισκιρένης-DMSO θερμάνθηκε από τους 0 στους 300 K για 50 ps, σε συνθήκες σταθερού όγκου

και θερμοκρασίας (NVT) Κατ' αυτήν την προσομοίωση η αλισκιρένη διατηρείται ακίνητη χρησιμοποιώντας μια αρμονική σταθερά δύναμης (force constant) $10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. Στη συνέχεια το σύστημα αφέθηκε ελεύθερο για 200 ps, σε συνθήκες σταθερής πίεσης, μέχρι να ισορροπήσει. Η προσομοίωση της ΜΔ διενεργήθηκε για 200 ns. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση των διαφορετικών διαμορφώσεων που λαμβάνει η αλισκιρένη στο διάλυμα.

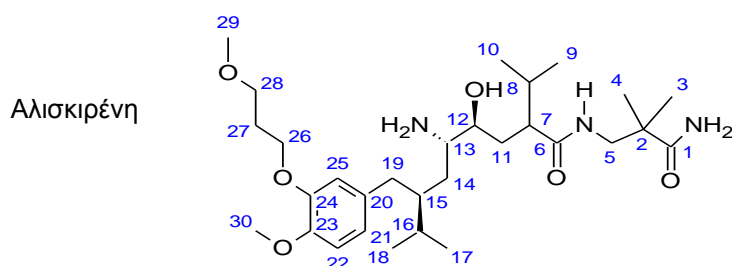
6.3 Αποτελέσματα

ΜΔ αλισκιρένης σε DMSO. Η ανάλυση της ΜΔ για την αλισκιρένη σε διάλυμα DMSO εμφανίζει δύο βασικές ομάδες διαμορφώσεων του φαρμάκου. Η ομάδα 1 (με παρουσία 73%) αντιστοιχεί σε μια «ανοιχτή» δομή της αλισκιρένης (Εικόνα 6.1α, κόκκινο) ενώ η ομάδα 2 (με παρουσία 23%) αντιστοιχεί σε μια πιο «κλειστή» δομή του μορίου (Εικόνα 6.1α πράσινο). Οι συντεταγμένες των αντιπροσωπευτικών δομών της κάθε ομάδας χρησιμοποιήθηκαν σε υπολογισμούς κβαντικής μηχανικής (ΚΜ), με σκοπό τον υπολογισμό διαφόρων ιδιοτήτων του φαρμάκου (πχ ενέργεια, γεωμετρία). Τα αποτελέσματα των *ab initio* υπολογισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.1. Είναι εμφανές ότι η θεωρητική προσέγγιση εμφανίζει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σχέση με πειράματα NMR. Επίσης παρατηρούνται μικρές διαφορές μεταξύ αέριας και υγρής φάσης του μορίου. Η «ανοιχτή» δομή της αλισκιρένης και στις δύο περιπτώσεις παρουσιάζει ομοιότητες με τη πειραματική δομή. Το μέσο σχετικό λάθος μεταξύ θεωρητικών και πειραματικών τιμών είναι 0,18 για την αέρια φάση και 0,17 για την υγρή (Πίνακας 6.1). Οι αντίστοιχες τιμές για την «κλειστή» δομή του φαρμάκου είναι 0,16 (αέρια φάση) και 0,23 (υγρή φάση). Σημειώνουμε ότι η αντιπροσωπευτική δομή της ομάδας 1 έχει μεγάλη ομοιότητα με την κρυσταλλική δομή του φαρμάκου (Εικόνα 6.1β, μπλε, rmsd 1,4 Å). Οι ενέργειες των θεωρητικών δομών κυμαίνονται γύρω από μια μέση τιμή των -1790,7 a.u. (Πίνακας 6.1).



Εικόνα 6.1: (α) Αντιπροσωπευτικές δομές της αλισκιρένης σε διάλυμα DMSO: με κόκκινο χρώμα η κυρίαρχη «ανοιχτή» δομή και με πράσινο η «κλειστή» δομή του φαρμάκου, (β) Σύγκριση της αντιπροσωπευτικής «ανοιχτής» δομής με την κρυσταλλογραφική δομή (μπλε) της αλισκιρένης.

Πίνακας 6.1: Σύγκριση πειραματικών (NMR) και θεωρητικών (*ab initio*: B3LYP/6-31 G(d)) αποστάσεων μεταξύ των πρωτονίων της αλισκιρένης.



Πρωτόνιο 1	Πρωτόνιο 2	Απόσταση (Å)				Πείραμα (Å)
		Ομάδα 1 (DMSO)	Ομάδα 2 (DMSO)	Ομάδα 1 (αέρια φάση)	Ομάδα 2 (αέρια φάση)	
25	19α/β	3,18	3,16	3,15	3,20	3,04
25	15	2,58	2,80	2,68	2,68	3,11
25	26	2,90	2,31	2,91	2,90	2,60
12	19α	4,69	5,30	4,68	4,35	3,15
12	15	2,22	4,34	2,19	2,36	3,00
CONH ₂	3/4	3,63	3,66	3,65	3,60	3,74
MRE		0,18	0,23	0,17	0,16	
Ενέργεια (Hartree)		-1790,7324	-1790,7378	-1790,7092	-1790,7121	

Σχετικό σφάλμα (RE)= |Calc -Exp| /Exp. Μέσο σχετικό σφάλμα (MRE)= Σ RE/n (n=μέγεθος πληθυσμού).
Calc=υπολογισθείσα τιμή, Exp=πειραματική τιμή

Οι θεωρητικοί υπολογισμοί σε συνδυασμό με τα πειράματα NMR κατέδειξαν ότι:

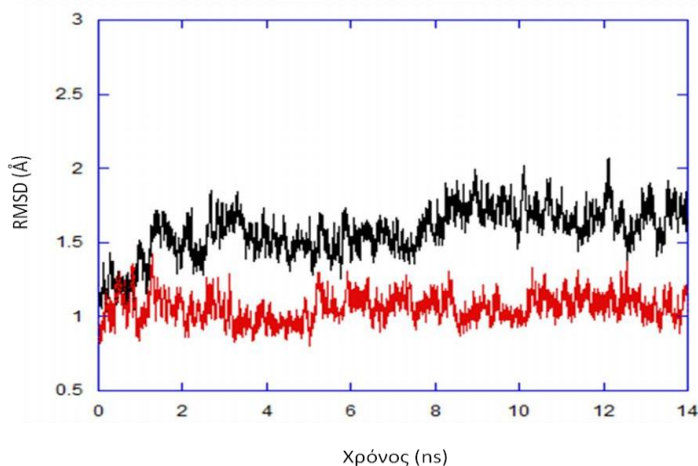
- (1) Η αλισκιρένη είναι ευέλικτο μόριο και
- (2) Το φάρμακο παρουσιάζει δύο δομές («κλειστή» και «ανοιχτή») με την «ανοιχτή» να είναι κυρίαρχη.

Διαμορφωτικές ιδιότητες της αλισκιρένης στο σύμπλοκο με τη ρενίνη. Για τις αρχικές συντεταγμένες του συμπλόκου αλισκιρένης-ρενίνης χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή 2V0Z (από τη βάση δεδομένων PDB)²²³ και για τη ΜΔ της ρενίνης (χωρίς την αλισκιρένη) αφαιρέθηκε η αλισκιρένη από την κρυσταλλική δομή. Στο πρώτο μισό της προσομοίωσης εμφανίστηκαν μικρές δομικές αλλαγές στην πρωτεΐνη, μέχρι το σύστημα να καταλήξει σε κατάσταση ισορροπίας. Ο μεγάλος βαθμός σταθερότητας του συμπλόκου φαίνεται στις διακυμάνσεις των τιμών rmsd κατά τη διάρκεια της ΜΔ (Εικόνα 6.2, κόκκινο). Η μέση τιμή rmsd των ατόμων άνθρακα (Ca) είναι $\approx 1 \text{ \AA}$. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως η δομή ισορροπίας του συμπλόκου ομοιάζει στην κρυσταλλική δομή. Επίσης στην εικόνα παρατηρείται ότι υπάρχουν μόνο μικρές διακυμάνσεις γύρω από μια σταθερή μέση δομή. Όπως ήταν αναμενόμενο η ελεύθερη πρωτεΐνη παρουσιάζει μεγαλύτερη ευελιξία (Εικόνα 6.2, μαύρο) και μεγαλύτερες αποκλίσεις από την κρυσταλλική δομή (μέση τιμή rmsd $\approx 1,65 \text{ \AA}$).

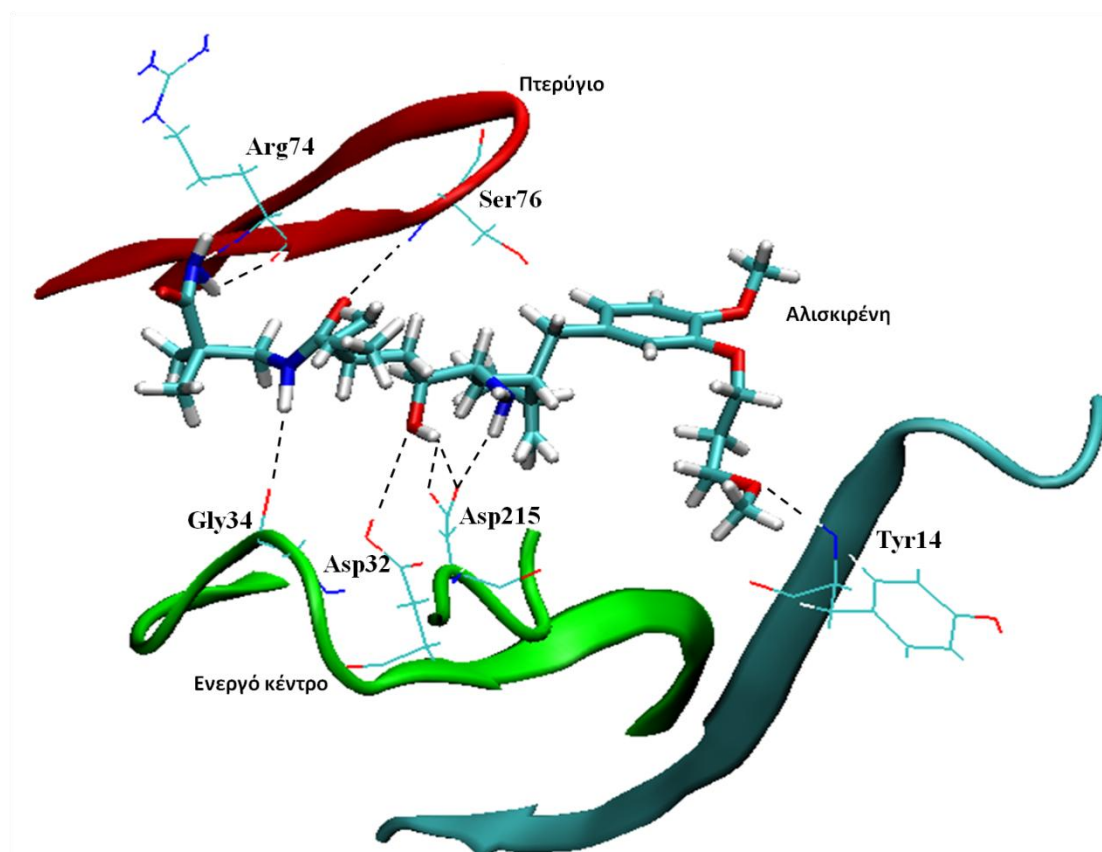
Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αλισκιρένης και ενζύμου καταδεικνύει την ύπαρξη ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου (Πίνακας 6.2), που συμβάλλει στη δομική σταθερότητα του συμπλόκου. Οι πέντε από τους συνολικά οκτώ δεσμούς υδρογόνου εμφανίζονται σε όλη τη διάρκεια της ΜΔ και σταθεροποιούν την αλισκιρένη μέσα στην κοιλότητα. Τα αμινοξέα Asp32/215 και Gly34 στο ενεργό κέντρο παρουσιάζουν τις κυριότερες αλληλεπιδράσεις με το φάρμακο, ενώ τα αμινοξέα Tyr14, Arg74 και Ser76 συμβάλλουν περαιτέρω στη σταθεροποίηση του συστήματος (Πίνακας 6.2, Εικόνα 6.3).

Παρόλο που η αλισκιρένη παρουσιάζει συνεχή αλληλεπίδραση με το ενεργό κέντρο της ρενίνης, η κατανομή των διαφόρων δεσμών υδρογόνου (Πίνακας 6.2) επιτρέπει στο μόριο να είναι σχετικά ευέλικτο μέσα στην

κοιλότητα. Αυτό φαίνεται από τις διακυμάνσεις rmsd στην Εικόνα 6.4. Αυτές οι διακυμάνσεις δικαιολογούν τις μικρές διαμορφωτικές αλλαγές που εμφανίζονται στο σύμπλοκο.



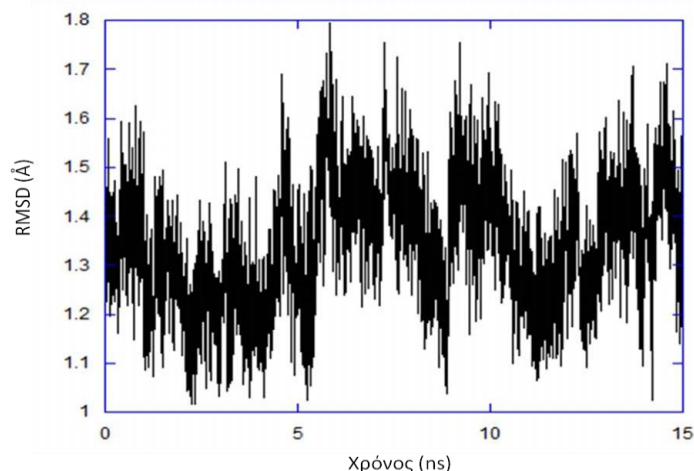
Εικόνα 6.2: Rmsd των ατόμων άνθρακα Ca της ρενίνης για το σύμπλοκο αλισκιρένη-ρενίνη (κόκκινο) και για το ελεύθερο ένζυμο (μαύρο).



Εικόνα 6.3: ΔΥ ανάμεσα σε αλισκιρένη και ρενίνη. Οι συνολικά οκτώ δεσμοί συμπεριλαμβάνουν τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο (Gly34, Asp32/215) και τα αμινοξέα Tyr14, Arg74 και Ser76.⁷²

Πίνακας 6.2: Βασικοί δεσμοί υδρογόνου στο σύμπλοκο ρενίνης-αλισκιρένης.⁷²

Αλληλεπίδραση	Συχνότητα	Σχόλια
Αμιδικό Η' με καρβονυλικό Ο της Gly40	98%	Εμφανίζονται σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης ΜΔ
Αμιδικό Η'' με καρβοξυλικό OD1 του Asp215	97%	Εμφανίζονται σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης ΜΔ
Αιθερικό Ο με αμιδικό Η της Tyr14	91%	Εμφανίζονται σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης ΜΔ
Υδροξυλικό Ο με καρβοξυλικό HD2 του Asp32	90%	Εξαφανίζεται σταδιακά προς το τέλος της προσομοίωσης ΜΔ
Υδροξυλικό Η με καρβοξυλικό OD1 του Asp215	87%	Εξαφανίζεται σταδιακά προς το τέλος της προσομοίωσης ΜΔ
Αμιδικό Η''' με καρβονυλικό Ο της Arg74	68%	Ίση κατανομή κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης ΜΔ
Υδροξυλικό Η με καρβοξυλικό OD2 Asp215	57%	Εμφανίζεται κυρίως στα πρώτα ¾ της προσομοίωσης ΜΔ
Καρβονυλικό Ο με αμιδικό Η της Ser76	56%	Εμφανίζεται κυρίως στο τέλος της προσομοίωσης ΜΔ



Εικόνα 6.4: Rmsd της αλισκιρένης μέσα στη ρενίνη.⁷²

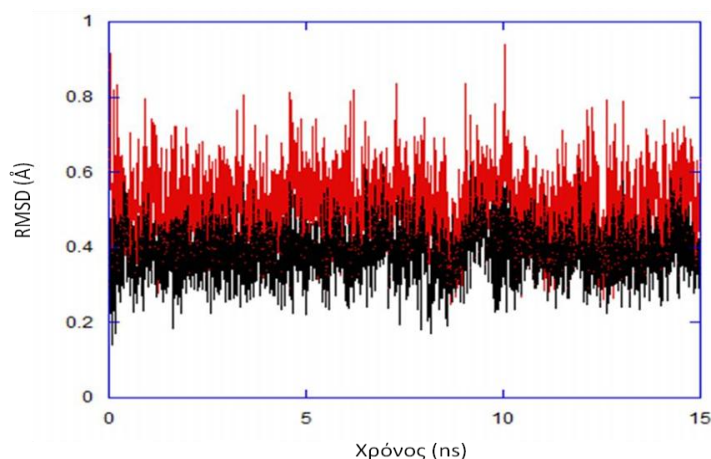
Η μελέτη των διακυμάνσεων στις τιμές rmsd για τα αμινοξέα Asp32/215 και Gly34 στο ενεργό κέντρο καταδεικνύει ότι οι διαμορφωτικές αλλαγές που σχετίζονται με το σχηματισμό ΔΥ συμβάλλουν στην αυξημένη σταθερότητα του ενεργού κέντρου (Εικόνα 6.5). Παρόλο που η δομή του συμπλόκου αλισκιρένης-ρενίνης παραμένει σχετικά σταθερή κατά τη ΜΔ, υπάρχουν περιοχές της πρωτεΐνης που εμφανίζουν αυξημένη κινητικότητα. Στους υπολογισμούς των διακυμάνσεων των ατόμων Ca –για όλα τα αμινοξέα της ρενίνης– τα αμινοξέα Ser159, Gly160, Ser161, Gln162, Leu241 και Phe242

έχουν υψηλή κινητικότητα. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα βρίσκονται σε περιοχές της πρωτεΐνης που έχουν επαφή με το νερό και δεν εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις με την αλυσκιδέννη. Αντίθετα, όλα τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο εμφανίζονται ως τα πιο σταθερά (Εικόνα 6.6 και Πίνακας 6.3). Η κινητικότητα των αμινοξέων 159-162 και 239-246 συμβάλλει στις διαμορφωτικές αλλαγές στη ρενίνη όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.2. Οι αντίστοιχες τιμές για τα αμινοξέα στην ελεύθερη πρωτεΐνη είναι μεγαλύτερες, όπως και αναμένονταν. Αυτό εξηγεί και το ρόλο της αλυσκιδένης στη σταθεροποίηση της δομής του ενζύμου. Επίσης η εμφάνιση δεσμών υδρογόνου μεταξύ αλυσκιδένης και ενεργού κέντρου οδηγεί στη σταθεροποίηση των αμινοξέων στην ευρύτερη περιοχή (Πίνακας 6.3).

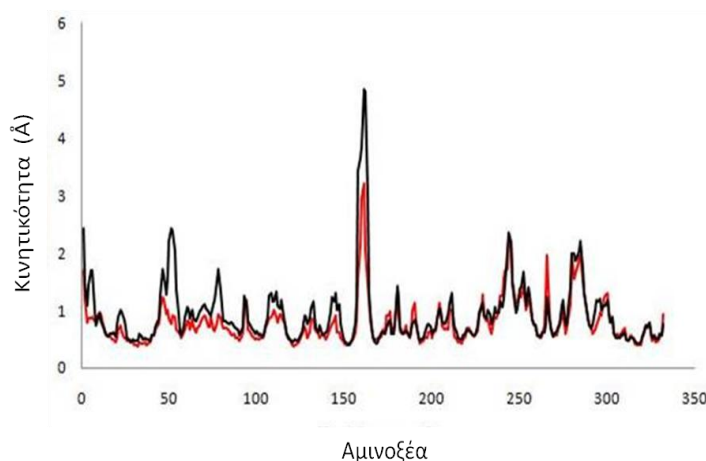
Πίνακας 6.3: Τιμές της κινητικότητας των ατόμων Ca (σε Å) για τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου στο σύμπλοκο αλυσκιδένης-ρενίνης και στην ελεύθερη ρενίνη.⁷²

	Αμινοξέα	Αλυσκιδένη-ρενίνη^α	Ελεύθερη ρενίνη^α
Αμινοξέα ενεργού κέντρου	Asp32	0.39	0.47
	Thr33	0.37	0.47
	Gly34	0.44	0.59
	Asp215	0.48	0.56
	Thr216	0.53	0.59
	Gly217	0.68	0.65
	Αμινοξέα της περιοχής του πτερυγίου	Arg74	0.67
Tyr75		0.65	1.18
Ser76		0.78	1.51
Thr77		0.94	1.72
Gly78		0.86	1.32

^αΟι τιμές εκφράζονται σε Å



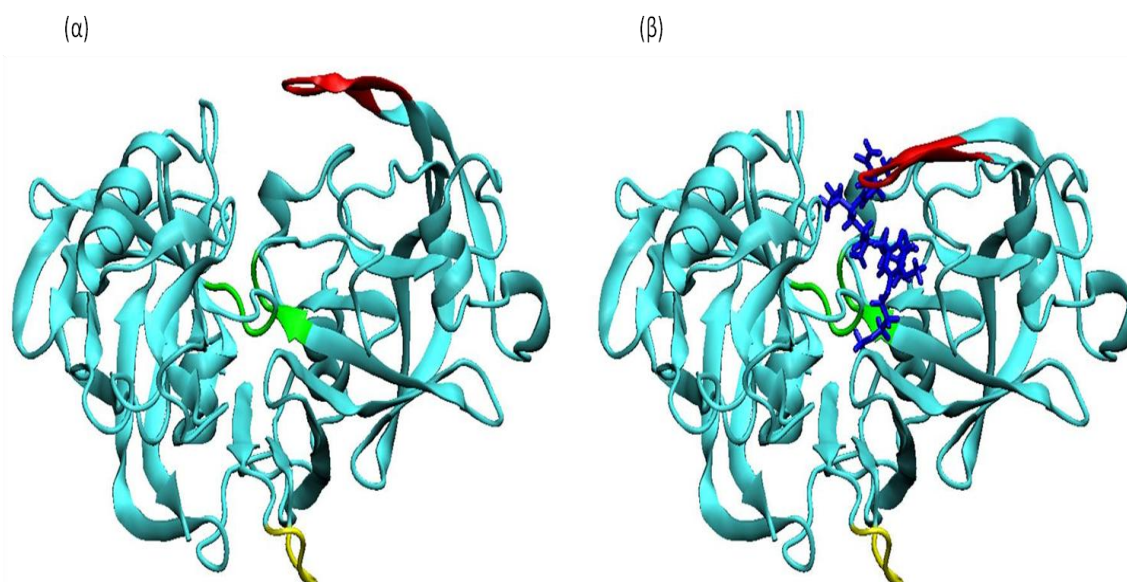
Εικόνα 6.5: Rmsd διακυμάνσεις για τη ρενίνη σε σχέση με την κρυσταλλική δομή. Οι τιμές αφορούν στα άτομα Ca για τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο Asp32/215, Thr33/216 και Gly34/217 (κόκκινο) και τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου που αλληλεπιδρούν μέσω ΔΥ (Asp32/215 και Gly34, μαύρο).⁷²



Εικόνα 6.6: Διακυμάνσεις των ατόμων Ca για την ελεύθερη (άπο-μορφή) της ρενίνης (μαύρο) και για το σύμπλοκο ρενίνης-αλισκιρένης (κόκκινο).⁷²

Η ανάλυση έδειξε επίσης, ότι η περιοχή γύρω από τη Ser76 (Arg74-Tyr75-Ser76-Thr77-Gly78), η οποία καλύπτει το ενεργό κέντρο, συμβάλλει στην παγίδευση της αλισκιρένης μέσα στην κοιλότητα μέσω της δημιουργίας δύο δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Arg74 και Ser76 (Εικόνα 6.3). Η περιοχή αυτή, στην περίπτωση της άπο-μορφής του ενζύμου παρουσιάζει μεγάλη κινητικότητα (Πίνακας 6.3). Αυτό το αποτέλεσμα καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο του πτερυγίου στην είσοδο των μορίων στην κοιλότητα της

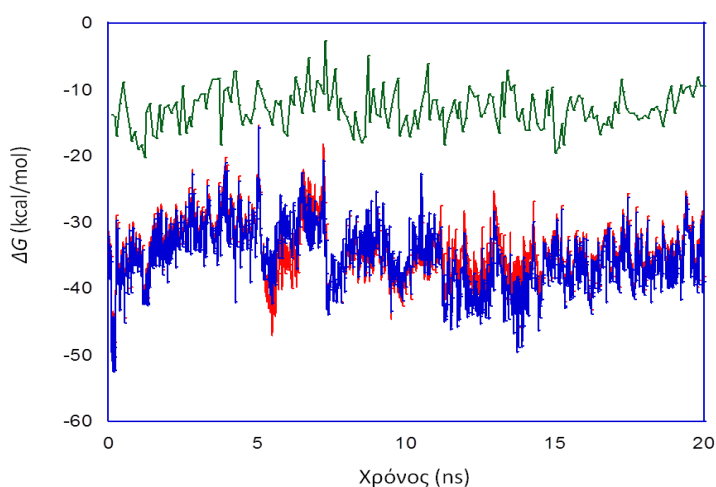
ρενίνης. Η πρόσβαση στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από αμινοξέα της περιοχής γύρω από τη Ser76. Μετά την πρόσδεση, η κινητικότητα αυτών των αμινοξέων μειώνεται σε μεγάλο βαθμό και κατά συνέπεια η αλυσκιδένη παγιδευείται μέσα στην κοιλότητα. Η αναπαράσταση αυτού του μηχανισμού παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.7. Η ευκίνητη αυτή περιοχή, στην άπο-μορφή του ενζύμου, βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ «ανοιχτής» και «κλειστής» δομής. Κατά την πρόσδεση της αλυσκιδένης όμως η δομή σταθεροποιείται μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων Ser76, Arg74, της αλυσκιδένης και του ενεργού κέντρου (Εικόνα 6.3).



Εικόνα 6.7: Πιθανός μηχανισμός εισόδου της αλυσκιδένης στην περιοχή γύρω από τη Ser76 (κόκκινο): (α) το άνοιγμα της συγκεκριμένης περιοχής ελέγχει την είσοδο του προσδέτη στην κοιλότητα του ενζύμου, (β) κατά την πρόσδεση το πτερύγιο κλείνει πάνω από το ενεργό κέντρο και το μόριο του προσδέτη εγκλωβίζεται σε αυτό. Η αλυσκιδένη λαμβάνει την «ανοιχτή» διαμόρφωση στο ενεργό κέντρο (πράσινο).⁷²

Ανάλυση αποτελεσμάτων MM-PBSA για το σύμπλοκο ρενίνης-αλυσκιδένης. Για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης και των διαφόρων συνεισφορών της, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MM-PBSA. Η ενέργεια του συστήματος συγκλινε μετά τα πρώτα 10 ns (Εικόνα 6.8,

πράσινο). Τα αποτελέσματα από την ανάλυση MM-PBSA παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4).



Εικόνα 6.8: Γραφική παράσταση της μεταβολής ελεύθερης ενέργειας ΔG του συμπλόκου ρενίνης-αλισκιρένης (πράσινο), της μεταβολής της ενθαλπίας (ΔH , κόκκινο) και των αλληλεπιδράσεων van der Waals (ΔG_{vdW} , μπλε) κατά την προσομοίωση.⁷²

Πίνακας 6.4: Ενεργειακές συνεισφορές στην ενέργεια πρόσδεσης, όπως υπολογίστηκαν από τη μέθοδο MM-PBSA (σε kcal/mol).

	Ενέργεια	Stdv
ΔE_{ele}	-31,24	2,72
ΔE_{vdW}	-35,67	2,88
ΔE_{MM}	-66,91	2,70
ΔG_{NP}	-28,14	2,00
ΔG_{PB}	51,32	2,25
ΔG_{solv}	23,18	2,34
$\Delta G_{ele(tot)} = \Delta G_{ele} + \Delta G_{PB}$	20,08	3,14
ΔH	-39,23	2,86
$-T\Delta S_{tot}$	27,20	2,30
$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$	-12,03	2,22

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδωσε $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = -12,03 \text{ kcal mol}^{-1}$ για το σύστημα ρενίνης-αλισκιρένης. Σε σύγκριση με την πειραματική τιμή ($-12,64 \text{ kcal mol}^{-1}$), παρατηρείται ότι η μέθοδος MM-PBSA δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα.²²⁴ Στον Πίνακα 6.4 παρατηρείται ότι η ηλεκτροστατική

συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια διαλυτότητας (solvation, ΔG_{solv}) είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια του συμπλόκου ($\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{ele}} + \Delta E_{\text{vdW}}$). Η συνολική ηλεκτροστατική συνεισφορά ($\Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{PB}}$) είναι $20,1 \text{ kcal mol}^{-1}$. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η μη ευνοϊκή ηλεκτροστατική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια διάλυσης ($\Delta G_{\text{PB}} = 51,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) δεν αντισταθμίζεται από την ευνοϊκή ηλεκτροστατική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια του συστήματος ($\Delta G_{\text{ele}} = -31,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) όπως αυτή υπολογίζεται από τη μοριακή μηχανική (ΔE_{MM} , βλ. Μέθοδοι). Η συγκεκριμένη συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και σε άλλες θεωρητικές εργασίες διαφορετικών βιολογικών συστημάτων (π.χ. σύμπλοκο θεοφυλίνης-RNA).¹³⁷ Οι αλληλεπιδράσεις στο σχηματισμό του συμπλόκου ρενίνης-αλίσκιρηνης επηρεάζονται κυρίως από τις συνεισφορές van der Waals ($-35,7 \text{ kcal mol}^{-1}$) και από τη μη πολική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια διάλυσης ($-28,7 \text{ kcal mol}^{-1}$) όπως συμβαίνει και σε διαφορετικά πρωτεϊνικά συστήματα που έχουν μελετηθεί.^{139,140}

6.4 Συμπεράσματα

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων από τη μοριακή δυναμική της αλίσκιρηνης σε DMSO δείχνει την ύπαρξη μιας κυρίαρχης «ανοιχτής» διαμόρφωσης. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από πειράματα NMR⁷² και από την κρυσταλλική δομή της αλίσκιρηνης στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης. Πειραματικά (NMR με διαλύτη DMSO)²²⁵ και θεωρητικά αποτελέσματα συμφωνούν ικανοποιητικά.

Οι υπολογισμοί ΜΔ έδειξαν ότι κατά την πρόσδεση του φαρμάκου στο ένζυμο δημιουργείται ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου, το οποίο συμβάλλει στη δομική σταθερότητα του συμπλόκου. Επίσης παρατηρήθηκε και ο σημαντικός ρόλος της περιοχής του ενζύμου γύρω από το αμινοξύ Ser76. Τα αποτελέσματα εμφανίζουν τη συγκεκριμένη περιοχή (πτερύγιο) να έχει σημαντικό ρόλο στην είσοδο του φαρμάκου στη ρενίνη και στην παγίδευση του στην κοιλότητα μέσω των δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser76 και Arg74. Ο υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, με τη μέθοδο MM-PBSA, συμφωνεί με τα πειραματικά αποτελέσματα ($-12,03$ και $-12,64 \text{ kcal mol}^{-1}$, αντίστοιχα). Περαιτέρω ανάλυση παρουσίασε τις

βασικές συνεισφορές στην ενέργεια να προέρχονται από τις αλληλεπιδράσεις van der Waals και τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι οι ηλεκτροστατικές ($\Delta G_{\text{ele}} = -31,2 \text{ kcal mol}^{-1}$) και οι van der Waals ($\Delta G_{\text{vdW}} = -35,7 \text{ kcal mol}^{-1}$) αλληλεπιδράσεις έχουν σχεδόν ισότιμη συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Αναστολείς με διπλή δράση κατά των ασπαρτικών πρωτεασών HIV-1 PR και ρενίνης: Σύνδεση AIDS- υπέρτασης- διαβήτη ⁷⁹

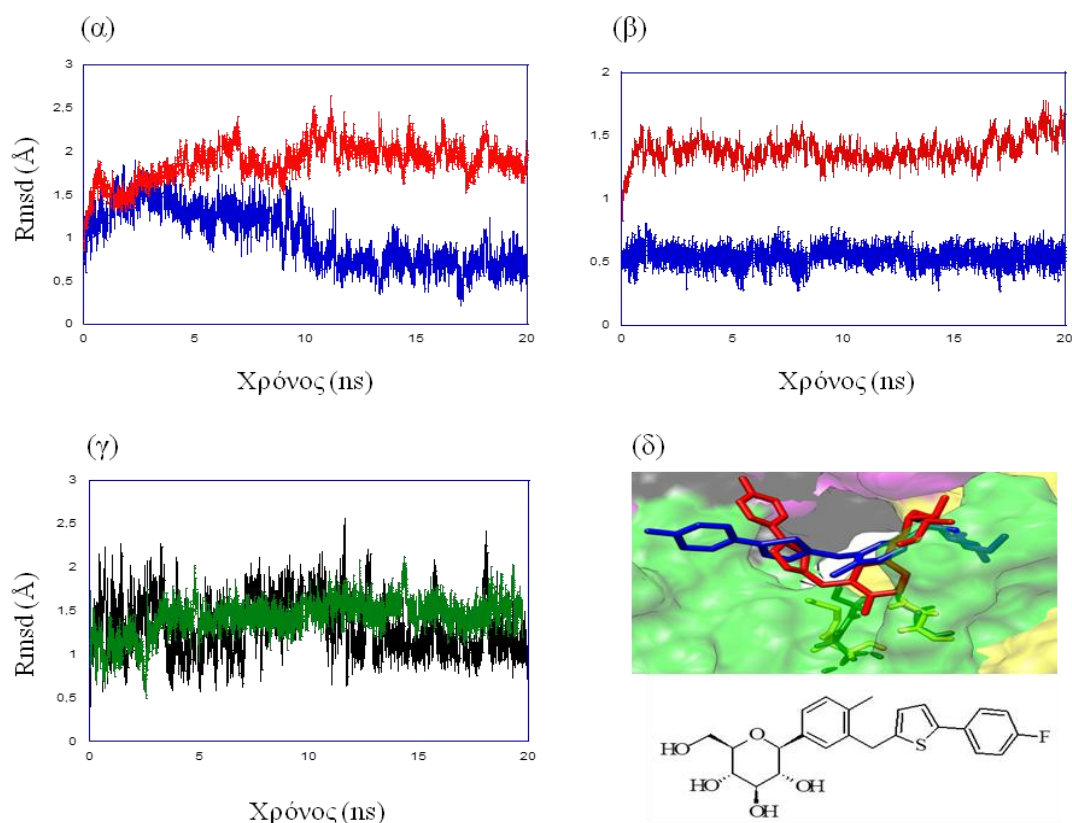
7.1 Εισαγωγή

Τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά των ασπαρτικών πρωτεασών (βλ. Ενότητα 1.3) μας παρακίνησαν να συγκρίνουμε την HIV-1 πρωτεάση με τη ρενίνη. Ειδικά μελετήθηκε η επίδραση δύο εμπορικών φαρμάκων, της αλισκιρένης (αντίυπερτασικό) και της νταρουναβίρης (αντιικό) στις δύο ασπαρτικές πρωτεάσες. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν τη διπλή δράση των δύο φαρμάκων στην HIV-1 πρωτεάση και τη ρενίνη. Υπάρχουν μελέτες, που δείχνουν πως μπορούν να αξιοποιηθούν κοινά δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων για τη σχεδίαση φαρμάκων με πολλαπλή ανασταλτική δράση.²²⁶ Παρατηρήθηκε μάλιστα, πως μόρια με ορισμένα κοινά δομικά τμήματα (scaffolds) –όπως οι δακτύλιοι πυρρολινόνης– εμφανίζουν βιολογική δράση και στις δύο πρωτεάσες.²²⁶ Βασιζόμενοι σε αυτή την υπόθεση και αξιοποιώντας τα ευρήματα μιας βιβλιογραφικής έρευνας, κάναμε μια επιλογή 54 βιολογικά δραστηκών μορίων τα οποία ελέγχθησαν για την ανασταλτική τους δράση στις δύο πρωτεάσες. Η διαδικασία αυτή οδήγησε στην επιλογή της καναγλιφλοζίνης (canagliflozin) ως ένα μόριο με πιθανές ανασταλτικές ιδιότητες στην HIV-1 πρωτεάση και στη ρενίνη. Πράγματι, η δράση της καναγλιφλοζίνης ως αναστολέας των δύο πρωτεασών επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα των μελετών μας.

Η καναγλιφλοζίνη χρησιμοποιείται ως πειραματικό φάρμακο για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 και βρίσκεται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών από το 2010.²²⁷ Η συγκεκριμένη βιοδραστική ουσία αναπτύχθηκε από τους ερευνητές της φαρμακευτικής εταιρείας Johnson & Johnson και έχει τα δομικά χαρακτηριστικά ενός C-αρυλογλυκοσιδίου.²²⁸ Το φάρμακο αναστέλλει τη δράση του καναλιού Na⁺/ γλυκόζης 2 (sodium/glucose co-transporter 2-SGLT-2), μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης.²²⁹

7.2 Αποτελέσματα

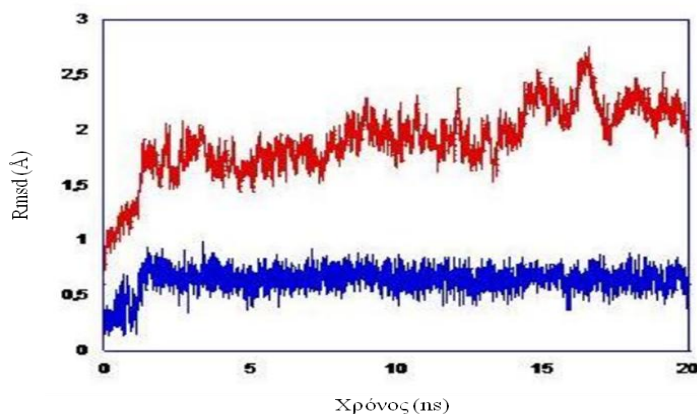
Δομικές ιδιότητες συμπλόκων της καναγλιφλοζίνης με την HIV-1 πρωτεάση και τη ρενίνη. Για τη μοριακή δυναμική της καναγλιφλοζίνης στις δύο πρωτεάσες, χρησιμοποιήθηκαν οι κρυσταλλικές δομές 2IEN και 2V0Z για την HIV-1 PR και τη ρενίνη, αντίστοιχα.²²³ Ακολουθως, αντικαταστήσαμε τους αναστολείς στις συγκεκριμένες δομές (νταρουναβίρη και αλισκιρένη, αντίστοιχα) με τη δομή της καναγλιφλοζίνης. Η αντικατάσταση αυτή οδήγησε σε διαμορφωτικές αλλαγές στη δομή των δύο ενζύμων στην αρχή των προσομοιώσεων. Μετά από την έναρξη των υπολογισμών ΜΔ, οι δομές των συμπλόκων κατέληξαν σε ισορροπία όπως παρατηρείται από τις διακυμάνσεις των τιμών rmsd για τα άτομα α-άνθρακα (Ca) των πρωτεϊνών στην εικόνα 7.1 (α και β, κόκκινο). Στο σύμπλοκο με την HIV-1 πρωτεάση, οι διαμορφωτικές αλλαγές παρατηρούνται κατά το πρώτο μισό της προσομοίωσης, ενώ μετά 10 ns παρατηρείται σταθεροποίηση του συστήματος. Αντίθετα στο σύμπλοκο με τη ρενίνη δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφοροποιήσεις κατά την προσομοίωση. Η μέση τιμή rmsd για την HIV-1 πρωτεάση είναι $\approx 2 \text{ \AA}$ και για τη ρενίνη $\approx 1,5 \text{ \AA}$. Επίσης όπως φαίνεται στην εικόνα 7.1 η HIV-1 πρωτεάση εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα σε σχέση με τη ρενίνη. Αυτές οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ενζύμων δείχνουν πως ίσως η καναγλιφλοζίνη προσδένεται ισχυρότερα στη ρενίνη σε σχέση με την ιική πρωτεάση. Είναι αναμενόμενο ότι το ενεργό κέντρο, και στα δύο ένζυμα, έχει μικρή κινητικότητα, μέση τιμή rmsd $\approx 0,6 \text{ \AA}$ (Εικόνα 7.1α και β, μπλε). Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να τονιστεί πως η αντικατάσταση της νταρουναβίρης με την καναγλιφλοζίνη συμβάλλει σε μια άμεση διαμορφωτική αλλαγή στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης (τιμή rmsd $\approx 1,5 \text{ \AA}$), η οποία οφείλεται σε μια μη ευνοϊκή ανακατάταξη της κοιλότητας του ενζύμου κατά την είσοδο του νέου μορίου. Η ανάλυση των διαφοροποιήσεων (τιμές rmsd) των αμινοξέων της πρωτεάσης, έδειξε ότι οι διαμορφωτικές αλλαγές που παρατηρούνται στο ενεργό κέντρο οφείλονται κυρίως στην αυξημένη κινητικότητα των αμινοξέων Asp25/25'. Όμως μετά τα πρώτα 10 ns οι διαμορφωτικές αλλαγές στο ενεργό κέντρο συμβάλλουν στην τοποθέτηση της καναγλιφλοζίνης στην κοιλότητα σε θέση παρόμοια με αυτή της νταρουναβίρης στην κρυσταλλική δομή.



Εικόνα 7.1: Rmsd για τα σύμπλοκα της καναγλοφλοζίνης με (α) την HIV-1 πρωτεάση και (β) τη ρενίνη, ως προς τις κρυσταλλικές δομές τους (2IEN και 2V0Z, αντίστοιχα). Με κόκκινο εμφανίζονται τιμές rmsd για όλα τα άτομα Ca για τα ένζυμα και με μπλε για τα αντίστοιχα άτομα του ενεργού κέντρου. (γ) rmsd για την καναγλοφλοζίνη στην HIV-1 πρωτεάση (μαύρο) και στη ρενίνη (πράσινο). (δ) αντιπροσωπευτικές διαμορφώσεις της καναγλιφλοζίνης (και χημική δομή κάτω) στο ενεργό κέντρο της HIV-1 πρωτεάσης (μπλε) και της ρενίνης (κόκκινο). Τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου εμφανίζονται ως κίτρινα για την ιική πρωτεάση και πράσινα για τη ρενίνη.

Σε σύγκριση με την άπο-μορφή της ρενίνης, παρατηρήσαμε ότι στο σύμπλοκο καναγλιφλοζίνης–ρενίνης υπάρχουν αλλαγές που συνδέονται με πρόσδεση στο ενεργό κέντρο (Εικόνα 7.2). Η ελεύθερη πρωτεΐνη εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές rmsd (μέχρι 2,7 Å) λόγω κυρίως της κινητικότητας του περυγίου της πρωτεάσης. Το ενεργό κέντρο και στην άπο-μορφή και στο σύμπλοκο παραμένει σχετικά σταθερό. Αυτή η διαφοροποίηση ανάμεσα στην ελεύθερη ρενίνη και στο σύμπλοκο υποδεικνύει πως το ενεργό κέντρο αλληλεπιδρά με την καναγλιφλοζίνη και οδηγεί σε ισχυρότερη πρόσδεση. Όπως και στην περίπτωση της HIV-1 πρωτεάσης, η ανάλυση των

τιμών rmsd για τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου έδειξε ότι η Gly217 δεν παρουσιάζει καμιά αλλαγή.



Εικόνα 7.2: Rmsd για την άπο-μορφή της ρενίνης (κόκκινο). Με μπλε αποτυπώνονται οι τιμές rmsd ως προς τα άτομα Ca των αμινοξέων του ενεργού κέντρου της.

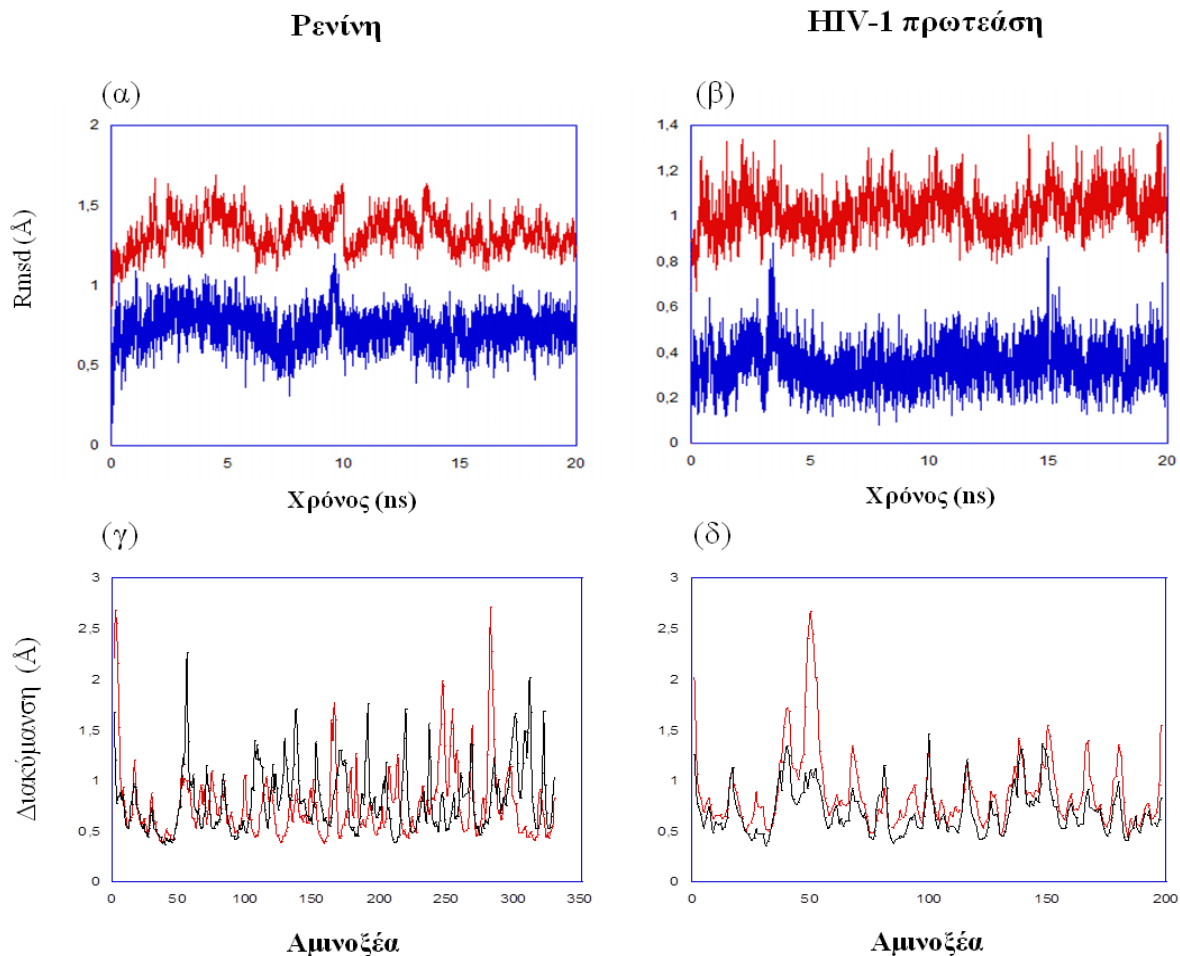
Πολλές πειραματικές και θεωρητικές εργασίες έχουν τονίσει τη συνεισφορά της περιοχής των πτερυγίων κατά τη διαδικασία πρόσδεσης στις ασπαρτικές πρωτεάσες.⁶⁹⁻⁷² Συγκεκριμένα μετά την πρόσδεση παρατηρείται μια μετατόπιση των πτερυγίων προς το ενεργό κέντρο των ενζύμων. Για να εξεταστεί η συγκεκριμένη συμπεριφορά, μετρήθηκε η απόσταση ενεργού κέντρου-πτερυγίων και στις δύο πρωτεΐνες. Στο σύμπλοκο της καναγλιφλοζίνης με την HIV-1 πρωτεάση, η απόσταση μεταξύ της Ile50 (πτερύγια) και του Asp25 (ενεργό κέντρο) κυμαίνεται μεταξύ 16 και 26 Å. Η μεγάλη αυτή διακύμανση υποδεικνύει πως η καναγλιφλοζίνη δεν προσδένεται τόσο σταθερά στη συγκεκριμένη πρωτεάση. Αντίθετα στο σύμπλοκο με τη ρενίνη η αντίστοιχη απόσταση του πτερυγίου (Ser76) με το ενεργό κέντρο (Asp32) έχει πολύ μικρότερη διακύμανση καταδεικνύοντας σταθερότερη πρόσδεση στη ρενίνη. Παρόλα αυτά κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, η απόσταση ενεργού κέντρου –πτερυγίου παρουσιάζει μια μείωση και στα δύο σύμπλοκα γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο της περιοχής αυτής στη διαδικασία πρόσδεσης.

Από την ανάλυση αυτή προκύπτουν οι ομοιότητες και οι διαφοροποιήσεις κατά την πρόσδεση της καναγλιφλοζίνης στα δύο ένζυμα. Παρατηρήθηκε ότι η καναγλιφλοζίνη ίσως προσδένεται ισχυρότερα στη ρενίνη

σε σχέση με την HIV-1 πρωτεάση. Η συγκεκριμένη τάση επιβεβαιώνεται και από την παρατήρηση πως η καναγλιφλοζίνη παρουσιάζεται σταθερότερη διαμορφωτικά μέσα στην κοιλότητα της ρενίνης (Εικόνα 7.1γ, πράσινο). Η ανάλυση των διαμορφωτικών αλλαγών που παρατηρούνται κατά την πρόσδεση της καναγλιφλοζίνης στις δύο πρωτεάσες, έδειξε ότι υπάρχει μια κυρίαρχη δομή της ένωσης μετά την πρόσδεσή της (Εικόνα 7.1δ). Στην HIV-1 πρωτεάση η καναγλιφλοζίνη παρουσιάζει μια «ανοιχτή» διαμόρφωση (Εικόνα 7.1δ, μπλε) ενώ στη ρενίνη η αντίστοιχη διαμόρφωση είναι πιο «κλειστή» (Εικόνα 7.1δ, κόκκινο). Βάσει αυτών των παρατηρήσεων συμπεραίνεται ότι η καναγλιφλοζίνη μπορεί να λάβει δύο διαφορετικές διαμορφώσεις στα δύο ένζυμα, γεγονός που συμβάλλει στην ικανότητα της να δρα ως αναστολέας και στις δύο πρωτεάσες.

Το επόμενο βήμα σε αυτή τη μελέτη, είναι η εξέταση της συμπεριφοράς των εμπορικών φαρμάκων νταρουναβίρης και αλισκιρένης όταν προσδένονται στη ρενίνη και την HIV-1 πρωτεάση, αντίστοιχα.

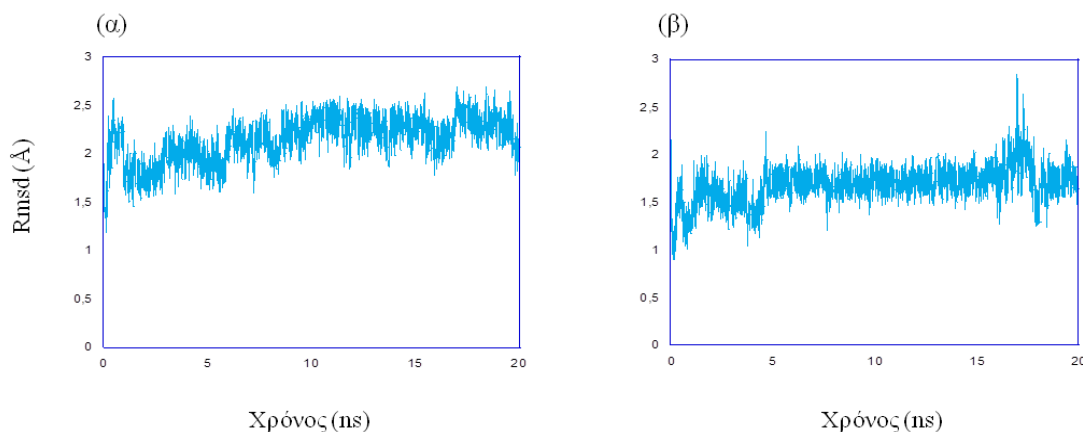
Διαμορφωτικές ιδιότητες του συμπλόκου ρενίνης-νταρουναβίρης. Η ΜΔ στο σύμπλοκο ρενίνης-νταρουναβίρης κατέδειξε πως το σύστημα οδηγείται σε ισοροπία μετά από περίπου 10 ns. Η παρουσία της νταρουναβίρης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου επιφέρει μικρές αλλαγές (βλ. διάγραμμα τιμών rmsd Εικόνα 7.3α). Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται και για το ενεργό κέντρο, καθώς η διακύμανση των τιμών rmsd είναι μεταξύ 0,7 και 0,9 Å. Η δομική αλλαγή που παρατηρείται τη χρονική στιγμή 7-10 ns πιθανώς να οφείλεται στην ανακατάταξη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αναστολέα και του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης. Επίσης, παρατηρείται η μετατόπιση του πτερυγίου της ρενίνης προς το ενεργό κέντρο, λόγω της παρουσίας της νταρουναβίρης, μετά τα πρώτα 6 ns με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της απόστασης μεταξύ ενεργού κέντρου και πτερυγίου. Επιπροσθέτως, οι διακυμάνσεις των τιμών rmsd για τη νταρουναβίρη εμφανίζουν τον αναστολέα να έχει μια σταθερή δομή μέσα στην κοιλότητα του ενζύμου, που ίσως συμβάλλει στην ανασταλτική δράση του (Εικόνα 7.4α).



Εικόνα 7.3: Επάνω, rmsd για τα άτομα Ca της πρωτεΐνης (κόκκινο) και των ατόμων Ca των αμινοξέων του ενεργού κέντρου (μπλε) για τα σύμπλοκα: (α) Νταρουναβίρης-ρενίνης και (β) Αλισκιρένης-HIV-1 πρωτεάσης. Κάτω, διακυμάνσεις των ατόμων Ca των αμινοξέων για τα σύμπλοκα: (γ) καναγλιφλοζίνης-ρενίνης (κόκκινο), νταρουναβίρης-ρενίνης (μαύρο) και (δ) καναγλιφλοζίνης-HIV-1 πρωτεάσης (κόκκινο), αλισκιρένης-HIV-1 πρωτεάσης (μαύρο).

Δομικές ιδιότητες του συμπλόκου αλισκιρένης-HIV-1 πρωτεάσης. Όπως προαναφέρθηκε ελέγχθηκε και η συμπεριφορά της αλισκιρένης μέσα στην ιική πρωτεάση. Όπως και με τη νταρουναβίρη στη ρενίνη έτσι και η αλισκιρένη είναι πιθανό να εμφανίζει ανασταλτική δράση κατά της HIV-1 πρωτεάσης. Συγκεκριμένα, στο ένζυμο εμφανίζονται μικρές δομικές αλλαγές κατά την πρόσδεση της αλισκιρένης γεγονός που τονίζει τη σταθερότητα του συμπλόκου. Όπως προκύπτει από τις τιμές rmsd (Εικόνα 7.3β) παρουσιάζονται μικρότερες μεταβολές σε σχέση με το σύμπλοκο HIV-1 πρωτεάση-καναγλιφλοζίνης. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται από την

ύπαρξη μιας σταθερής διαμόρφωσης της αλυσκίρηνης μέσα στην πρωτεΐνη (μέση τιμή rmsd για την αλυσκίρηνη 1,7 Å). Επίσης παρατηρείται ότι το μόριο της βρίσκεται πολύ κοντά στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης.



Εικόνα 7.4: Rmsd για: (α) τη νταρουναβίρη στη ρενίνη και (β) την αλυσκίρηνη στην HIV-1 πρωτεάση.

Η απόσταση ενεργού κέντρου-πτερυγίου στο σύμπλοκο αλυσκίρηνης-HIV-1 πρωτεάσης είναι ≈ 14 Å στην αρχή της προσομοίωσης της ΜΔ. Στη συνέχεια για τα πρώτα 5 ns η απόσταση αυτή αυξάνεται σταδιακά για να ισοροπήσει τελικά στη μέση τιμή των 16,5 Å. Όμως, η συνολική διαμόρφωση του συμπλόκου παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης της ΜΔ, με τα πτερύγια του ενζύμου να καλύπτουν το φάρμακο.

Κινητικότητα της HIV-1 πρωτεάσης και της ρενίνης. Για την περαιτέρω ανάλυση των διάφορων συμπλόκων ελέχθησαν οι διακυμάνσεις των ατόμων Ca για κάθε αμινοξύ στις δύο πρωτεΐνες. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται εφικτός ο έλεγχος των επιπτώσεων της πρόσδεσης της καναγλιφλοζίνης, της νταρουναβίρης και της αλυσκίρηνης. Τα αμινοξέα της ρενίνης εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά και στα δύο σύμπλοκα (με νταρουναβίρη και καναγλιφλοζίνη). Οι διακυμάνσεις κυμαίνονται μεταξύ 0,5 Å και 1,5 Å (Εικόνα 7.3γ) και στις δύο περιπτώσεις. Υπάρχουν βέβαια περιοχές που παρουσιάζουν διαφορές στην κινητικότητα. Για παράδειγμα, το αμινοξύ Glu227 εμφανίζει υψηλή κινητικότητα όταν προσδέεται η καναγλιφλοζίνη στη ρενίνη (Εικόνα 7.3γ, κόκκινο), ενώ η Ala49 εμφανίζει υψηλή κινητικότητα κατά την πρόσδεση της νταρουναβίρης (Εικόνα 7.3γ, μαύρο). Όμως, οι σημαντικές

περιοχές του ενζύμου (πτερύγιο και ενεργό κέντρο) εμφανίζονται αρκετά σταθερές και στα δύο σύμπλοκα.

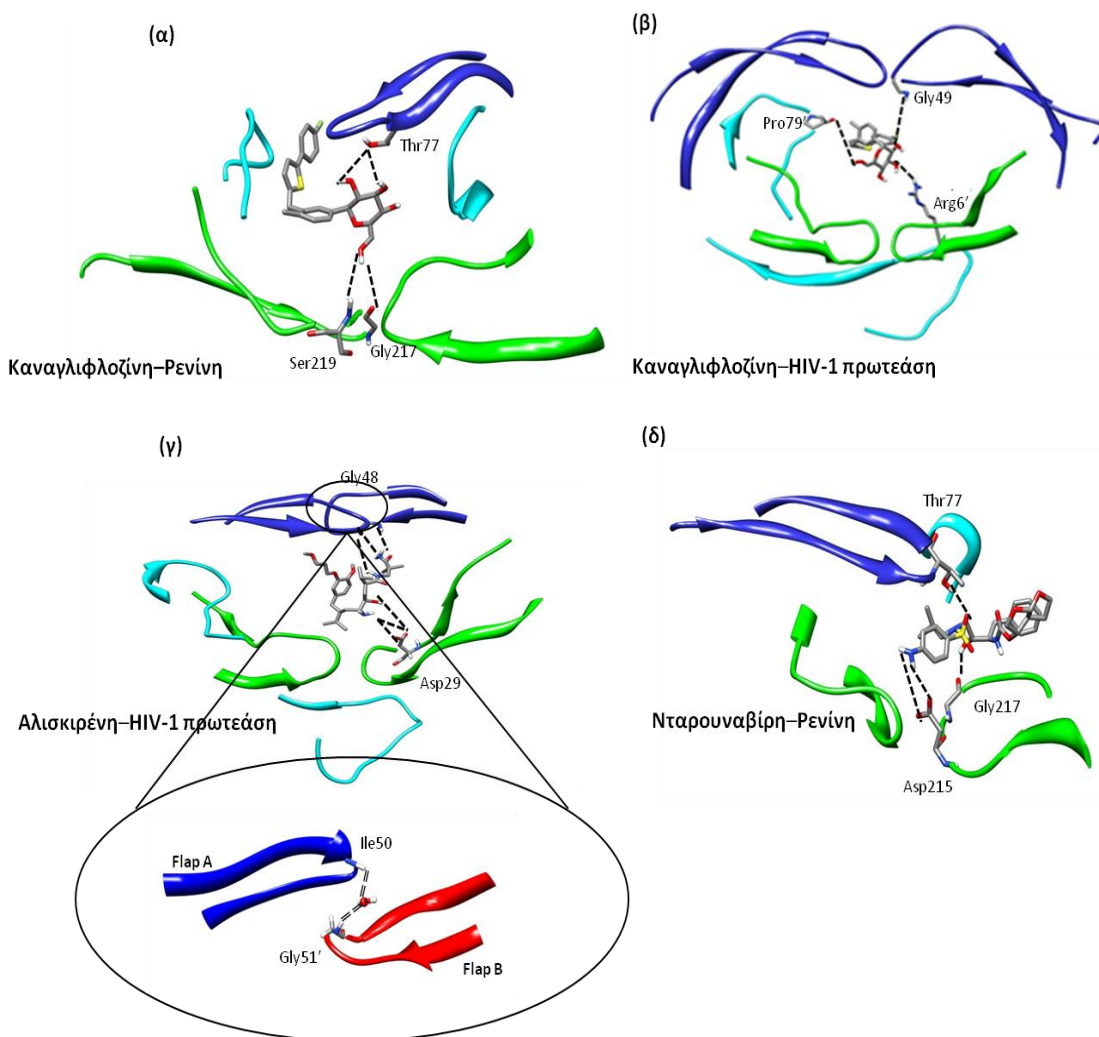
Σε αντίθεση με τη ρενίνη, η πρόσδεση της καναγλιφλοζίνης στην HIV-1 πρωτεάση επιφέρει μεγαλύτερες διακυμάνσεις. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι το πτερύγιο A (Ile50) εμφανίζεται πιο κινητικό (Εικόνα 7.3δ, κόκκινο). Όμως, η πρωτεάση διατηρεί μια σχετικά σταθερή διαμόρφωση κατά την πρόσδεση και των δύο ενώσεων, παρόλο που στο σύμπλοκο HIV-1-καναγλιφλοζίνης εμφανίζει μεγαλύτερη κινητικότητα. Η σταθερότητα του ιικού ενζύμου και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται κυρίως στην περιοχή του ενεργού κέντρου.

Ανάλυση δεσμών υδρογόνου. Σημαντικό σημείο της ανάλυσής, αποτελεί η αναγνώριση των δεσμών υδρογόνου που εμφανίζονται στα διαφορετικά σύμπλοκα. Οι σημαντικότεροι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται στην Εικόνα 7.5 και στον Πίνακα 7.1. Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναστολέων και των πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την ανάλυση των διαμορφωτικών ιδιοτήτων, συμβάλλει στην ολοκληρωμένη κατανόηση του μηχανισμού πρόσδεσης στα δύο ένζυμα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι πληροφορίες για την πρόσδεση της αλισκιρένης στην HIV-1 πρωτεάση. Στον Πίνακα 7.1 παρατηρείται ότι η αλισκιρένη αλληλεπιδρά με τη Gly48, στα πτερύγια της πρωτεάσης καθώς και με αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο (όπως Asp29). Αυτοί οι ΔΥ είναι παρόμοιοι με τις αλληλεπιδράσεις που έχουν παρατηρηθεί μεταξύ της νταρουναβίρης και της HIV-1 πρωτεάσης, σε άλλες εργασίες.²¹⁸ Επομένως, εύλογα συμπεραίνεται ότι η αλισκιρένη έχει παρόμοιο μηχανισμό πρόσδεσης με τη νταρουναβίρη.²³⁰ Στο σύμπλοκο HIV-1-αλισκιρένης παρατηρείται επίσης και η ύπαρξη ενός δεσμού μεταξύ του πτερυγίου A (Ile50)– νερού–πτερυγίου B (Gly51') (Εικόνα 7.5γ). Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση του νερού με τα πτερύγια της πρωτεάσης έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες.²¹⁷ Μάλιστα, επισημαίνεται ότι η αλληλεπίδραση αυτή σταθεροποιεί τα πτερύγια της πρωτεάσης και κατά συνέπεια συμβάλλει στην αποτελεσματική πρόσδεση στο ένζυμο.

Στο σύμπλοκο νταρουναβίρης– ρενίνης παρατηρείται η ύπαρξη αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα στην περιοχή του πτερυγίου (Thr77) και στο ενεργό κέντρο (Asp215 και Gly217). Όπως και για το σύμπλοκο HIV-1

πρωτεάσης– αλισκιρένης, έτσι και σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζονται ομοιότητες με την πρόσδεση της αλισκιρένης στη ρενίνη.⁷² Ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της νταρουναβίρης και του Asp215 εμφανίζεται στα πρώτα 10 ns και στη συνέχεια αντικαθίσταται από το δεσμό υδρογόνου με τη Gly217. Η συγκεκριμένη εναλλαγή των ΔΥ είναι πιθανώς υπεύθυνη για τη διαμορφωτική αλλαγή στο ενεργό κέντρο της ρενίνης, που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα.



Εικόνα 7.5: Κύριοι ΔΥ μεταξύ (α) καναγλιφλοζίνης– ρενίνης (β) καναγλιφλοζίνης– HIV-1 πρωτεάσης (γ) αλισκιρένης– HIV-1 πρωτεάσης (στο ένθετο σχήμα παρουσιάζεται ο ΔΥ μεταξύ των πτερυγίων και ενός μορίου νερού) και (δ) νταρουναβίρης– ρενίνης.

Πίνακας 7.1: Δεσμοί υδρογόνου^α στα διάφορα σύμπλοκα.

Σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης		
Αμινοξέα	Καναγλιφλοζίνη	Αλισκιρένη
Gly49	35,17	
Pro79'	13,63	
Arg6'	13,74	10,15
Gly48		94,46/66,92/10,06 ^β
Asp29		52,70/47,18/44,46/42,01/27,52 ^β

Σύμπλοκα της ρενίνης		
Αμινοξέα	Καναγλιφλοζίνη	Νταρουναβίρη
Thr77	85,33/47,15/27,05 ^β	64,55
Gly217	31,74	41,67
Ser219	14,66	
Asp215		45,54/19,46/11,00 ^β

^α Οι δεσμοί παρουσιάζονται ως % συχνότητα εμφάνισής τους κατά τη ΜΔ. Δεσμοί με ποσοστό μικρότερο του 10% παρελήφθησαν.

^β Πολλαπλοί δεσμοί μεταξύ διαφορετικών ατόμων των αμινοξέων και τον αναστολέων.

Η καναγλιφλοζίνη εμφανίζει ένα σημαντικό δίκτυο δεσμών υδρογόνου και στις δύο πρωτεΐνες. Κατά την πρόσδεση της στη ρενίνη δημιουργείται ένας μόνιμος δεσμός με τη Thr77 ενώ δημιουργούνται και δύο λιγότερο συχνοί ΔΥ με τα αμινοξέα Gly217 και Ser219 στο ενεργό κέντρο (Πίνακας 7.1). Η ύπαρξη αυτών των ΔΥ συμβάλλει σημαντικά στη σταθεροποίηση της ένωσης στην κοιλότητα του ενζύμου και συνεπώς οδηγεί σε μια σταθερή δομή. Σημειώνεται πως η δομική σταθερότητα της Gly217 (βλ. προηγούμενη ενότητα) οφείλεται κυρίως στην αλληλεπίδραση που παρατηρείται με την καναγλιφλοζίνη. Σε αντίθεση με τη ρενίνη, στην HIV-1 πρωτεάση, η καναγλιφλοζίνη δεν αλληλεπιδρά με αμινοξέα στο ενεργό κέντρο. Εμφανίζει ΔΥ με τα πτερύγια (Gly49) καθώς και με τα αμινοξέα Pro79' και Arg6' (Πίνακας 7.1).

Η ανάλυση των ΔΥ στα σύμπλοκα της ρενίνης έδειξε την άμεση συμμετοχή αμινοξέων του ενεργού κέντρου (Asp215 και Gly217) και του προσδέτη. Αντίθετα στα σύμπλοκα της HIV-1 πρωτεάσης τα αμινοξέα που εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου δεν ανήκουν στο ενεργό κέντρο. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει προηγούμενες εργασίες που δείχνουν ότι αρκετοί αναστολείς του ενζύμου αλληλεπιδρούν με αμινοξέα κοντά στο ενεργό

κέντρο ή με αμινοξέα στα πτερύγια της πρωτεάσης και όχι με αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας.²³¹

Έχει αναφερθεί ότι η νταρουναβίρη παρουσιάζει σημαντικές αλληλεπιδράσεις με τη ρενίνη υποδεικνύοντας πιθανή ανασταλτική δράση. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση πως και άλλα φάρμακα της HIV-1 πρωτεάσης μπορεί να έχουν παρόμοια δράση στη ρενίνη. Οι πρώτης γενιάς αναστολείς της HIV-1 πρωτεάσης (σακουιναβίρη, ριτοναβίρη, ιντιναβίρη και νελφίναβίρη) είναι πεπτιδικά ανάλογα με ογκώδεις υδροφοβικές ομάδες.²³¹ Η δράση των συγκεκριμένων αναστολέων επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων όπως οι ΔΥ μεταξύ του φαρμάκου και της πρωτεάσης, καθώς και μέσω αλληλεπιδράσεων υδροφοβικής φύσης.⁹ Επιπλέον, οι αναστολείς της ιικής πρωτεάσης έχουν μία υδροξυλική ομάδα η οποία αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Αυτός ο ΔΥ παρουσιάζεται επίσης και στο σύμπλοκο της ρενίνης με τη νταρουναβίρη (Εικόνα 7.5δ). Οι δεύτερης γενιάς αναστολείς της HIV-1 πρωτεάσης (λοπιναβίρη, αταζαναβίρη, (φος)αμπρεναβίρη, τιπραναβίρη) μπορεί να παρουσιάζουν μεγαλύτερη δράση κατά της ρενίνης σε σχέση με τους αναστολείς 1^{ης} γενιάς. Αυτή η υπόθεση στηρίζεται στη δομική συγγένεια που παρουσιάζουν με τη νταρουναβίρη, η οποία εμφανίζει ικανοποιητική πρόσδεση στη ρενίνη. Οι συγκεκριμένοι αναστολείς σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο πεπτιδικός τους χαρακτήρας, μέσω της αντικατάστασης μιας καρβονυλικής ομάδας με μια σουλφαμιδική (πχ αμπρεναβίρη, τιπραναβίρη). Ο σκοπός αυτής της αντικατάστασης ήταν η αντιμετώπιση συγκεκριμένων παρενεργειών των φαρμάκων της προηγούμενης γενιάς. Επίσης, προστέθηκαν δυο νέες ομάδες, το τετραυδροφουράνιο και το δις-τετραυδροφουράνιο, στην αμπρεναβίρη και τη νταρουναβίρη, αντίστοιχα, με σκοπό την ενίσχυση των δεσμών υδρογόνου με το ένζυμο. Για παράδειγμα η αμπρεναβίρη μπορεί να δημιουργήσει αλληλεπιδράσεις με τη ρενίνη ανάλογες της νταρουναβίρη, λόγω της αμινοφαινολικής ομάδας που δημιουργεί δύο δεσμούς υδρογόνου με το αμινοξύ Asp215 (Εικόνα 7.5δ).

MM-PBSA ανάλυση. Για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MM-PBSA. Η ενεργειακή ισορροπία των συμπλόκων επιτυγχάνεται μετά από περίπου 8 ns. Συνεπώς, για τους

υπολογισμούς των διαφόρων ενεργειών χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα τελευταία 10 ns της ΜΔ. Η περίληψη των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.2. Η νταρουναβίρη παρουσιάζει μικρότερη ελεύθερη ενέργεια κατά την πρόσδεση στη ρενίνη ($\Delta G_{MM-PBSA} = -8,8 \text{ kcal mol}^{-1}$) σε σχέση με την αλισκιρένη όταν αυτή προσδένεται στην HIV-1 πρωτεάση ($\Delta G_{MM-PBSA} = -9,4 \text{ kcal mol}^{-1}$). Η διαφορά ίσως οφείλεται στις διαμορφωτικές αλλαγές που παρατηρούνται στα δύο συστήματα. Όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες ενότητες, η πρόσδεση της αλισκιρένης στην HIV-1 πρωτεάση επιφέρει μικρότερες διαμορφωτικές αλλαγές σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται στο σύμπλοκο νταρουναβίρης– ρενίνης. Η τάση αυτή υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεσμών υδρογόνου. Η αλισκιρένη δημιουργεί μεγαλύτερο αριθμό δεσμών υδρογόνου κατά την πρόσδεση στην HIV-1 πρωτεάση σε σχέση με τη νταρουναβίρη στη ρενίνη (Πίνακας 7.1).

Πίνακας 7.2: Συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (ΔG : kcal mol^{-1}) για τα σύμπλοκα των πρωτεασών όπως υπολογίστηκαν με τη μέθοδο MM-PBSA^α.

Ανάλυση	HIV-1 πρωτεάση		Ρενίνη	
	Αλισκιρένη	Καναγλιφλοζίνη	Νταρουναβίρη	Καναγλιφλοζίνη
ΔE_{elec}	$-32,16 \pm 0,09^{\beta}$	$-30,57 \pm 0,08$	$-29,23 \pm 0,10$	$-31,76 \pm 0,08$
ΔE_{vdW}	$-55,75 \pm 0,08$	$-37,13 \pm 0,08$	$-34,47 \pm 0,08$	$-45,63 \pm 0,07$
ΔE_{MM}	$-87,91 \pm 0,08$	$-67,70 \pm 0,06$	$-63,70 \pm 0,07$	$-77,93 \pm 0,07$
ΔG_{NP}	$-8,59 \pm 0,07$	$-6,35 \pm 0,09$	$-3,62 \pm 0,06$	$-1,07 \pm 0,09$
ΔG_{PB}	$58,95 \pm 0,09$	$40,08 \pm 0,11$	$37,53 \pm 0,11$	$51,54 \pm 0,09$
ΔG_{sol}	$50,36 \pm 0,09$	$33,73 \pm 0,09$	$35,15 \pm 0,08$	$50,47 \pm 0,09$
ΔH	$-37,55 \pm 0,09$	$-33,97 \pm 0,09$	$-28,55 \pm 0,09$	$-27,46 \pm 0,09$
$-T\Delta S$	$28,11 \pm 0,29$	$24,50 \pm 0,24$	$19,72 \pm 0,27$	$18,34 \pm 0,29$
$\Delta G_{\text{MM-PBSA}}$	$-9,44 \pm 0,30$	$-9,47 \pm 0,39$	$-8,83 \pm 0,30$	$-9,12 \pm 0,33$
$\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}^{\gamma}$	-10,12	-10,91	-11,01	-10,34
K_i	$76,5^{\delta}$	628^{δ}	261^{ϵ}	159^{ϵ}
$\Delta G_{\text{exp}}^{\sigma\tau}$	-9,55	-8,32		

^α Παρουσιάζονται επίσης και οι πειραματικές τιμές K_i καθώς και τα αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης.

^β Οι τιμές του τυπικού σφάλματος (SE) υπολογίζονται ως: $SE = \text{Τυπική απόκλιση}/N^{1/2}$, όπου N είναι ο αριθμός των στιγμιότυπων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό MM-PBSA (N=100 για την εντροπία, και N=1250 για όλους τους υπόλοιπους υπολογισμούς).

^γ Η τιμή $\Delta G_{\text{πρόσδεσης}}$ υπολογίστηκε με το λογισμικό DOCK6.

^δ Πειραματικές τιμές K_i σε nM. ^ε Θεωρητικές τιμές K_i σε nM στους 293,15 K.

^{στ} ΔG_{exp} υπολογισμένα μέσω της εξίσωσης $\Delta G_{\text{exp}} = RT \ln K_i$ στους 293,15 K από τις αντίστοιχες πειραματικές τιμές K_i .

Όσον αφορά στην καναγλιφλοζίνη, οι υπολογισμοί έδειξαν ότι έχει υψηλή ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης και στις δύο πρωτεΐνες ($\Delta G_{MM-PBSA} = -9,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ και $\Delta G_{MM-PBSA} = -9,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ για την HIV-1 πρωτεάση και τη ρενίνη, αντίστοιχα). Σύμφωνα με την ανάλυση των δομικών χαρακτηριστικών των συμπλόκων, καναγλιφλοζίνης– HIV–1 πρωτεάσης και καναγλιφλοζίνης– ρενίνης, παρατηρήθηκε ότι η καναγλιφλοζίνη εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερότητα στη ρενίνη. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της ενεργειακής ανάλυσης παρουσιάζουν τη συγκεκριμένη ένωση ως πιθανό αναστολέα και των δύο ενζύμων. Η ανάλυση των διαφορετικών συνεισφορών στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης καταδεικνύει την ευνοϊκή επίδραση των van der Waals και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων σε όλα τα σύμπλοκα που μελετήθηκαν. Επίσης σημαντική συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης έχει και η μη-πολική (non-polar) επίδραση στην ενέργεια επιδιαλυτότητας.

Το επόμενο βήμα είναι η ανάλυση της ενεργειακής συνεισφοράς μεμονωμένων αμινοξέων με σκοπό να εξεταστούν οι βασικές επιδράσεις στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης. Η πλειονότητα των αμινοξέων, που εξετάστηκαν, βρίσκονται είτε στην κοιλότητα πρόσδεσης ή στην περιοχή των πτερυγίων και για τις δύο πρωτεάσες (Εικόνα 7.5). Τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο της HIV-1 πρωτεάσης και της ρενίνης παρουσιάζουν σημαντικές συνεισφορές στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης και στα δύο σύμπλοκα της καναγλιφλοζίνης. Επίσης, το αμινοξύ Ile50 εμφανίζει μεγάλη συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης παρόλο που η περιοχή των πτερυγίων της HIV-1 πρωτεάσης παρουσιάζει μεγάλη κινητικότητα στο σύμπλοκο με την καναγλιφλοζίνη. Τα σύμπλοκα νταρουναβίρης– ρενίνης και αλισκιρένης-HIV-1 πρωτεάσης έχουν παρόμοια συμπεριφορά όσον αφορά την ενέργεια πρόσδεσης. Και σε αυτές τις περιπτώσεις τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο εμφανίζουν μεγάλη συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης. Επιπλέον, ελέγχθηκε η συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια που απορρέει από την αλληλεπίδραση μεταξύ του προσδέτη και του ενζύμου (Πίνακας 7.3). Η ανάλυση επιβεβαίωσε ότι οι αλληλεπιδράσεις van der Waals και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις έχουν τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην ενέργεια πρόσδεσης και στα τέσσερα σύμπλοκα (Εικόνα 7.6). Συγκεκριμένα,

τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο της ρενίνης, Asp215 και Gly217, παρουσιάζουν αυξημένες ηλεκτροστατικές και van der Waals αλληλεπιδράσεις και στο δύο σύμπλοκα με νταρουναβίρη και καναγλιφλοζίνη. Επίσης, στην HIV-1 πρωτεάση τα αμινοξέα Gly49 (στα πτερύγια) και Asp29 αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών van der Waals με την καναγλιφλοζίνη και την αλίσκιρην, αντίστοιχα. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι στο σύμπλοκο καναγλιφλοζίνης– ρενίνης το αμινοξύ Asp215 έχει μεγάλη συνεισφορά μέσω van der Waals και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, αν και δε συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου. Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζουν τα αμινοξέα Asp25 και Asp25' στο σύμπλοκο της αλίσκιρηνς με την HIV-1 πρωτεάση.

Πίνακας 7.3: Συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια (σε kcal mol⁻¹) που απορρέει από την αλληλεπίδραση μεταξύ του προσδέτη και του ενζύμου.

Σύμπλοκο Καναγλιφλοζίνης– Ρενίνης

Ζεύγη αλληλεπιδράσεων	van der Waals	Ηλεκτροστατικές	Πολικές
Προσδέτης- Thr77	-0,001	0,087	-0,092
Προσδέτης- Asp215	-0,706	-3,593	2,693
Προσδέτης- Thr216	-0,053	0,018	-0,005
Προσδέτης- Gly217	-0,376	0,557	0,411
Προσδέτης- Asp3	-0,137	-0,010	0,054

Σύμπλοκο Νταρουναβίρης– Ρενίνης

Ζεύγη αλληλεπιδράσεων	van der Waals	Ηλεκτροστατικές	Πολικές
Προσδέτης- Thr77	-0,001	-0,394	0,392
Προσδέτης- Asp32	-0,012	0	0,006
Προσδέτης- Asp215	-0,391	4,509	2,979
Προσδέτης- Thr216	-0,071	0,035	-0,012
Προσδέτης- Gly217	0,944	-0,502	-0,395

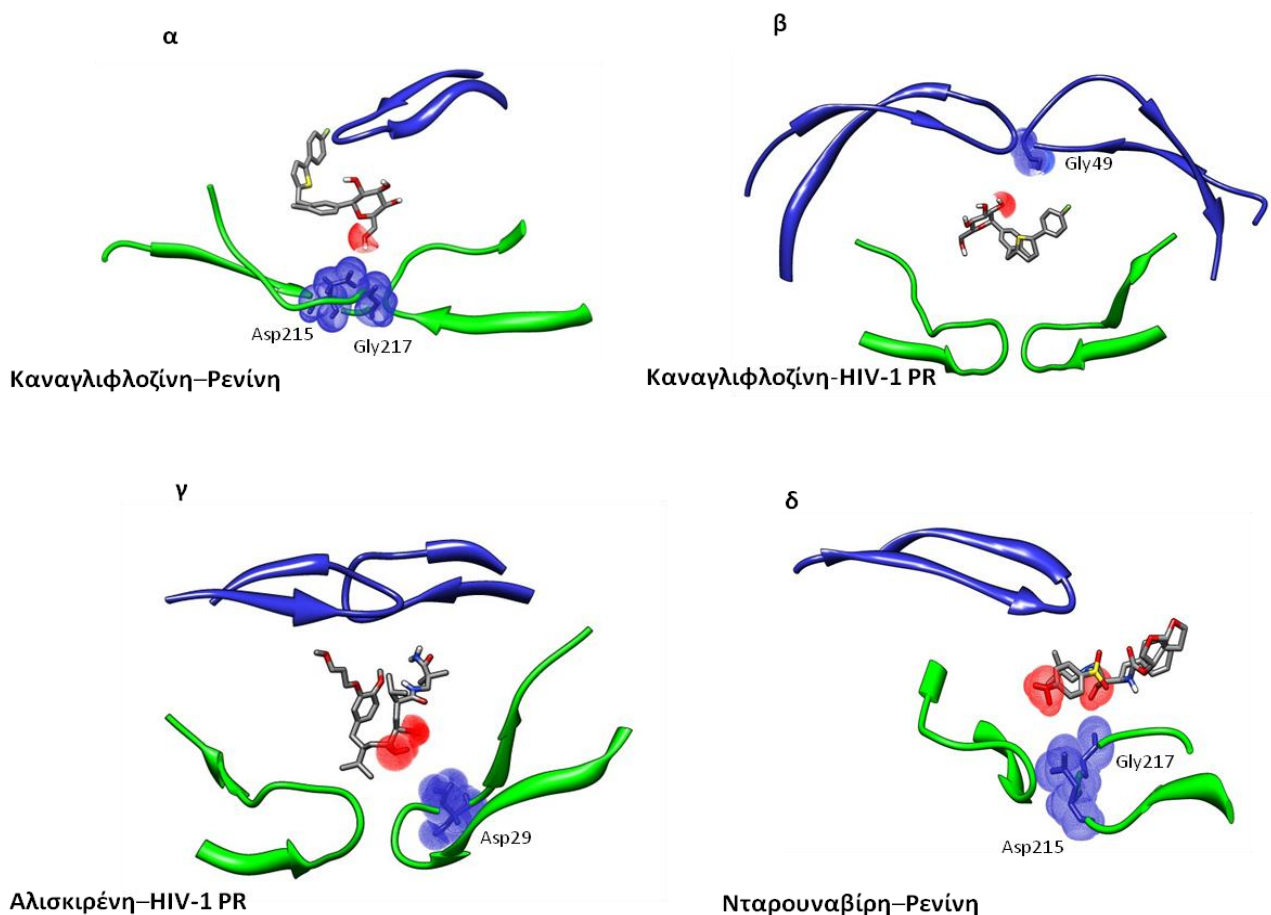
Σύμπλοκο Καναγλιφλοζίνης– HIV–1 πρωτεάσης

Ζεύγη αλληλεπιδράσεων	van der Waals	Ηλεκτροστατικές	Πολικές
Προσδέτης- Gly49	-0,320	0,005	0,104
Προσδέτης- Pro79	-0,029	-0,078	0,073
Προσδέτης- Arg6'	-0,003	0,044	-0,042
Προσδέτης- Asp25	-0,022	0,463	-0,415
Προσδέτης- Thr26	-0,009	0,002	-0,003
Προσδέτης- Gly27	-0,040	0,061	-0,059
Προσδέτης- Asp25'	-0,017	0,585	-0,543
Προσδέτης- Thr26'	-0,004	-0,004	-0,004

Προσδέτης- Gly27'	-0,005	-0,035	0,031
-------------------	--------	--------	-------

Σύμπλοκο Αλισκιρένης- HIV-1 πρωτεάσης

Ζεύγ αλληλεπιδράσεων	van der Waals	Ηλεκτροστατικές	Πολικές
Προσδέτης- Gly48	-0,021	0,100	0,002
Προσδέτης- Asp29	-0,176	0,869	-0,835
Προσδέτης- Arg6'	-0,005	0,030	0,028
Προσδέτης- Asp25	-0,033	-0,215	0,186
Προσδέτης- Thr26	-0,015	0,025	-0,022
Προσδέτης- Gly27	-0,079	0,096	-0,110
Προσδέτης- Asp25'	-0,017	-0,534	0,468
Προσδέτης- Thr26'	-0,006	-0,014	-0,012
Προσδέτης- Gly27'	-0,004	-0,041	-0,033



Εικόνα 7.6: Σημαντικές ηλεκτροστατικές και van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδέτη (κόκκινο) και επιλεγμένων αμινοξέων (μπλε).

Οι πειραματικές μετρήσεις για την αναστολή της HIV-1 πρωτεάσης από την αλισκιρένη και την καναγλιφλοζίνη έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα με τη θεωρητική ανάλυσή μας. Η αλισκιρένη παρουσιάζει ικανοποιητική

ανασταλτική δράση κατά της ιικής πρωτεάσης με τιμές $K_i = 76,5 \pm 5$ nM και $\Delta G_{\text{πειρ.}} = -9,6$ kcal mol⁻¹ στους 293 K. Η διαφορά μεταξύ της πειραματικής και της θεωρητικής τιμής είναι 1,2 %. Αντίστοιχα, η καναγλιφλοζίνη εμφανίζει τιμές $K_i = 628 \pm 16$ nM και $\Delta G_{\text{πειρ.}} = -8,3$ kcal mol⁻¹, περίπου 1 kcal mol⁻¹ υψηλότερη τιμή σε σχέση με τη θεωρητική μας τιμή. Μία πιθανή εξήγηση για αυτή τη διαφορά είναι οι διαφορετικές δομές των δύο ουσιών, καθώς η καναγλιφλοζίνη μπορεί να αποτρέπει τη δημιουργία πολλών δεσμών υδρογόνου σε σχέση με την αλισκιρένη. Η θεωρητική ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης για το σύμπλοκο νταρουναβίρης-HIV-1 πρωτεάσης υπολογίστηκε στα -11,46 kcal mol⁻¹ ($K_i = 2,86$ nM), τιμή που συμφωνεί με τα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα ($K_i = 0,5$ nM και $\Delta G = -12,48$ kcal mol⁻¹).

Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα όσον αφορά την αναστολή των ασπαρτικών πρωτεασών από τη νταρουναβίρη και την αλισκιρένη, εκτελέστηκαν υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης και σε πέντε ακόμα πρωτεάσες –πεπσίνη, β-σεκρετάση 1 (BACE-1), πρωτεάση του ιού λευκαϊμίας T-λεμφοκυττάρων (human T-cell leukemia virus protease, HTLV-1), πλασμεψίνη 2 και μεμαψίνη 2.²³¹ Οι υπολογισμοί κατέδειξαν ότι οι δύο αυτές ουσίες μπορούν να προκαλέσουν αναστολή και σε άλλες ασπαρτικές πρωτεάσες (Πίνακας 7.4). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι για τις BACE-1, πλασμεψίνη 2 και μεμαψίνη 2 η αναστολή είναι παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται στην HIV-1 πρωτεάση και τη ρενίνη. Όμως στις πρωτεΐνες που μοιάζουν δομικά με τη ρενίνη, όπως την πεπσίνη και τη BACE-1, η αλισκιρένη έχει μεγαλύτερη επίδραση σε σχέση με τη νταρουναβίρη. Το αντίθετο συμβαίνει στα ένζυμα που μοιάζουν δομικά με την HIV-1 πρωτεάση όπως είναι η HTLV-1 πρωτεάση.

Οι περισσότερες ασπαρτικές πρωτεάσες, όπως η HIV-1 πρωτεάση και η μεμαψίνη 2, παρουσιάζουν μικρή επιλεκτικότητα στα υποστρώματά τους. Αντιθέτως μερικά από τα ένζυμα (π.χ. πεπσίνη και ρενίνη) τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση διαφόρων φυσιολογικών λειτουργιών ενός οργανισμού, εμφανίζουν μεγάλη επιλεκτικότητα όσον αφορά τα υποστρώματα. Αυτή η διαφοροποίηση δημιουργεί εμπόδια στο σχεδιασμό ισχυρότερων αναστολέων. Η παρούσα εργασία επιβεβαιώνει αυτήν την παρατήρηση καθώς η πεπσίνη εμφανίζει μεγάλη επιλεκτικότητα στην

αλισκιρένη. Αντίθετα, παρατηρήθηκε πως για όλα τα υπόλοιπα ένζυμα εμφανίζεται μικρή επιλεκτικότητα όσον αφορά τα δύο φάρμακα. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η κοιλότητα πρόσδεσης στις ασπαρτικές πρωτεάσες διαμορφώνει την επιλεκτικότητα. Συνεπώς, η οποιαδήποτε διαμορφωτική αλλαγή στις κοιλότητες των ενζύμων που παρατηρείται κατά την πρόσδεση διαφορετικών ουσιών ορίζει το εύρος της συγκεκριμένης ιδιότητας.²³¹ Είναι σημαντικό λοιπόν, κατά το σχεδιασμό νέων αναστολέων, να δοθεί έμφαση στα διαμορφωτικά χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών που δεν παρουσιάζουν κάποια σημαντική αλλαγή κατά την πρόσδεση. Είναι επίσης σημαντικό να αξιοποιηθούν οι πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος, το φορτίο, την υδροφοβικότητα αλλά και τη δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου μέσα στις κοιλότητες πρόσδεσης κατά το σχεδιασμό νέων φαρμάκων.

Πίνακας 7.4: Θεωρητικές τιμές για την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης όπως υπολογίστηκαν με το πρόγραμμα DOCK για την αλισκιρένη και τη νταρουναβίρη σε διάφορα μέλη των ασπαρτικών πρωτεασών.

	ΔG (kcal mol ⁻¹)	
	Αλισκιρένη	Νταρουναβίρη
HTLV-1 πρωτεάση	-5,65	-6,31
Πεπσίνη	-7,37	-4,68
BACE-1	-8,43	-8,72
Πλασμεπσίνη	-9,10	-9,06
Μεμαπσίνη-2	-8,89	-8,95
HIV-1 πρωτεάση	-13,79	-10,12
Ρενίνη	-13,72	-11,02

7.3 Συμπεράσματα

Αναφέρθηκε ότι η καναγλιφλοζίνη είναι ένα πειραματικό φάρμακο κατά του διαβήτη τύπου 2²²⁷ και αποτελεί αναστολέα του καναλιού Na⁺/γλυκόζης 2 (sodium/glucose co-transporter 2- SGLT-2).²²⁹ Για την πρωτεΐνη αυτή δεν έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα κάποια κρυσταλλική δομή στον άνθρωπο. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η δομή της vSGLT, η οποία είναι ομόλογη της αντίστοιχης ανθρώπινης. Η κοιλότητα πρόσδεσης της vSGLT ορίζεται από τα αμινοξέα Trp264, Lys294, Tyr87, Glu88, Ser91, Tyr69, Glu87 και Asn260, και δεν παρουσιάζει καμιά ομοιότητα με το ενεργό κέντρο είτε της HIV-1 πρωτεάσης,

είτε της ρενίνης. Όμως, οι υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης στην vSGLT με την αλισκιρένη και τη νταρουναβίρη έδειξαν ότι τα δύο φάρμακα εμφανίζουν ανασταλτική δράση ($\Delta G_{\text{πρόσδεσης}} = -6,4$ και $-6,2$ kcal mol⁻¹, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας αποτυπώνουν τη συσχέτιση τριών διαφορετικών πρωτεϊνών (HIV-1 πρωτεάση, ρενίνη και SGLT-2) σε μοριακό επίπεδο.

Εμπορικά φάρμακα κατά της υπέρτασης (αλισκιρένη) και κατά του AIDS (νταρουναβίρη) παρουσιάζουν ανασταλτική δράση στην HIV-1 πρωτεάση και τη ρενίνη αντίστοιχα. Η πρόσδεση της αλισκιρένης ($\Delta G_{MM-PBSA} = -9,4$ kcal mol⁻¹ και $\Delta G_{\text{πειρ.}} = -9,5$ kcal mol⁻¹), οφείλεται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις van der Waals ($\Delta G_{vdW.} = -55,8$ kcal mol⁻¹) και σε μη πολικές αλληλεπιδράσεις ($\Delta G_{NP.} = -8,6$ kcal mol⁻¹). Παρατηρήθηκε πως η αλισκιρένη δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα στα πτερύγια (Gly48) και με αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο (Asp29) της HIV-1 πρωτεάσης. Το αποτέλεσμα είναι η σταθερότερη πρόσδεση της αλισκιρένης στο ιικό ένζυμο. Αντίστοιχα, η νταρουναβίρη εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά κατά την πρόσδεσή της στη ρενίνη ($\Delta G_{MM-PBSA} = -8,8$ kcal mol⁻¹). Οι ΔΥ, όπως και στο σύμπλοκο αλισκιρένης-HIV-1 πρωτεάσης, εμφανίζονται μεταξύ του φαρμάκου και αμινοξέων στο πτερύγιο (Thr77) της ρενίνης και αμινοξέων στο ενεργό κέντρο της (Asp215, Gly217). Όμως, η πρόσδεση της νταρουναβίρης στη ρενίνη οφείλεται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις van der Waals ($\Delta G_{vdW.} = -34,5$ kcal mol⁻¹) και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ($\Delta G_{\eta\lambda\epsilon\kappa.} = -22,2$ kcal mol⁻¹). Η διπλή δράση της αλισκιρένης και της νταρουναβίρης καταδεικνύει κοινά λειτουργικά στοιχεία στα δύο ένζυμα, συμβάλλοντας στην καλύτερη κατανόηση της σχέσης των δύο ασθενειών όπως έχει ήδη αποτυπωθεί σε κλινικό επίπεδο.^{210,232-234}

Εκτός από την αναστολή της vSGLT από την αλισκιρένη και τη νταρουναβίρη, παρατηρήθηκε η ικανοποιητική αναστολή των ασπαρτικών πρωτεασών (HIV-1 πρωτεάση και ρενίνη) από το αντιδιαβητικό φάρμακο καναγλιφλοζίνη. Μάλιστα η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης της καναγλιφλοζίνης είναι παραπλήσια και στις δύο πρωτεάσες ($\Delta G_{MM-PBSA} = -9,5$ kcal mol⁻¹ και $\Delta G_{MM-PBSA} = -9,1$ kcal mol⁻¹ για HIV-1 πρωτεάση και ρενίνη, αντίστοιχα). Η συσχέτιση του AIDS και του διαβήτη έχει παρατηρηθεί σε

κλινικές μελέτες.^{233,235} Συνεπώς, η χρήση της δομής της καναγλιφλοζίνης στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων μπορεί να συμβάλλει στην καταπολέμηση των ανεπιθύμητων ενεργειών που εμφανίζονται σε ασθενείς με AIDS συμβάλλοντας στη βελτίωση της ποιότητας ζωής τους. Τέλος, η αναστολή της ρενίνης από τη καναγλιφλοζίνη καταδεικνύει την πιθανή σχέση μεταξύ υπέρτασης και διαβήτη. Επομένως, γίνεται εφικτή η αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση διαφορετικών συμπτωμάτων μιας ασθένειας με τη χρήση ενός φαρμάκου αποφεύγοντας τη λήψη πολλαπλών σκευασμάτων και μειώνοντας των κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλών παρενεργειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

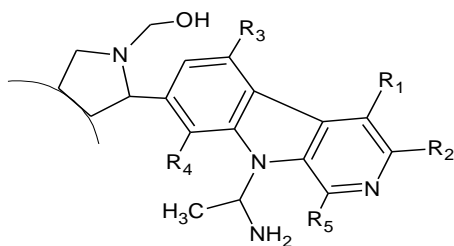
Γενικά Συμπεράσματα

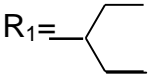
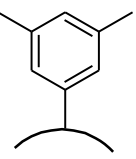
Ο σχεδιασμός καινοτόμων φαρμάκων, έχει γνωρίσει τα τελευταία χρόνια μια άνθηση με την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων θεωρητικών και πειραματικών τεχνικών. Στην παρούσα μελέτη, γίνεται χρήση συγκεκριμένων υπολογιστικών μεθόδων με σκοπό την κατανόηση της λειτουργίας των ασπартικών πρωτεασών –HIV-1 πρωτεάσης και ρενίνης– και του μηχανισμού αναστολής τους. Απώτερος στόχος είναι η σχεδίαση καινοτόμων αναστολέων των δύο ενζύμων για την αντιμετώπιση της ασθένειας AIDS και του παράγοντα επικινδυνότητας της υπέρτασης.

Μια ομάδα ουσιών που έχει συνδεθεί με την αναστολή της HIV-1 πρωτεάσης είναι τα φουλερένια (Κεφάλαιο 4). Η χρήση των τρισδιάστατων σχέσεων δομής δράσης (3D-QSAR), συμβάλλει στη βαθύτερη κατανόηση του ρόλου των διαφορετικών λειτουργικών ομάδων μιας ένωσης στον τρόπο αλληλεπίδρασης με το μόριο στόχο (πρωτεΐνη). Χρησιμοποιώντας μια βάση 51 φουλερενικών παραγώγων, δημιουργήθηκαν τα μοντέλα CoMFA και CoMSIA. Η ανάλυση των δεδομένων κατέδειξε τη σημασία των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων στην πρόσδεση των μορίων στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης. Με βάση τα αποτελέσματα, σχεδιάστηκε μια σειρά φουλερενικών παραγώγων, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα (Πίνακας 8.1).

Μία δεύτερη στρατηγική, για τη βελτίωση της ανασταλτικής ικανότητας των φουλερενίων, ήταν η χρήση τμημάτων του φαρμάκου σακουιναβίρη στο σχεδιασμό νέων πλευρικών αλυσίδων για το φουλερένιο. Οι ενώσεις με την ισχυρότερη ενέργεια πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2. Για την κατανόηση των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αναστολέα και της HIV-1 πρωτεάσης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ΜΔ. Τα αποτελέσματα των θεωρητικών υπολογισμών κατέδειξαν τη σημασία των δεσμών υδρογόνου με αμινοξέα τα οποία χωρικά ήταν πλησίον του ενεργού κέντρου (Asp29/29', Asp30/30') ή στα πτερύγια (Gly48/48') της πρωτεάσης.

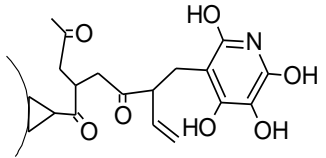
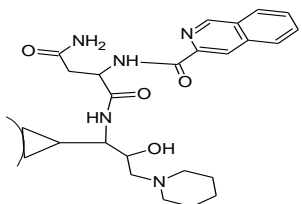
Πίνακας 8.1: Υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης των παραγώγων με βάση την ένωση **18** (CoMSIA).

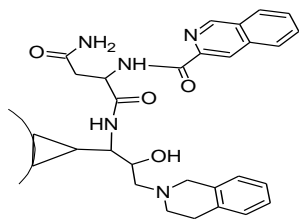


Ένωση	Υποκαταστάτες	Υπολογισμένη ενέργεια πρόσδεσης (kcal mol ⁻¹)
18	R ₁ = R ₂ = R ₃ = R ₄ =R ₅ = -H	-10.82
75	R ₁ = 	-14.02
77	R ₃ = 	-13.45
79	R ₂ = -COOH	-14.08

Τα αποτελέσματα της ΜΔ επιβεβαιώνονται περαιτέρω από την ενεργειακή ανάλυση, μέσω της μεθόδου MM-PBSA. Παρατηρήθηκε ότι οι σημαντικότερες συνεισφορές στην ενέργεια πρόσδεσης οφείλονται στις van der Waals και μη πολικές αλληλεπιδράσεις (ΔE_{vdW} και ΔG_{NP}).

Πίνακας 8.2: Προτεινόμενες δομές και υπολογισμένες ενέργειες πρόσδεσης.

Αρ.	Ένωση	Υπολογισμένη ενέργεια πρόσδεσης (kcal mol ⁻¹)
87		-15.93
95		-15.83



Η χρήση των λειτουργικών ομάδων της σακουιναβίρης στο σχεδιασμό φουλερενικών παραγώγων (Κεφάλαιο 4), μπορεί να συμβάλλει στην ευρύτερη κατανόηση του μηχανισμού αναστολής της πρωτεάσης. Η κατανόηση της μοριακής βάσης του μηχανισμού δράσης θα βοηθήσει στην αντιμετώπιση της ασθένειας AIDS γιατί ένα από τα σημαντικότερα της προβλήματα αποτελεί η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του ιού στα εμπορικά φάρμακα.

Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων της σακουιναβίρης σε ανθεκτικά στελέχη του ιού (Κεφάλαιο 5), μέσω της ΜΔ και η ανάλυση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, κατέδειξαν τη σημαντική αρνητική επίδραση μεταλλάξεων όπως οι: G48V, L63P και I84V. Οι διαμορφωτικές αλλαγές του φαρμάκου στο ενεργό κέντρο δεν επηρεάζουν σημαντικά την πρόσδεσή του. Αντίθετα, σημαντικός είναι ο ρόλος συγκεκριμένων περιοχών του ενζύμου, όπως τα πτερύγια. Η παρατήρηση αυτή γίνεται κατανοητή από τη μείωση της ανασταλτικής δράση του φαρμάκου σε μεταλλαγμένα στελέχη (G48V, L63P, L10I, G73S), όπου παρατηρείται αύξηση της κινητικότητας των πτερυγίων. Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις της σακουιναβίρης με τα αμινοξέα στην περιοχή του ενεργού κέντρου (Asp25/25'/29/29'/30/30') και των πτερυγίων της πρωτεάσης, επιτελούν σημαντικό ρόλο στην αναστολή του ενζύμου.

Μια εξίσου σημαντική ασπαρτική πρωτεάση είναι η ρενίνη, που έχει συνδεθεί με την υπέρταση γιατί στο σύστημα RAS βοηθά στην παραγωγή της αγγειοσυσταλτικής ορμόνης Αγγειοτασίνης II. Στην παρούσα εργασία (Κεφάλαιο 6), με τη χρήση των ίδιων τεχνικών όπως και στην HIV-1 πρωτεάση, γίνεται ανάλυση των αλληλεπιδράσεων του συμπλόκου αλισκιρένης-ρενίνης. Οι θεωρητικοί υπολογισμοί κατέδειξαν την ύπαρξη ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου. Όπως και στην ιική πρωτεάση, τα αμινοξέα στο ενεργό κέντρο (Asp32/215, Gly34) και στο πτερύγιο της ρενίνης (Arg74, Ser76) συμβάλλουν σημαντικά στην πρόσδεση του αναστολέα στην κοιλότητα και κατ' επέκταση στην ισχυρή αναστολή του ενζύμου. Οι

σημαντικότερες συνεισφορές στην ενέργεια πρόσδεσης της αλισκιρένης προέρχονται από τις αλληλεπιδράσεις van der Waals και τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις.

Τα κοινά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά, της HIV-1 πρωτεάσης και της ρενίνης, αναδεικνύουν την δυνατότητα σχεδιασμού αναστολέων με διπλή δράση. Στο Κεφάλαιο 7 επιτελείται μια συγκριτική μελέτη των δύο ασπαρτικών πρωτεάσεων. Συγκεκριμένα, με τη χρήση της ΜΔ, αναλύονται οι διαμορφωτικές αλλαγές και οι αλληλεπιδράσεις στα σύμπλοκα ρενίνης-νταρουναβίρης και HIV-1 πρωτεάσης-αλισκιρένης. Παρατηρήθηκε λοιπόν, ότι και με την αλισκιρένη δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου με αμινοξέα στα περύγια (Gly48) και με αμινοξέα κοντά στο ενεργό κέντρο (Asp29) της HIV-1 πρωτεάσης. Η αντιική δράση της αλισκιρένης φαίνεται και από τον υπολογισμό της ενέργειας πρόσδεσης μέσω θεωρητικών και πειραματικών τεχνικών ($\Delta G_{MM-PBSA} = -9,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ και $\Delta G_{πειρ.} = -9,5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Επίσης, παρατηρήθηκε πως η νταρουναβίρη στη ρενίνη εμφανίζει παρόμοιες αλληλεπιδράσεις με την αλισκιρένη (Κεφάλαιο 7). Μάλιστα, όπως και με στην HIV-1 πρωτεάση, οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται μεταξύ νταρουναβίρης και αμινοξέων στο περύγιο (Thr77) και στο ενεργό κέντρο (Asp215, Gly217) της ρενίνης. Η διπλή δράση της αλισκιρένης και της νταρουναβίρης καταδεικνύουν τη σχέση μεταξύ AIDS και υπέρτασης σε μοριακό επίπεδο, επιβεβαιώνοντας κλινικές μελέτες που αναφέρονται σε αυτήν τη σχέση.^{210,232-234}

Τέλος, στο Κεφάλαιο 7, καταγράφεται η συσχέτιση παραγόντων που προκαλούν την υπέρταση (ρενίνη) και το AIDS (HIV-1 πρωτεάση) με το διαβήτη. Συγκεκριμένα, αναφέρεται η διπλή δράση της καναλιφλοζίνης, η όποια είναι ένα πειραματικό φάρμακο κατά του διαβήτη τύπου 2²²⁷ και αποτελεί αναστολέα του διαύλου Na^+ /γλυκόζης 2 (sodium/glucose co-transporter 2- SGLT-2). Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης της καναλιφλοζίνης είναι παραπλήσια και στις δύο πρωτεάσες ($\Delta G_{MM-PBSA} = -9,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ και $\Delta G_{MM-PBSA} = -9,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ για HIV-1 πρωτεάση και ρενίνη, αντίστοιχα). Επίσης, οι υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης στην vSGLT με την αλισκιρένη και τη νταρουναβίρη έδειξαν ότι τα δύο φάρμακα εμφανίζουν ικανοποιητική πρόσδεση ($\Delta G_{πρόσδεσης} = -6,4$ και $-6,2 \text{ kcal mol}^{-1}$, αντίστοιχα). Συνεπώς, η

δομή της καναγλιφλοζίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων και να συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση διαφορετικών συμπτωμάτων μιας ασθένειας με τη χρήση ενός σκευάσματος. Έτσι, γίνεται πιθανή η αποφυγή λήψης πολλών σκευασμάτων και μειώνεται ο κίνδυνος εμφάνισης πολλαπλών ανεπιθύμητων ενεργειών.

Η ανάλυση διαφορετικών βιολογικών συστημάτων μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σημαντικός παράγοντας, στο σχεδιασμό καινοτόμων αναστολέων, δεν είναι μόνο η ισχυρή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου ή ενός υποδοχέα. Η παράμετρος αυτή γίνεται εμφανής κυρίως σε λοιμώδη νοσήματα, όπως το AIDS. Η εμφάνιση ανθεκτικών ιικών στελεχών στα διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα απαιτεί τη βαθύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκου και ενζύμου. Απαραίτητη προϋπόθεση, λοιπόν, στο σχεδιασμό καινοτόμων αναστολέων είναι και η διατήρηση συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων στην περιοχή πρόσδεσης του φαρμάκου. Τέλος, κατά το σχεδιασμό νέων φαρμάκων σημαντική παράμετρος είναι η πολλαπλή δράση του. Η αντιμετώπιση πολλαπλών συμπτωμάτων με τα λιγότερα δυνατά σκευάσματα, αποτελεί σημαντικό όφελος για τον ασθενή, καθώς μπορεί να μειωθεί δραστικά η εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών. Γενικά, η πολλαπλή στόχευση ιδιαίτερα πολυπαραγοντικών ασθενειών όπως είναι οι καρδιοαγγειακές και ιικές παθήσεις είναι αναγκαία για την καταπολέμησή τους.

Βιβλιογραφία

- (1) Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Rozenbaum, W.; Montagnier, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *Science* **1983**, *220*, 868-871.
- (2) Gallo, R. C.; Sarin, P. S.; Gelmann, E. P.; Robert-Guroff, M.; Richardson, E.; Kalyanaraman, V. S.; Mann, D.; Sidhu, G. D.; Stahl, R. E.; Zolla-Pazner, S.; Leibowitch, J.; Popovic, M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *Science* **1983**, *220*, 865-867.
- (3) McMichael, A. J.; Borrow, P.; Tomaras, G. D.; Goonetilleke, N.; Haynes, B. F. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development *Nat Rev Immunol* **2010**, *10*, 11-23.
- (4) Cadogan, M.; Dalglish, A. G. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention *Lancet Infect Dis* **2008**, *8*, 675-684.
- (5) UNAIDS World AIDS report | 2011 <http://www.unaids.org/en/>
- (6) Mastrolorenzo, A.; Rusconi, S.; Scozzafava, A.; Barbaro, G.; Supuran, C. T. Inhibitors of HIV-1 protease: current state of the art 10 years after their introduction. From antiretroviral drugs to antifungal, antibacterial and antitumor agents based on aspartic protease inhibitors *Curr Med Chem* **2007**, *14*, 2734-2748.
- (7) Dandache, S.; Sevigny, G.; Yelle, J.; Stranix, B. R.; Parkin, N.; Schapiro, J. M.; Wainberg, M. A.; Wu, J. J. In vitro antiviral activity and cross-resistance profile of PL-100, a novel protease inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, *51*, 4036-4043.
- (8) Wensing, A. M.; van Maarseveen, N. M.; Nijhuis, M. Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance *Antiviral Res* **2010**, *85*, 59-74.
- (9) Gustchina, A.; Sansom, C.; Prevost, M.; Richelle, J.; Wodak, S. Y.; Wlodawer, A.; Weber, I. T. Energy calculations and analysis of HIV-1 protease-inhibitor crystal structures *Protein Eng* **1994**, *7*, 309-317.
- (10) Ghosh, A. K.; Ramu Sridhar, P.; Kumaragurubaran, N.; Koh, Y.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. Bis-tetrahydrofuran: a privileged ligand for darunavir and a new generation of hiv protease inhibitors that combat drug resistance *ChemMedChem* **2006**, *1*, 939-950.
- (11) Barbaro, G.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. Highly active antiretroviral therapy: current state of the art, new agents and their pharmacological interactions useful for improving therapeutic outcome *Curr Pharm Des* **2005**, *11*, 1805-1843.
- (12) Hammer, S. M.; Squires, K. E.; Hughes, M. D.; Grimes, J. M.; Demeter, L. M.; Currier, J. S.; Eron, J. J., Jr.; Feinberg, J. E.; Balfour, H. H., Jr.; Deyton, L. R.; Chodakewitz, J. A.; Fischl, M. A. A controlled trial of two nucleoside analogues plus zidovudine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team *N Engl J Med* **1997**, *337*, 725-733.
- (13) Buzon, M. J.; Massanella, M.; Llibre, J. M.; Esteve, A.; Dahl, V.; Puertas, M. C.; Gatell, J. M.; Domingo, P.; Paredes, R.; Sharkey, M.; Palmer, S.; Stevenson, M.; Clotet, B.; Blanco, J.; Martinez-Picado, J. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects *Nat Med* **2010**, *16*, 460-465.
- (14) Reed, J. C.; Molter, B.; Geary, C. D.; McNevin, J.; McElrath, J.; Giri, S.; Klein, K. C.; Lingappa, J. R. HIV-1 Gag co-opts a cellular complex containing DDX6, a helicase that facilitates capsid assembly *J Cell Biol* **2012**, *198*, 439-456.

- (15) Bieniasz, P. D. The cell biology of HIV-1 virion genesis *Cell Host Microbe* **2009**, *5*, 550-558.
- (16) Hatzioannou, T.; Ambrose, Z.; Chung, N. P.; Piatak, M., Jr.; Yuan, F.; Trubey, C. M.; Coalter, V.; Kiser, R.; Schneider, D.; Smedley, J.; Pung, R.; Gathuka, M.; Estes, J. D.; Veazey, R. S.; KewalRamani, V. N.; Lifson, J. D.; Bieniasz, P. D. A macaque model of HIV-1 infection *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 4425-4429.
- (17) Kutluay, S. B.; Bieniasz, P. D. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging *PLoS Pathog* **2010**, *6*, e1001200.
- (18) Sauter, D.; Schindler, M.; Specht, A.; Landford, W. N.; Munch, J.; Kim, K. A.; Votteler, J.; Schubert, U.; Bibollet-Ruche, F.; Keele, B. F.; Takehisa, J.; Ogando, Y.; Ochsenbauer, C.; Kappes, J. C.; Ayoub, A.; Peeters, M.; Learn, G. H.; Shaw, G.; Sharp, P. M.; Bieniasz, P.; Hahn, B. H.; Hatzioannou, T.; Kirchhoff, F. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains *Cell Host Microbe* **2009**, *6*, 409-421.
- (19) Gallo, R. C.; Popovic, M.; Sarin, P.; Reitz, M. S., Jr.; Kalyanaraman, V. S.; Aoki, T.; Sarngadharan, M. G.; Wong-Staal, F. Human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV): a progress report *Haematol Blood Transfus* **1983**, *28*, 311-319.
- (20) Douek, D. C.; Brenchley, J. M.; Betts, M. R.; Ambrozak, D. R.; Hill, B. J.; Okamoto, Y.; Casazza, J. P.; Kuruppu, J.; Kunstman, K.; Wolinsky, S.; Grossman, Z.; Dybul, M.; Oxenius, A.; Price, D. A.; Connors, M.; Koup, R. A. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells *Nature* **2002**, *417*, 95-98.
- (21) Piguet, V.; Steinman, R. M. The interaction of HIV with dendritic cells: outcomes and pathways *Trends Immunol* **2007**, *28*, 503-510.
- (22) Berger, E. A.; Murphy, P. M.; Farber, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease *Annu Rev Immunol* **1999**, *17*, 657-700.
- (23) Garzino-Demo, A.; DeVico, A. L.; Gallo, R. C. Chemokine receptors and chemokines in HIV infection *J Clin Immunol* **1998**, *18*, 243-255.
- (24) Mellado, M.; Rodriguez-Frade, J. M.; Manes, S.; Martinez, A. C. Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation *Annu Rev Immunol* **2001**, *19*, 397-421.
- (25) Garzino-Demo, A.; DeVico, A. L.; Cocchi, F.; Gallo, R. C. Beta-chemokines and protection from HIV type 1 disease *AIDS Res Hum Retroviruses* **1998**, *14 Suppl 2*, S177-184.
- (26) Littman, D. R. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* **1998**, *93*, 677-680.
- (27) Lee, K.; Ambrose, Z.; Martin, T. D.; Oztop, I.; Mulky, A.; Julias, J. G.; Vandegraaff, N.; Baumann, J. G.; Wang, R.; Yuen, W.; Takemura, T.; Shelton, K.; Taniuchi, I.; Li, Y.; Sodroski, J.; Littman, D. R.; Coffin, J. M.; Hughes, S. H.; Unutmaz, D.; Engelman, A.; KewalRamani, V. N. Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1 *Cell Host Microbe* **2010**, *7*, 221-233.
- (28) Li, X.; Koh, Y.; Engelman, A. Correlation of recombinant integrase activity and functional preintegration complex formation during acute infection by replication-defective integrase mutant human immunodeficiency virus *J Virol* **2012**, *86*, 3861-3879.
- (29) Kearney, P. M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P. K.; He, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data *Lancet* **2005**, *365*, 217-223.
- (30) Tice, C. M. Renin inhibitors *Annu Rep Med Chem* **2006**, *41*, 155-167.
- (31) Lacombe, P.; Aspiotis, R.; Bayly, C.; Chen, A.; Dube, D.; Fortin, R.; Gallant, M.; Juteau, H.; Liu, S.; McKay, D.; Roy, P.; Wu, T. Identification of a new biaryl scaffold generating potent renin inhibitors *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 5822-5826.

- (32) Ferro, A.; Gilbert, R.; Krum, H. Importance of renin in blood pressure regulation and therapeutic potential of renin inhibition *International journal of clinical practice* **2006**, *60*, 577-581.
- (33) Norris, K.; Vaughn, C. The role of renin-angiotensin-aldosterone system inhibition in chronic kidney disease *Expert review of cardiovascular therapy* **2003**, *1*, 51-63.
- (34) Timmermans, P. B.; Wong, P. C.; Chiu, A. T.; Herblin, W. F.; Benfield, P.; Carini, D. J.; Lee, R. J.; Wexler, R. R.; Saye, J. A.; Smith, R. D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists *Pharmacological reviews* **1993**, *45*, 205-251.
- (35) Fyhrquist, F.; Saijonmaa, O. Renin-angiotensin system revisited *Journal of internal medicine* **2008**, *264*, 224-236.
- (36) Kumar, R.; Singh, V. P.; Baker, K. M. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **2007**, *18*, 208-214.
- (37) Carey, R. M.; Siragy, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation *Endocrine reviews* **2003**, *24*, 261-271.
- (38) Lavoie, J. L.; Sigmund, C. D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system *Endocrinology* **2003**, *144*, 2179-2183.
- (39) Re, R. N.; Cook, J. L. The intracrine hypothesis: an update *Regul Pept* **2006**, *133*, 1-9.
- (40) De Mello, W. C. Cardiac intracrine renin angiotensin system. Part of genetic reprogramming? *Regul Pept* **2006**, *133*, 10-12.
- (41) Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems *Physiol Rev* **2006**, *86*, 747-803.
- (42) Leung, P. S. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas *J Physiol* **2007**, *580*, 31-37.
- (43) Sever, P. S.; Gradman, A. H.; Azizi, M. Managing cardiovascular and renal risk: the potential of direct renin inhibition *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* **2009**, *10*, 65-76.
- (44) Staessen, J. A.; Li, Y.; Richart, T. Oral renin inhibitors *Lancet* **2006**, *368*, 1449-1456.
- (45) Volpe, M.; Savoia, C.; De Paolis, P.; Ostrowska, B.; Tarasi, D.; Rubattu, S. The renin-angiotensin system as a risk factor and therapeutic target for cardiovascular and renal disease *J Am Soc Nephrol* **2002**, *13 Suppl 3*, S173-178.
- (46) Turnbull, F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials *Lancet* **2003**, *362*, 1527-1535.
- (47) Rahuel, J.; Rasetti, V.; Maibaum, J.; Rueger, H.; Goschke, R.; Cohen, N. C.; Stutz, S.; Cumin, F.; Fuhrer, W.; Wood, J. M.; Grutter, M. G. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin *Chem Biol* **2000**, *7*, 493-504.
- (48) Webb, R. L.; Schiering, N.; Sedrani, R.; Maibaum, J. Direct renin inhibitors as a new therapy for hypertension *J Med Chem* **2010**, *53*, 7490-7520.
- (49) Kammerl, M. C.; Richthammer, W.; Kurtz, A.; Kramer, B. K. Angiotensin II feedback is a regulator of renocortical renin, COX-2, and nNOS expression *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **2002**, *282*, R1613-1617.
- (50) Azizi, M.; Webb, R.; Nussberger, J.; Hollenberg, N. K. Renin inhibition with aliskiren: where are we now, and where are we going? *J Hypertens* **2006**, *24*, 243-256.

- (51) Weber, M. A.; Giles, T. D. Inhibiting the renin-angiotensin system to prevent cardiovascular diseases: do we need a more comprehensive strategy? *Reviews in cardiovascular medicine* **2006**, *7*, 45-54.
- (52) Cooper, M. E. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications *Am J Hypertens* **2004**, *17*, 16S-20S; quiz A12-14.
- (53) Cheng, H.; Harris, R. C. Potential side effects of renin inhibitors--mechanisms based on comparison with other renin-angiotensin blockers *Expert opinion on drug safety* **2006**, *5*, 631-641.
- (54) O'Brien, E. Aliskiren: a renin inhibitor offering a new approach for the treatment of hypertension *Expert opinion on investigational drugs* **2006**, *15*, 1269-1277.
- (55) Kleinert, H. D.; Luly, J. R.; Bopp, B. A.; Verburg, K. M.; Hoyos, P. A.; Karol, M. D.; Plattner, J. J.; Luther, R. R.; Stein, H. H. Profile of the Renin Inhibitor, Enalkiren (Abbott-64662) *Cardiovasc Drug Rev* **1990**, *8*, 203-219.
- (56) Doswald, S.; Estermann, H.; Kupfer, E.; Stadler, H.; Walther, W.; Weisbrod, T.; Wirz, B.; Wostl, W. Large scale preparation of chiral building blocks for the P3 site of renin inhibitors *Bioorg Med Chem* **1994**, *2*, 403-410.
- (57) Wood, J. M.; Criscione, L.; Degasparo, M.; Buhlmayer, P.; Rueger, H.; Stanton, J. L.; Jupp, R. A.; Kay, J. Cgp 38 560 - Orally Active, Low-Molecular-Weight Renin Inhibitor with High Potency and Specificity *J Cardiovasc Pharm* **1989**, *14*, 221-226.
- (58) Hanessian, S.; Guesne, S.; Chenard, E. Total synthesis of "aliskiren": the first Renin inhibitor in clinical practice for hypertension *Org Lett* **2010**, *12*, 1816-1819.
- (59) Wood, J. M.; Maibaum, J.; Rahuel, J.; Grutter, M. G.; Cohen, N. C.; Rasetti, V.; Ruger, H.; Goschke, R.; Stutz, S.; Fuhrer, W.; Schilling, W.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Cumin, F.; Baum, H. P.; Schnell, C. R.; Herold, P.; Mah, R.; Jensen, C.; O'Brien, E.; Stanton, A.; Bedigian, M. P. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *308*, 698-705.
- (60) Rosenberg, S. H.; Spina, K. P.; Woods, K. W.; Polakowski, J.; Martin, D. L.; Yao, Z.; Stein, H. H.; Cohen, J.; Barlow, J. L.; Egan, D. A.; et al. Studies directed toward the design of orally active renin inhibitors. 1. Some factors influencing the absorption of small peptides *J Med Chem* **1993**, *36*, 449-459.
- (61) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A. MEROPS: the peptidase database *Nucleic Acids Res* **2010**, *38*, D227-233.
- (62) Barrett, A. J.; Rawlings, N. D.; O'Brien, E. A. The MEROPS database as a protease information system *J Struct Biol* **2001**, *134*, 95-102.
- (63) Coates, L.; Tuan, H. F.; Tomanicek, S.; Kovalevsky, A.; Mustyakimov, M.; Erskine, P.; Cooper, J. The catalytic mechanism of an aspartic proteinase explored with neutron and X-ray diffraction *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 7235-7237.
- (64) Toh, H.; Ono, M.; Saigo, K.; Miyata, T. Retroviral Protease-Like Sequence in the Yeast Transposon Ty1 *Nature* **1985**, *315*, 691-691.
- (65) Nicholson, L. K.; Yamazaki, T.; Torchia, D. A.; Grzesiek, S.; Bax, A.; Stahl, S. J.; Kaufman, J. D.; Wingfield, P. T.; Lam, P. Y.; Jadhav, P. K.; et al. Flexibility and function in HIV-1 protease *Nat Struct Biol* **1995**, *2*, 274-280.
- (66) Rahuel, J.; Priestle, J. P.; Grutter, M. G. The crystal structures of recombinant glycosylated human renin alone and in complex with a transition state analog inhibitor *J Struct Biol* **1991**, *107*, 227-236.
- (67) Hornak, V.; Okur, A.; Rizzo, R. C.; Simmerling, C. HIV-1 protease flaps spontaneously close to the correct structure in simulations following manual placement of an inhibitor into the open state *J Am Chem Soc* **2006**, *128*, 2812-2813.

- (68) Freedberg, D. I.; Ishima, R.; Jacob, J.; Wang, Y. X.; Kustanovich, I.; Louis, J. M.; Torchia, D. A. Rapid structural fluctuations of the free HIV protease flaps in solution: relationship to crystal structures and comparison with predictions of dynamics calculations *Protein Sci* **2002**, *11*, 221-232.
- (69) Hornak, V.; Okur, A.; Rizzo, R. C.; Simmerling, C. HIV-1 protease flaps spontaneously open and reclose in molecular dynamics simulations *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 915-920.
- (70) Lapatto, R.; Blundell, T.; Hemmings, A.; Overington, J.; Wilderspin, A.; Wood, S.; Merson, J. R.; Whittle, P. J.; Danley, D. E.; Geoghegan, K. F.; et al. X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes *Nature* **1989**, *342*, 299-302.
- (71) Navia, M. A.; Fitzgerald, P. M.; McKeever, B. M.; Leu, C. T.; Heimbach, J. C.; Herber, W. K.; Sigal, I. S.; Darke, P. L.; Springer, J. P. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1 *Nature* **1989**, *337*, 615-620.
- (72) Politi, A.; Leonis, G.; Tzoupis, H.; Ntountaniotis, D.; Papadopoulos, M. G.; Grdadolnik, S. G.; Mavromoustakos, T. Conformational Properties and Energetic Analysis of Aliskiren in Solution and Receptor Site *Mol Inform* **2011**, *30*, 973-985.
- (73) Scheiper, B.; Matter, H.; Steinhagen, H.; Stilz, U.; Bocskei, Z.; Fleury, V.; McCort, G. Discovery and optimization of a new class of potent and non-chiral indole-3-carboxamide-based renin inhibitors *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 6268-6272.
- (74) Zhang, Z. Y.; Reardon, I. M.; Hui, J. O.; O'Connell, K. L.; Poorman, R. A.; Tomasselli, A. G.; Henrikson, R. L. Zinc inhibition of renin and the protease from human immunodeficiency virus type 1 *Biochemistry* **1991**, *30*, 8717-8721.
- (75) Tokarski, J. S.; Hopfinger, A. J. Prediction of ligand-receptor binding thermodynamics by free energy force field (FEFF) 3D-QSAR analysis: application to a set of peptidomimetic renin inhibitors *J Chem Inf Comput Sci* **1997**, *37*, 792-811.
- (76) Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A., Jr.; Meek, T. D. Human immunodeficiency virus-1 protease. 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism *Biochemistry* **1991**, *30*, 8454-8463.
- (77) Pietrucci, F.; Marinelli, F.; Carloni, P.; Laio, A. Substrate binding mechanism of HIV-1 protease from explicit-solvent atomistic simulations *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 11811-11818.
- (78) Sharma, S. K.; Evans, D. B.; Hui, J. O.; Henrikson, R. L. Could angiotensin I be produced from a renin substrate by the HIV-1 protease? *Anal Biochem* **1991**, *198*, 363-367.
- (79) Tzoupis, H.; Leonis, G.; Megariotis, G.; Supuran, C. T.; Mavromoustakos, T.; Papadopoulos, M. G. Dual Inhibitors for Aspartic Proteases HIV-1 PR and Renin: Advancements in AIDS-Hypertension-Diabetes Linkage via Molecular Dynamics, Inhibition Assays, and Binding Free Energy Calculations *J Med Chem* **2012**, *55*, 5784-5796.
- (80) Tzoupis, H.; Leonis, G.; Durdagi, S.; Mouchlis, V.; Mavromoustakos, T.; Papadopoulos, M. G. Binding of novel fullerene inhibitors to HIV-1 protease: insight through molecular dynamics and molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area calculations *J Comput-Aided Mol Des* **2011**, *25*, 959-976.
- (81) Tzoupis, H.; Leonis, G.; Mavromoustakos, T.; Papadopoulos, M. G. A Comparative Molecular Dynamics, MM-PBSA and Thermodynamic Integration Study of Saquinavir Complexes with Wild-Type HIV-1 PR and L10I, G48V, L63P, A71V, G73S, V82A and I84V Single Mutants *J Chem Theory Comput* **2013**, *9*, 1754-1764.
- (82) Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Matching chemistry and shape in molecular docking *Protein Eng* **1993**, *6*, 723-732.

- (83) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function *Journal of Computational Chemistry* **1998**, *19*, 1639-1662.
- (84) Graves, A. P.; Shivakumar, D. M.; Boyce, S. E.; Jacobson, M. P.; Case, D. A.; Shoichet, B. K. Rescoring docking hit lists for model cavity sites: predictions and experimental testing *J Mol Biol* **2008**, *377*, 914-934.
- (85) Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations *J Mol Graph Model* **2006**, *25*, 247-260.
- (86) Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology *Journal of Chemical Information and Modeling* **2012**, *52*, 1757-1768.
- (87) Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Automated Docking with Grid-Based Energy Evaluation *Journal of Computational Chemistry* **1992**, *13*, 505-524.
- (88) Balias, T. E.; Mukherjee, S.; Rizzo, R. C. Implementation and Evaluation of a Docking-Rescoring Method Using Molecular Footprint Comparisons *Journal of Computational Chemistry* **2011**, *32*, 2273-2289.
- (89) Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions *J Mol Biol* **1982**, *161*, 269-288.
- (90) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30*, 2785-2791.
- (91) Thompson, M. A. Molecular docking using arguslab: An efficient shape-based search algorithm and an enhanced xscore scoring function. *Abstr Pap Am Chem S* **2004**, *228*, U360-U360.
- (92) Pick, D. Novel scoring methods in virtual ligand screening *Methods Mol Biol* **2004**, *275*, 439-448.
- (93) Judson, R. S.; Jaeger, E. P.; Treasurywala, A. M. A Genetic Algorithm-Based Method for Docking Flexible Molecules *Theochem-J Mol Struc* **1994**, *114*, 191-206.
- (94) Pegg, S. C. H.; Haresco, J. J.; Kuntz, I. D. A genetic algorithm for structure-based de novo design *J Comput Aid Mol Des* **2001**, *15*, 911-933.
- (95) Vaidya, M.; Weigt, M.; Wiese, M. 3D-QSAR with the aid of pharmacophore search and docking-based alignments for farnesyltransferase inhibitors *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 4070-4082.
- (96) Prado-Prado, F. J.; Borges, F.; Uriarte, E.; Perez-Montoto, L. G.; Gonzalez-Diaz, H. Multi-target spectral moment: QSAR for antiviral drugs vs. different viral species *Anal Chim Acta* **2009**, *651*, 159-164.
- (97) Cronin, M. T. D.; Worth, A. P. (Q)SARs for predicting effects relating to reproductive toxicity *QSAR & Combinatorial Science* **2008**, *27*, 91-100.
- (98) Doytchinova, I. A.; Flower, D. R. Quantitative approaches to computational vaccinology *Immunol Cell Biol* **2002**, *80*, 270-279.
- (99) Hansch, C.; Hoekman, D.; Leo, A.; Zhang, L. T.; Li, P. The Expanding Role of Quantitative Structure-Activity-Relationships (Qsar) in Toxicology *Toxicology Letters* **1995**, *79*, 45-53.
- (100) Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. A Survey of Hammett Substituent Constants and Resonance and Field Parameters *Chemical Reviews* **1991**, *91*, 165-195.

- (101) Puzyn, T.; Suzuki, N.; Haranczyk, M.; Rak, J. Calculation of quantum-mechanical Descriptors for QSPR at the DFT level: Is it necessary? *Journal of Chemical Information and Modeling* **2008**, *48*, 1174-1180.
- (102) Urbano-Cuadrado, M.; Carbo, J. J.; Maldonado, A. G.; Bo, C. New quantum mechanics-based three-dimensional molecular Descriptors for use in QSSR approaches: Application to asymmetric catalysis *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**, *47*, 2228-2234.
- (103) Netzeva, T. I.; Aptula, A. O.; Benfenati, E.; Cronin, M. T. D.; Gini, G.; Lessigiarska, I.; Maran, U.; Vracko, M.; Schuurmann, G. Description of the electronic structure of organic chemicals using semiempirical and ab initio methods for development of toxicological QSARs *Journal of Chemical Information and Modeling* **2005**, *45*, 106-114.
- (104) *Quantum chemical descriptors in structure–activity relationships – calculation, interpretation and comparison of methods*; Schuurman, A., Ed.; Taylor and Francis: London, 2004.
- (105) Martin, Y. C.; Panas, H. N. Mathematical considerations in series design *J Med Chem* **1979**, *22*, 784-791.
- (106) Cramer, R. D.; Patterson, D. E.; Bunce, J. D. Comparative Molecular-Field Analysis (Comfa) .1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 5959-5967.
- (107) Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. Molecular Similarity Indexes in a Comparative-Analysis (Comsia) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological-Activity *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37*, 4130-4146.
- (108) Kim, K. H.; Greco, G.; Novellino, E. A critical review of recent CoMFA applications *Perspect Drug Discov* **1998**, *12*, 257-315.
- (109) Leach, A. R. *Molecular modelling: principles and applications*. ; 2nd Edition ed.; Pearson Education Ltd, 2001.
- (110) Guarnieri, F.; Still, W. C. A Rapidly Convergent Simulation Method - Mixed Monte-Carlo Stochastic Dynamics *Journal of Computational Chemistry* **1994**, *15*, 1302-1310.
- (111) Vangunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. Algorithms for Macromolecular Dynamics and Constraint Dynamics *Mol Phys* **1977**, *34*, 1311-1327.
- (112) Mccammon, J. A.; Gelin, B. R.; Karplus, M. Dynamics of Folded Proteins *Nature* **1977**, *267*, 585-590.
- (113) Karplus, M.; Mccammon, J. A. The Dynamics of Proteins *Sci Am* **1986**, *254*, 42-&.
- (114) Grubmueller, H. *Proteins as Molecular Machines: Force Probe Simulations*; John von Neumann Institute for Computing: Germany, 2004; Vol. 23.
- (115) Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. R.; Pople, J. A., Eds.; Wiley & Sons, 1986.
- (116) Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters *Proteins* **2006**, *65*, 712-725.
- (117) MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 3586-3616.
- (118) Jorgensen, W. L.; Tiradorives, J. The Opls Potential Functions for Proteins - Energy Minimizations for Crystals of Cyclic-Peptides and Crambin *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 1657-1666.

- (119) Verlet, L. Computer Experiments on Classical Fluids .I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules *Phys Rev* **1967**, *159*, 98-103.
- (120) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, I., T. E.; Simmerling, C.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B. P.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossvary, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M. J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. *AMBER 11, University of California, San Francisco, CA* **2010**.
- (121) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water *Journal of Chemical Physics* **1983**, *79*, 926-935.
- (122) Jorgensen, W. L. Quantum and Statistical Mechanical Studies of Liquids .10. Transferable Intermolecular Potential Functions for Water, Alcohols, and Ethers - Application to Liquid Water *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 335-340.
- (123)
- (124) Zhu, Z.; Schuster, D. I.; Tuckerman, M. E. Molecular dynamics study of the connection between flap closing and binding of fullerene-based inhibitors of the HIV-1 protease *Biochemistry* **2003**, *42*, 1326-1333.
- (125) Piana, S.; Sebastiani, D.; Carloni, P.; Parrinello, M. Ab initio molecular dynamics-based assignment of the protonation state of pepstatin A/HIV-1 protease cleavage site *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 8730-8737.
- (126) Hou, T.; McLaughlin, W. A.; Wang, W. Evaluating the potency of HIV-1 protease drugs to combat resistance *Proteins* **2008**, *71*, 1163-1174.
- (127) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general amber force field *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1157-1174.
- (128) Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation *J Comput Chem* **2002**, *23*, 1623-1641.
- (129) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems *J Chem Phys* **1993**, *98*, 10089-10092.
- (130) Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes *J Comp Phys* **1977**, *23*, 327-341.
- (131) Izaguirre, J. A.; Catarella, D. P.; Wozniak, J. M.; Skeel, R. D. Langevin stabilization of molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 2090-2098.
- (132) Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E., 3rd Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models *Acc Chem Res* **2000**, *33*, 889-897.
- (133) Honig, B.; Nicholls, A. Classical electrostatics in biology and chemistry *Science* **1995**, *268*, 1144-1149.
- (134) Tan, C.; Tan, Y. H.; Luo, R. Implicit nonpolar solvent models *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, *111*, 12263-12274.
- (135) Sitkoff, D.; Sharp, K. A.; Honig, B. Accurate Calculation of Hydration Free-Energies Using Macroscopic Solvent Models *J Phys Chem-Us* **1994**, *98*, 1978-1988.
- (136) Wang, W.; Donini, O.; Reyes, C. M.; Kollman, P. A. Biomolecular simulations: recent developments in force fields, simulations of enzyme catalysis,

protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2001**, *30*, 211-243.

(137) Gouda, H.; Kuntz, I. D.; Case, D. A.; Kollman, P. A. Free energy calculations for theophylline binding to an RNA aptamer: Comparison of MM-PBSA and thermodynamic integration methods *Biopolymers* **2003**, *68*, 16-34.

(138) Srinivasan, J.; Cheatham, I., T. E.; Cieplak, P.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate-DNA Helices *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 9401-9409.

(139) Stoica, I.; Sadiq, S. K.; Coveney, P. V. Rapid and accurate prediction of binding free energies for saquinavir-bound HIV-1 proteases *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 2639-2648.

(140) Hou, T.; Wang, J.; Li, Y.; Wang, W. Assessing the performance of the MM/PBSA and MM/GBSA methods. 1. The accuracy of binding free energy calculations based on molecular dynamics simulations *J Chem Inf Model* **2011**, *51*, 69-82.

(141) Cai, Y.; Schiffer, C. A. Decomposing the energetic impact of drug resistant mutations in HIV-1 protease on binding DRV *J Chem Theory Comput* **2010**, *6*, 1358-1368.

(142) Radmer, R. J.; Kollman, P. A. The application of three approximate free energy calculations methods to structure based ligand design: Trypsin and its complex with inhibitors *J Comput Aid Mol Des* **1998**, *12*, 215-227.

(143) Lawrenz, M.; Baron, R.; McCammon, J. A. Independent-Trajectories Thermodynamic-Integration Free-Energy Changes for Biomolecular System Determinants of H5N1 Avian Influenza Virus Neuraminidase Inhibition by Peramivir *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 1106-1116.

(144) Beutler, T. C.; Mark, A. E.; van Schaik, R. C.; Gerber, P. R.; van Gunsteren, W. F. Avoiding singularities and numerical instabilities in free energy calculations based on molecular simulations *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *222*, 529-539.

(145) Steinbrecher, T.; Mobley, D. L.; Case, D. A. Nonlinear scaling schemes for Lennard-Jones interactions in free energy calculations *Journal of Chemical Physics* **2007**, *127*.

(146) Shao, J. Y.; Tanner, S. W.; Thompson, N.; Cheatham, T. E. Clustering molecular dynamics trajectories: 1. Characterizing the performance of different clustering algorithms *J Chem Theory Comput* **2007**, *3*, 2312-2334.

(147) Jain, A. K.; Murty, M. N.; Flynn, P. J. Data clustering: A review *Acm Comput Surv* **1999**, *31*, 264-323.

(148) Torda, A. E.; Vangunsteren, W. F. Algorithms for Clustering Molecular-Dynamics Configurations *Journal of Computational Chemistry* **1994**, *15*, 1331-1340.

(149) Jensen, A. W.; Wilson, S. R.; Schuster, D. I. Biological applications of fullerenes *Bioorg Med Chem* **1996**, *4*, 767-779.

(150) Calvaresi, M.; Zerbetto, F. Baiting proteins with C60 *ACS Nano* **2010**, *4*, 2283-2299.

(151) Buhl, M.; Hirsch, A. Spherical aromaticity of fullerenes *Chem Rev* **2001**, *101*, 1153-1183.

(152) Chaur, M. N.; Melin, F.; Ortiz, A. L.; Echegoyen, L. Chemical, electrochemical, and structural properties of endohedral metallofullerenes *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, *48*, 7514-7538.

(153) Jafvert, C. T.; Kulkarni, P. P. Buckminsterfullerene's (C60) octanol-water partition coefficient (Kow) and aqueous solubility *Environ Sci Technol* **2008**, *42*, 5945-5950.

(154) Kulkarni, P. P.; Jafvert, C. T. Solubility of C60 in solvent mixtures *Environ Sci Technol* **2008**, *42*, 845-851.

- (155) Hou, T.; Wang, J.; Zhang, W.; Wang, W.; Xu, X. Recent advances in computational prediction of drug absorption and permeability in drug discovery *Curr Med Chem* **2006**, *13*, 2653-2667.
- (156) Lombardo, F.; Gifford, E.; Shalaeva, M. Y. In silico ADME prediction: data, models, facts and myths *Mini Rev Med Chem* **2003**, *3*, 861-875.
- (157) van de Waterbeemd, H.; Gifford, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 192-204.
- (158) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46*, 3-26.
- (159) Friedman, H. S.; DeCamp, D. L.; Sijbesma, R. P.; Srdanov, G.; Wudl, F.; Kenyon, G. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 6506-6509.
- (160) Toniolo, C.; Bianco, A.; Maggini, M.; Scorrano, G.; Prate, M.; Marastoni, M.; Tomatis, R.; Spisani, S.; Palu, G.; Blair, E. D. A Bioactive Fullerene Peptide *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4558-4562.
- (161) Troshina, O. A.; Troshin, P. A.; Peregudov, A. S.; Kozlovskiy, V. I.; Balzarini, J.; Lyubovskayaa, R. N. Chlorofullerene C60Cl6: a precursor for straightforward preparation of highly water-soluble polycarboxylic fullerene derivatives active against HIV *Org Biomol Chem* **2007**, *5*, 2783-2791.
- (162) Bosi, S.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Balzarini, J.; Prato, M. Synthesis and anti-HIV properties of new water-soluble bis-functionalized[60]fullerene derivatives *Bioorg Med Chem Lett* **2003**, *13*, 4437-4440.
- (163) Friedman, S. H.; Decamp, D. L.; Sijbesma, R. P.; Srdanov, G.; Wudl, F.; Kenyon, G. L. Inhibition of the Hiv-1 Protease by Fullerene Derivatives - Model-Building Studies and Experimental-Verification *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 6506-6509.
- (164) Friedman, S. H.; Ganapathi, P. S.; Rubin, Y.; Kenyon, G. L. Optimizing the binding of fullerene inhibitors of the HIV-1 protease through predicted increases in hydrophobic desolvation *J Med Chem* **1998**, *41*, 2424-2429.
- (165) Durdagi, S.; Mavromoustakos, T.; Chronakis, N.; Papadopoulos, M. G. Computational design of novel fullerene analogues as potential HIV-1 PR inhibitors: Analysis of the binding interactions between fullerene inhibitors and HIV-1 PR residues using 3D QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulations *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 9957-9974.
- (166) Durdagi, S.; Mavromoustakos, T.; Papadopoulos, M. G. 3D QSAR CoMFA/CoMSIA, molecular docking and molecular dynamics studies of fullerene-based HIV-1 PR inhibitors *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 6283-6289.
- (167) Lee, V. S.; Nimmanpipug, P.; Aruksakunwong, O.; Promsri, S.; Sompornpisut, P.; Hannongbua, S. Structural analysis of lead fullerene-based inhibitor bound to human immunodeficiency virus type 1 protease in solution from molecular dynamics simulations *J Mol Graph Model* **2007**, *26*, 558-570.
- (168) Marchesan, S.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Balzarini, J.; Prato, M. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 3615-3618.
- (169) Marcorin, G. L.; Da Ros, T.; Castellano, S.; Stefancich, G.; Bonin, I.; Miertus, S.; Prato, M. Design and synthesis of novel [60]fullerene derivatives as potential HIV aspartic protease inhibitors *Org Lett* **2000**, *2*, 3955-3958.
- (170) ArgusLab 4.0.1 www.arguslab.com
- (171) Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A. I.; Skiff, W. M. UFF, A Full Periodic-Table Force-Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamic Simulation *J Am Chem Soc* **1992**, *114*, 10024-10035.
- (172) Broyden, C. G.; 6, -. F., R., 1970, *13*, 317-322; Goldfarb, D., A 1970, *24*, 23-26; Shanno, D. F., *Mathematics of Computation* 1970, *24*, 647.

- (173) Sengupta, D.; Verma, D.; Naik, P. K. Docking mode of delvardine and its analogues into the p66 domain of HIV-1 reverse transcriptase: screening using molecular mechanics-generalized born/surface area and absorption, distribution, metabolism and excretion properties *J Biosci* **2007**, *32*, 1307-1316.
- (174) 8.0, S.; Tripos International 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- (175) Ioannou, E.; Hirsch, A.; Elemen, Y. Sulfur-containing dihydro-pyrrolo [60]fullerene derivatives via 1,3-dipolar cycloadditions of glycine imine esters to C60 *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7070-7076.
- (176) Giordani, S.; Colomer, J.; Cattaruzza, F.; Alfonsi, J.; Meneghetti, M.; Prato, M.; Bonifazi, D. Multifunctional hybrid materials composed of [60]fullerene-based functionalized-single-walled carbon nanotubes *Carbon* **2009**, *47*, 578-588.
- (177) Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Georgakilas, V.; Gamboz, C.; Soranzo, M.; Prato, M. Supramolecular organized structures of fullerene-based materials and organic functionalization of carbon nanotubes *Comptes Rendus Chimie* **2003**, *6*, 597-602.
- (178) Bjelakovic, M. S.; Godjevac, D. M.; Milic, D. R. Synthesis and antioxidant properties of fullero-steroidal covalent conjugates *Carbon* **2007**, *45*, 2260-2265.
- (179) Tsumoto, H.; Takahashi, K.; Suzuki, T.; Nakagawa, H.; Kohda, K.; Miyata, N. Preparation of C60-based active esters and coupling of C60 moiety to amines or alcohols *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 657-660.
- (180) Huang, S. T.; Ho, C. S.; Lin, C. M.; Fang, H. W.; Peng, Y. X. Development and biological evaluation of C(60) fulleropyrrolidine-thalidomide dyad as a new anti-inflammation agent *Bioorg Med Chem* **2008**, *16*, 8619-8626.
- (181) de Freitas, R. P.; Iehl, J.; Delavaux-Nicot, B.; Nierengarten, J. Synthesis of fullerene building blocks bearing alkyne or azide groups and their subsequent functionalization by the copper mediated Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11409-11419.
- (182) Thompson, B. C.; Frechet, J. M. Polymer-fullerene composite solar cells *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 58-77.
- (183) Loboda, O.; Zalesny, R.; Avramopoulos, A.; Luis, J. M.; Kirtman, B.; Tagmatarchis, N.; Reis, H.; Papadopoulos, M. G. Linear and nonlinear optical properties of [60]fullerene derivatives *J Phys Chem A* **2009**, *113*, 1159-1170.
- (184) Zalesny, R.; Loboda, O.; Iliopoulos, K.; Chatzikyriakos, G.; Couris, S.; Rotas, G.; Tagmatarchis, N.; Avramopoulos, A.; Papadopoulos, M. G. Linear and nonlinear optical properties of triphenylamine-functionalized C60: insights from theory and experiment *Phys Chem Chem Phys* **2010**, *12*, 373-381.
- (185) QikProp; Schrodinger, LLC, New York, NY: 2009.
- (186) Yazdani, M.; Glynn, S. L.; Wright, J. L.; Hawi, A. Correlating partitioning and caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds *Pharm Res* **1998**, *15*, 1490-1494.
- (187) Irvine, J. D.; Takahashi, L.; Lockhart, K.; Cheong, J.; Tolan, J. W.; Selick, H. E.; Grove, J. R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening *J Pharm Sci* **1999**, *88*, 28-33.
- (188) Durdagi, S.; Subbotina, J.; Lees-Miller, J.; Guo, J.; Duff, H. J.; Noskov, S. Y. Insights into the molecular mechanism of hERG1 channel activation and blockade by drugs *Curr Med Chem* **2010**, *17*, 3514-3532.
- (189) Ajay; Bemis, G. W.; Murcko, M. A. Designing libraries with CNS activity *J Med Chem* **1999**, *42*, 4942-4951.
- (190) Ohtaka, H.; Velazquez-Campoy, A.; Xie, D.; Freire, E. Overcoming drug resistance in HIV-1 chemotherapy: the binding thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to wild-type and drug-resistant mutants of the HIV-1 protease *Protein Sci* **2002**, *11*, 1908-1916.

(191) Chen, Z.; Li, Y.; Chen, E.; Hall, D. L.; Darke, P. L.; Culberson, C.; Shafer, J. A.; Kuo, L. C. Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases *J Biol Chem* **1994**, *269*, 26344-26348.

(192) Kaldor, S. W.; Kalish, V. J.; Davies, J. F., 2nd; Shetty, B. V.; Fritz, J. E.; Appelt, K.; Burgess, J. A.; Campanale, K. M.; Chirgadze, N. Y.; Clawson, D. K.; Dressman, B. A.; Hatch, S. D.; Khalil, D. A.; Kosa, M. B.; Lubbehusen, P. P.; Muesing, M. A.; Patick, A. K.; Reich, S. H.; Su, K. S.; Tatlock, J. H. Viracept (nelfinavir mesylate, AG1343): a potent, orally bioavailable inhibitor of HIV-1 protease *J Med Chem* **1997**, *40*, 3979-3985.

(193) Mongan, J.; Case, D. A.; McCammon, J. A. Constant pH molecular dynamics in generalized Born implicit solvent *J Comput Chem* **2004**, *25*, 2038-2048.

(194) Lefebvre, E.; Schiffer, C. A. Resilience to resistance of HIV-1 protease inhibitors: profile of darunavir *AIDS Rev* **2008**, *10*, 131-142.

(195) Muzammil, S.; Armstrong, A. A.; Kang, L. W.; Jakalian, A.; Bonneau, P. R.; Schmelmer, V.; Amzel, L. M.; Freire, E. Unique thermodynamic response of tipranavir to human immunodeficiency virus type 1 protease drug resistance mutations *J Virol* **2007**, *81*, 5144-5154.

(196) Ganapathi, P. S.; Friedman, S. A.; Kenyon, G. L.; Rubin, Y. Sequential "Bis-Michael" Additions of Dienolates with C60: Rapid Access to Sterically Congested Buckminsterfullerene Derivatives with Defined Stereochemistry *J Org Chem* **1995**, *60*, 2954-2955.

(197) Bingel, C. Cyclopropanierung von Fullerenen *Chemische Berichte* **1993**, *126*, 1957-1959.

(198) Zoete, V.; Michielin, O.; Karplus, M. Relation between sequence and structure of HIV-1 protease inhibitor complexes: a model system for the analysis of protein flexibility *J Mol Biol* **2002**, *315*, 21-52.

(199) Reyes, C. M.; Kollman, P. A. Structure and thermodynamics of RNA-protein binding: using molecular dynamics and free energy analyses to calculate the free energies of binding and conformational change *J Mol Biol* **2000**, *297*, 1145-1158.

(200) Wang, W.; Lim, W. A.; Jakalian, A.; Wang, J.; Luo, R.; Bayly, C. I.; Kollman, P. A. An analysis of the interactions between the Sem-5 SH3 domain and its ligands using molecular dynamics, free energy calculations, and sequence analysis *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 3986-3994.

(201) Hou, T.; Yu, R. Molecular dynamics and free energy studies on the wild-type and double mutant HIV-1 protease complexed with amprenavir and two amprenavir-related inhibitors: mechanism for binding and drug resistance *J Med Chem* **2007**, *50*, 1177-1188.

(202) Charlier, L.; Nespoulous, C.; Fiorucci, S.; Antonczak, S.; Golebiowski, J. Binding free energy prediction in strongly hydrophobic biomolecular systems *Phys Chem Chem Phys* **2007**, *9*, 5761-5771.

(203)

(204) Ioakimidis, L.; Thoukydidis, L.; Mirza, A.; Naeem, S.; Reynisson, J. Benchmarking the Reliability of QikProp. Correlation between Experimental and Predicted Values QSAR & Combinatorial Science **2008**, *27*, 445-456.

(205) Luo, S.; Wang, Z.; Patel, M.; Khurana, V.; Zhu, X.; Pal, D.; Mitra, A. K. Targeting SVCT for enhanced drug absorption: synthesis and in vitro evaluation of a novel vitamin C conjugated prodrug of saquinavir *Int J Pharm* **2011**, *414*, 77-85.

(206) Gu, Z.; Gao, Q.; Fang, H.; Salomon, H.; Parniak, M. A.; Goldberg, E.; Cameron, J.; Wainberg, M. A. Identification of a mutation at codon 65 in the IKKK motif of reverse transcriptase that encodes human immunodeficiency virus resistance to 2',3'-dideoxycytidine and 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, *38*, 275-281.

- (207) Baldwin, E. T.; Bhat, T. N.; Liu, B.; Pattabiraman, N.; Erickson, J. W. Structural basis of drug resistance for the V82A mutant of HIV-1 proteinase *Nat Struct Biol* **1995**, *2*, 244-249.
- (208) King, J. R.; Wynn, H.; Brundage, R.; Acosta, E. P. Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitor therapy *Clin Pharmacokinet* **2004**, *43*, 291-310.
- (209) Vyas, S. P.; Sihorkar, V.; Jain, S. Mannosylated liposomes for bio-film targeting *Int J Pharm* **2007**, *330*, 6-13.
- (210) Bergersen, B. M.; Sandvik, L.; Dunlop, O.; Birkeland, K.; Bruun, J. N. Prevalence of hypertension in HIV-positive patients on highly active retroviral therapy (HAART) compared with HAART-naïve and HIV-negative controls: Results from a Norwegian study of 721 patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *22*, 731-763.
- (211) Johnson, V. A.; Brun-Vezinet, F.; Clotet, B.; Gunthard, H. F.; Kuritzkes, D. R.; Pillay, D.; Schapiro, J. M.; Richman, D. D. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2009 *Top HIV Med* **2009**, *17*, 138-145.
- (212) Liu, F.; Kovalevsky, A. Y.; Tie, Y.; Ghosh, A. K.; Harrison, R. W.; Weber, I. T. Effect of flap mutations on structure of HIV-1 protease and inhibition by saquinavir and darunavir *J Mol Biol* **2008**, *381*, 102-115.
- (213) Saen-oon, S.; Aruksakunwong, O.; Wittayanarakul, K.; Sompornpisut, P.; Hannongbua, S. Insight into analysis of interactions of saquinavir with HIV-1 protease in comparison between the wild-type and G48V and G48V/L90M mutants based on QM and QM/MM calculations *J Mol Graphics Modell* **2007**, *26*, 720-727.
- (214) Hong, L.; Zhang, X. C.; Hartsuck, J. A.; Tang, J. Crystal structure of an in vivo HIV-1 protease mutant in complex with saquinavir: insights into the mechanisms of drug resistance *Protein Sci* **2000**, *9*, 1898-1904.
- (215) Weber, I. T.; Agniswamy, J. HIV-1 Protease: Structural Perspectives on Drug Resistance *Viruses* **2009**, *1*, 1110-1136.
- (216) Tie, Y.; Kovalevsky, A. Y.; Boross, P.; Wang, Y. F.; Ghosh, A. K.; Tozser, J.; Harrison, R. W.; Weber, I. T. Atomic resolution crystal structures of HIV-1 protease and mutants V82A and I84V with saquinavir *Proteins* **2007**, *67*, 232-242.
- (217) Okimoto, N.; Tsukui, T.; Kitayama, K.; Hata, M.; Hoshino, T.; Tsuda, M. Molecular dynamics study of HIV-1 protease-substrate complex: Roles of the water molecules at the loop structures of the active site. *J Am Chem Soc* **2000**, 5613-5622.
- (218) Leonis, G.; Czyznikowska, Z.; Megariotis, G.; Reis, H.; Papadopoulos, M. G. Computational studies of darunavir into HIV-1 protease and DMPC bilayer: necessary conditions for effective binding and the role of the flaps *J Chem Inf Model* **2012**, *52*, 1542-1558.
- (219) Tie, Y.; Boross, P. I.; Wang, Y. F.; Gaddis, L.; Hussain, A. K.; Leshchenko, S.; Ghosh, A. K.; Louis, J. M.; Harrison, R. W.; Weber, I. T. High resolution crystal structures of HIV-1 protease with a potent non-peptide inhibitor (UIC-94017) active against multi-drug-resistant clinical strains *J Mol Biol* **2004**, *338*, 341-352.
- (220) Revision A.; Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth,

G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J.; Gaussian, Inc., Wallingford CT: 2009.

(221) Rassolov, V. A.; Ratner, M. A.; Pople, J. A.; Redfern, P. C.; Curtiss, L. A. 6-31G*basis set for third-row atoms *J. Comput. Chem* **2001**, *22*, 976-984.

(222) Fox, T.; Kollman, P. A. Application of the RESP methodology in the parametrization of organic solvents *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 8070-8079.

(223) <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

(224) Jensen, C.; Herold, P.; Brunner, H. R. Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7*, 399-410.

(225) Matsoukas, M. T.; Zoumpoulakis, P.; Tselios, T. Conformational analysis of aliskiren, a potent renin inhibitor, using high-resolution nuclear magnetic resonance and molecular dynamics simulations *J Chem Inf Model* **2011**, *51*, 2386-2397.

(226) Smith, A. B., 3rd; Hirschmann, R.; Pasternak, A.; Akaishi, R.; Guzman, M. C.; Jones, D. R.; Keenan, T. P.; Sprengeler, P. A.; Darke, P. L.; Emini, E. A.; et al. Design and synthesis of peptidomimetic inhibitors of HIV-1 protease and renin. Evidence for improved transport *J Med Chem* **1994**, *37*, 215-218.

(227) InsightPharma

<http://www.insightpharmareports.com/uploadedFiles/ExecutiveSummary.pdf>; <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01064414>, Ed. 2010.

(228) Zhou, H.; Danger, D. P.; Dock, S. T.; Hawley, L.; Roller, S. G.; Smith, C. D.; Handlon, A. L. Synthesis and SAR of Benzisothiazole- and Indolizine-β- -glucopyranoside Inhibitors of SGLT2 *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *1*, 19-23.

(229) Goodwin, N. C.; Mabon, R.; Harrison, B. A.; Shadoan, M. K.; Almstead, Z. Y.; Xie, Y.; Healy, J.; Buhning, L. M.; DaCosta, C. M.; Bardenhagen, J.; Mseeh, F.; Liu, Q.; Nouraldeen, A.; Wilson, A. G.; Kimball, S. D.; Powell, D. R.; Rawlins, D. B. Novel L-xylose derivatives as selective sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes *J Med Chem* **2009**, *52*, 6201-6204.

(230) Ghosh, A. K.; Chapsal, B. D.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. Design of HIV protease inhibitors targeting protein backbone: an effective strategy for combating drug resistance *Acc Chem Res* **2008**, *41*, 78-86.

(231) *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*; Ghosh, A. K., Ed.; John Wiley and Sons, 2011.

(232) Hadigan, C.; Corcoran, C.; Basgoz, N.; Davis, B.; Sax, P.; Grinspoon, S. Metformin in the treatment of HIV lipodystrophy syndrome: A randomized controlled trial *JAMA* **2000**, *284*, 472-477.

(233) Jung, O.; Bickel, M.; Ditting, T.; Rickerts, V.; Welk, T.; Helm, E. B.; Staszewski, S.; Geiger, H. Hypertension in HIV-1-infected patients and its impact on renal and cardiovascular integrity *Nephrol Dial Transplant* **2004**, *19*, 2250-2258.

(234) Seaberg, E. C.; Munoz, A.; Lu, M.; Detels, R.; Margolick, J. B.; Riddler, S. A.; Williams, C. M.; Phair, J. P. Association between highly active antiretroviral therapy and hypertension in a large cohort of men followed from 1984 to 2003 *AIDS* **2005**, *19*, 953-960.

(235) Yoon, C.; Gulick, R. M.; Hoover, D. R.; Vaamonde, C. M.; Glesby, M. J. Case-control study of diabetes mellitus in HIV-infected patients *J Acquir Immune Defic Syndr* **2004**, *37*, 1464-1469.