



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

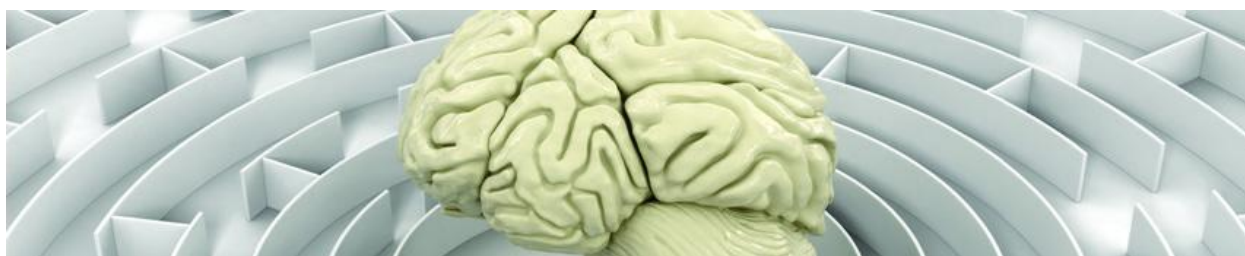
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σχεδιασμός καινοτόμων βιοδραστικών μορίων με τη βοήθεια της Μοριακής Προσομοίωσης για την αντιμετώπιση των εκφυλιστικών νόσων του Κ.Ν.Σ.: Alzheimer και Parkinson

**ΚΟΥΚΟΥΛΙΤΣΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**



ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
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 βιοδραστικών μορίων με τη βοήθεια της Μοριακής Προσομοίωσης για την αντιμετώπιση των εκφυλιστικών νόσων του Κ.Ν.Σ: Alzheimer και Parkinson

ΚΟΥΚΟΥΛΙΤΣΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
A.M.: 102815

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γιώργος Κόκοτος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ματθαίος Παπαδόπουλος, Ερευνητής Α' Βαθμίδας ΕΙΕ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γιώργος Κόκοτος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Ματθαίος Παπαδόπουλος, Ερευνητής Α' Βαθμίδας, ΕΙΕ

Σπύρος Ευθυμιόπουλος, Αν. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Θεόδωρος Τσέλιος, Επ. Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, Καθηγήτρια ΑΠΘ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 24/01/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής είναι ο *in silico* ορθολογικός σχεδιασμός νέων ενώσεων κατά των νόσων της Alzheimer και Parkinson.

Ένας θεραπευτικός στόχος της νόσου Alzheimer είναι η ασπαρτική πρωτεάση BACE-1. Ως προς την κατεύθυνση αναστολής της δράσης αυτού του ενζύμου μελετήθηκαν 11 παράγωγα της ρεσβερατρόλης και 11 γλυοξυλοϋλο-αροϋλο παράγωγα της υδραζόνης. Αρχικά μελετήθηκε *in silico* η ικανότητά τους να διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να απορροφώνται από τα κύτταρα του επιθηλίου του εντέρου Caco2 και ακολούθησαν υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης των παραγώγων δύο ομάδων στο ενεργό κέντρο της BACE-1. Επειδή τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης ήταν ενθαρρυντικά ακολούθησε βιολογική τους αποτίμηση στη BACE-1. Πέντε παράγωγα της ρεσβερατρόλης παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση. Τα υπόλοιπα παράγωγα ήταν μη δραστικά. Τα γλυοξυλοϋλο-αροϋλο παράγωγα δεν εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση. Τα παράγωγα και των δύο ομάδων μελετήθηκαν επίσης για την καταστολή της επαγωγής του θανάτου των κυττάρων HT22 λόγω οξειδωτικού στρες. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο βιολογικών δοκιμασιών εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι δραστικές ενώσεις στη BACE-1 προστατεύουν τα νευρικά κύτταρα από τον οξειδωτικό θάνατο. Τα πειράματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης και Μοριακής Δυναμικής έδειξαν ότι τα πιο δραστικά παράγωγα εξασκούν ισχυρότερες θερμικές μεταβολές.

Μία από τις κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της νόσου Parkinson είναι οι αναστολείς της μονοαμινοοξειδάσης τύπου Β (MAO-B). Βιβλιογραφικές μελέτες υποστηρίζουν την ανασταλτική δράση των κουμαρινών έναντι της MAO-B και γι αυτό το λόγο μελετήθηκε μία σειρά 13 κουμαρινικών παραγώγων. Αρχικά εκτιμήθηκαν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των ενώσεων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της MAO-B. Τα αποτελέσματα από τις δύο μελέτες ήταν ενθαρρυντικά και γι αυτό έχουν σταλεί για τη βιολογική τους αποτίμηση.

Οι ΑΤ1 ανταγωνιστές εξασκούν αντιοξειδωτικές δράσεις και μπορούν να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στη νόσο Alzheimer. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε το συνθετικό ανάλογο ΒV6 ως προς την πιθανή ανασταλτική του δράση έναντι της ΒΑCΕ-1 με τη βοήθεια της μοριακής πρόσδεσης. Τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά και πρόκειται να αποτιμηθεί η βιολογική του δράση.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ορθολογικός σχεδιασμός αναστολέων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ορθολογικός σχεδιασμός, εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, μοριακή μοντελοποίηση, μοριακή πρόσδεση, προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

ABSTRACT

The aim of this dissertation is the *in silico* rational design of new compounds against Alzheimer's and Parkinson diseases.

The aspartic protease BACE-1 is a therapeutic target for Alzheimer's disease. Therefore, a series of 11 resveratrol derivatives and 11 glyoxylato-aryylhydrazones were studied against BACE-1. Initially, we studied their ability to penetrate the blood brain barrier (BBB) and be absorbed by the cells of the intestine epithelium Caco2. Furthermore, molecular docking calculations were performed in the active site of BACE-1. The results were promising and the compounds were biologically evaluated against the enzyme. Resveratrol and four derivatives of resveratrol showed significant inhibitory activity. The remaining derivatives were inactive. The glyoxylato-aryylhydrazones showed no significant inhibitory activity. These derivatives were also studied for their suppress the induction of cell death due to oxidative stress of HT22 cells. The comparison of the results of these two biological tests reveals that the activity of these compounds may be dual: first act as BACE-1 inhibitors and second protect nerve cells from oxidative death. Experiments on Differential Scanning Calorimetry and Molecular Dynamics techniques showed that the most active compounds exert stronger thermal effects.

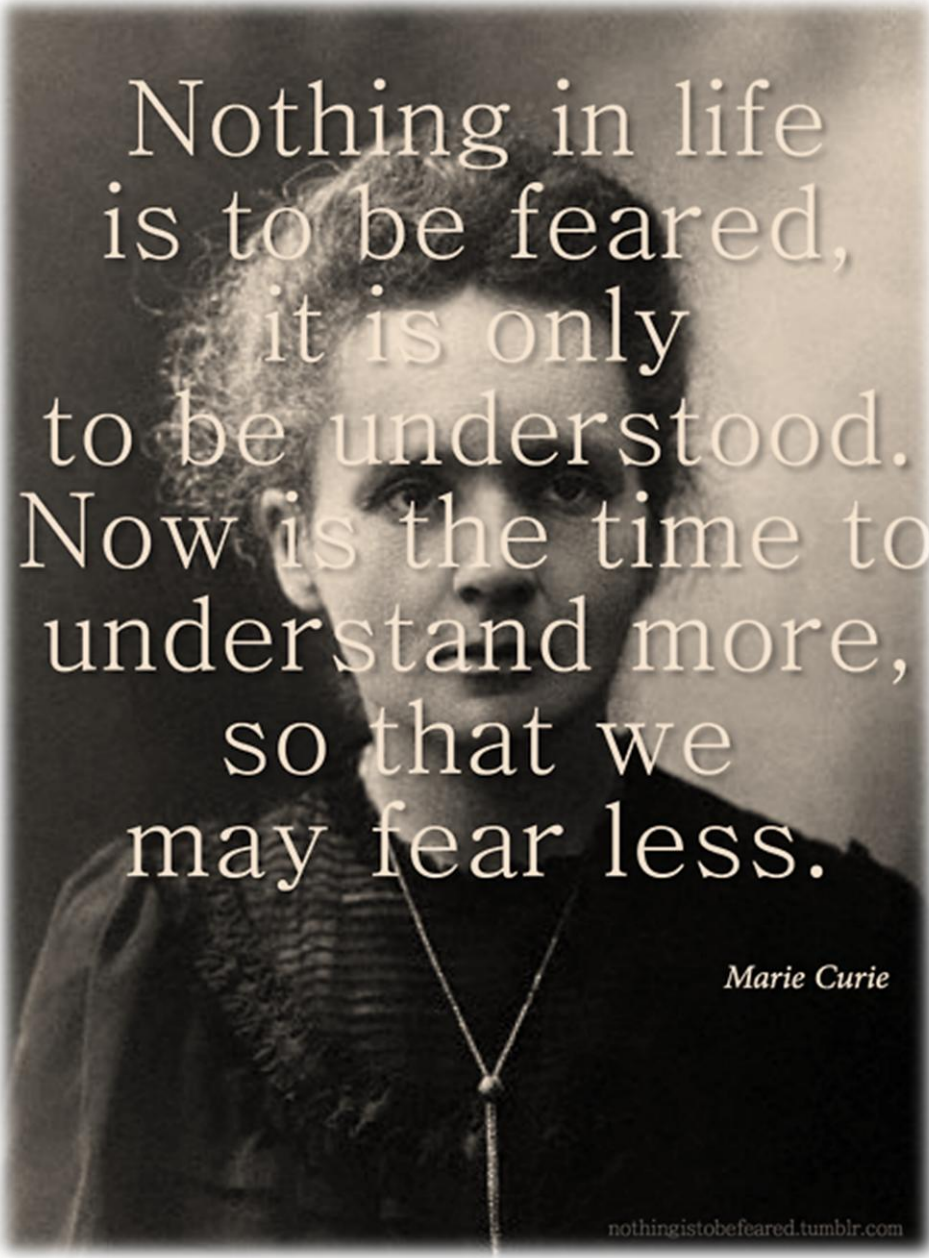
One of the classes of drugs used to treat Parkinson's disease is the monoamine oxidase type B (MAO-B). Literature studies support the inhibitory activity of coumarins against MAO-B. Thus, a series of 13 coumarin derivatives was studied. Initially, we evaluated the pharmacokinetic properties of the compounds and then we applied molecular docking in the active site of MAO-B. The results from both studies are encouraging and the compounds are under biological evaluation.

AT1 antagonists exert antioxidant effects and may have beneficial effects in Alzheimer's disease. For this reason, we investigated a possible

activity of the synthetic analogue BV6 against BACE-1 using molecular docking studies. The results are promising and BV6 will be shortly biologically evaluated.

SUBJECT AREA: Rational design of inhibitors

KEYWORDS: rational design, *in silico* evaluation of pharmacokinetic properties, molecular modeling, molecular docking, molecular dynamics simulations.



Nothing in life
is to be feared,
it is only
to be understood.
Now is the time to
understand more,
so that we
may fear less.

Marie Curie

nothingistobefared.tumblr.com

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγή κ. Θωμά, Μαυρομούστακο για την επιλογή του θέματος και τη συνεχή επιμέλεια και καθοδήγηση, που μου παρείχε ως επιβλέπων σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Ματθαίο Παπαδόπουλο, στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκαν ορισμένοι υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής.

Ευχαριστώ επίσης θερμά τον κ. Γεώργιο Κόκοτο που αποδέκτηκε να είναι μέλος της τριμελούς μου επιτροπής.

Θερμές ευχαριστίες στις δύο ομάδες σύνθεσης του Τμήματος Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, με επικεφαλής την Ομότιμη Ερευνήτρια κ. Μαρία Μίχα-Σκρέττα και τον Ερευνητή Α' Βαθμίδας Barry Steele, και συνεργάτες την Ερευνήτρια Γ' βαθμίδας Carolina Vilalonga-Barber και το Μεταδιδακτορικό Συνεργάτη Dr. Robert Csonka, για τις ενώσεις που μου παρείχαν και που αποτιμήθηκαν βιολογικά ως αναστολείς της BACE-1.

Αποδίδω θερμές ευχαριστίες στην Καθηγήτρια κ. Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα του Τμήματος Φαρμακευτικής Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και το Μεταδιδακτορικό Συνεργάτη Δρ. Κοντογιώργη Χρήστο για τις ενώσεις που μου παρείχαν και που μελετήθηκαν *in silico* ως αναστολείς της MAO-B.

Επίσης θερμές ευχαριστίες αποδίδω στον Δρ. Γεώργιο Αγγελή και τη Δρα. Αμαλία Ρεσβάνη του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών για την παροχή της ένωσης BV6 και τη μελέτη της ως ανταγωνιστή του AT1 και της BACE-1.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω και για τον Dr. Oscar Belda της Ελβετικής Εταιρίας Medivir, για τη βιολογική αποτίμηση των ενώσεων κατά της BACE-1, τον Ερευνητή Α' Βαθμίδας κ. Μιχάλη Αλέξη, και τη Δρα. Ξανθίππη Αλέξη, του Τμήματος Βιολογικών Ερευνών & Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για τη βιολογική αποτίμηση των ενώσεων ως προς την προστασία

από οξειδωτικό θάνατο καθώς και τη Dr. Dolores Viña του Τμήματος Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου του Σαντιάγο ντε Καμποστέλα για τη συνεργασία της στη βιολογική αποτίμηση των ενώσεων κατά της MAO-B.

Επίσης θερμές ευχαριστίες εκφράζω για την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκτέλεση των υπολογισμών Μοριακής Δυναμικής στους Μεταδιδακτορικούς Συνεργάτες του Τμήματος Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών Δρ. Γεώργιο Λεώνη και του Ερευνητικού Πανεπιστημιακού Ινστιτούτου και Επιταχυντικών Συστημάτων και Εφαρμογών Δρ. Δημήτρη Ντελλή.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες επιθυμώ να εκφράσω και για τον Καθηγητή κ. Gabriele Cruciani του Τμήματος Οργανικής Χημείας, του Πανεπιστημίου της Περούντζια της Ιταλίας για την παροχή των προγραμμάτων VolSurf και MoKa.

Επίσης ευχαριστώ τους συναδέλφους Δρ. Δημήτρη Ντουντανιώτη, την υποψήφια Διδάκτορα Σοφία Βασιλακάκη, τον Υποψήφιο Διδάκτορα Χαράλαμπο Τζούπη, την Υποψήφια Διδάκτορα Ελένη Βροντάκη, τους κατόχους Μεταπτυχιακών Διπλωμάτων Ταχσίν Κελίτση, Ελένη Κουλουρίδη και Πηνελόπη Κολοκοτρώνη και τον Μεταπτυχικό Φοιτητή Ιωάννη Ανδρεαδέλη για την αγαστή συνεργασία που είχαμε καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	7
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	17
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	28
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	29
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	31
ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER.....	31
1.1 Εισαγωγή.....	32
1.2 β- Σεκρετάση (β-site of Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme, BACE-1).....	36
2.2 Ορθολογικός Σχεδιασμός (Rational Drug Design) αναστολέων β-σεκρετάσης.....	39
2.2.1 Πεπτιδομιμητικοί αναστολείς της β-σεκρετάσης.....	42
2.2.2 Μη πεπτιδομιμητικοί αναστολείς της BACE-1.....	54
2.2.3 Άλλες προσεγγίσεις για την ανάπτυξη καινοτόμων αναστολέων της BACE-1.....	59
2.3 Συμπεράσματα.....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	61
ΝΟΣΟΣ PARKINSON.....	61
2.1 Εισαγωγή.....	62
2.2 Ορθολογικός Σχεδιασμός αναστολέων MAO-B.....	67
2.2.1. Μη εκλεκτικοί και μη αντιστρεπτοί αναστολείς.....	67
2.2.2. Εκλεκτικοί αντιστρεπτοί και μη αντιστρεπτοί MAO-B αναστολείς.....	67

2.3 Προσέγγιση ανάπτυξης καινοτόμων αναστολέων με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ	69
2.4 Συμπεράσματα	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	76
ΝΕΑ ΠΟΛΥΣΤΟΧΕΥΜΕΝΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ.....	76
3.1 Εισαγωγή	77
3.2 Πολυπαραγοντικά Μόρια κατά των νευροεκφυλιστικών ασθενειών της Alzheimer και Parkinson.....	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	83
ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ	83
4.1 Εισαγωγή στο υπολογιστικό πακέτο AMBER.....	84
ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	87
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	90
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER	90
6.1 Εισαγωγή	91
Σχέση νόσου Alzheimer και οξειδωτικού στρες	91
6.2 Μελέτες Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης αναλόγων της ρεσβερατρόλης και αλληλεπίδρασή τους με τις διπλοστιβάδες διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης.....	95
6.3 Υπολογιστικές μελέτες στη BACE-1	104
6.3.1 <i>In silico</i> φαρμακοκινητικές μελέτες	105
A. Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού.....	105
B. Απορρόφηση από τα επιθηλιακά κύτταρα Caco2.....	106
6.3.2 Μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης	109

6.3.3 Μελέτες Μοριακής Δυναμικής	126
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	131
ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON	131
7.1 Υπολογιστικές μελέτες στη MAO-B	132
Α. Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού	132
Β. Απορρόφηση από τα επιθηλιακά κύτταρα Caco2	132
7.2 Μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης.....	135
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	142
ΠΟΛΥΣΤΟΧΕΥΜΕΝΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER.....	142
8.1 Εισαγωγή	143
AT1 ανταγωνιστές που στοχεύουν πιθανά και κατά της BACE-1	143
8.1.2 Ταυτοποίηση του μορίου BV6.....	144
8.1.3 Μοριακή Πρόσδεση στον AT1 υποδοχέα.....	151
8.4 Μοριακή Δυναμική.....	153
8.5 HOMO-LUMO ΤΟΥ BV6	155
8.6 Λιποφιλικότητα του BV6	156
8.7 Αλληλεπιδράσεις BV6 με λιπιδικές διπλοστιβάδες με χρήση Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, Φασματοσκοπίας Raman και Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Στερεάς Κατάστασης.....	156
Α. Πειράματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης	156
Β. Πειράματα φασματοσκοπίας Raman	160
Γ. Πειράματα ¹³ C CP/MAS	162
8.8 Αλληλεπιδράσεις BV6 σε μεσοπορώδη υλικά	162
Μοριακή Πρόσδεση του BV6 στη BACE-1	164
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.....	168

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ	168
9.1 Πειραματικό τμήμα	169
9.2 Υπολογιστικό τμήμα	170
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	176
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	177
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	178
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	187
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	189
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV	189
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V	201
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	205

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Διακυμάνσεις στα ποσοστά θνησιμότητας θανατηφόρων ασθενειών	32
Σχήμα 2: Στη ΝΑ παρατηρείται συνολική συρρίκνωση του εγκεφάλου, α. φυσιολογικός εγκέφαλος, β. ήπια μορφή ΝΑ, γ. σοβαρή μορφή ΝΑ (http://www.memeron.com/alzheimers.html).....	33
Σχήμα 3: Σύγκριση κυττάρων α. πάσχοντα από τη νόσο Alzheimer και β. υγιή	33
Σχήμα 4: Μεταβολικές οδοί της APP ²	34
Σχήμα 5: Δομές εγκεκριμένων φαρμάκων που χορηγούνται για την ασυμπτωματική βελτίωση θεραπεία της νόσου Alzheimer.....	35
Σχήμα 6: α. Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής της ανοικτής διαμόρφωσής της BACE-1 (PDB 2OHU), β. απεικόνιση της κρυσταλλογραφική δομής της κλειστής διαμόρφωσής της (PDB 1W51), γ. μεγεθυμένη απεικόνιση της υπέρθεσης του ενεργού κέντρου των δύο πρωτεϊνών (η ανοικτή διαμόρφωση παριστάνεται με μωβ και η κλειστή διαμόρφωση με κίτρινο). Η Tyr71 στην ανοικτή δομή λαμβάνει μια τέτοια διαμόρφωση έτσι ώστε να μη σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Trp76 και να μην καταλαμβάνει θέση ανάμεσα στις περιοχές S1 και S2. ³	37
Σχήμα 7: Σχηματική παρουσίαση του μηχανισμού δράσης της BACE-1 ⁴	38
Σχήμα 8: α. 1ο στάδιο και β. 2ο στάδιο μηχανισμού κατάλυσης των υποστρωμάτων πεπτιδικής φύσεως από τη BACE-1 ⁵	39
Σχήμα 9: Υπολογιζόμενες φυσικοχημικές ιδιότητες α. πολικής επιφάνειας και β. μοριακού βάρους 119 αντιπροσωπευτικών αναστολέων που προσδένονται στην κλειστή διαμόρφωση της BACE-1.....	40
Σχήμα 10: Υπολογιζόμενες φυσικοχημικές ιδιότητες α. πολικής επιφάνειας και β. μοριακού βάρους 92 αντιπροσωπευτικών αναστολέων που προσδένονται στην ανοικτή διαμόρφωση της BACE-1 ³	41

Σχήμα 11: Ικανότητες πρόσδεσης αναστολέων της α. κλειστής διαμόρφωσης και β. της ανοικτής διαμόρφωσης της BACE-1 ³	41
Σχήμα 12: Πεπτατίνη και ισοστερείς ομάδες πεπτιδομιμητικών αναστολέων της BACE-1 ⁶	42
Σχήμα 13: α. Το μόριο του OM99-2 (Ki=1,6 nM) με τα αμινοξέα που περιλαμβάνει β. αλληλεπιδράσεις του OM99-2 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου ⁷	43
Σχήμα 14: α. Δομή υδροξυαιθυλενικού παραγώγου (IC ₅₀ =6,6 nM) που συγκρυσταλλώθηκε με τη BACE-1 και το οποίο έχει ισχυρότερη δράση από το πρωτότυπο μόριο OM99-2, β. απεικόνιση της ένωσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, γ. κυριότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου ⁸	45
Σχήμα 15: α. Δομή του HE παραγώγου και οι διάφοροι υδρογονικοί δεσμοί που δημιουργεί με την BACE-1, β. αλληλεπιδράσεις του HE παραγώγου με τη BACE-1 ⁹	47
Σχήμα 16: α. Δομή της α-βενζυλονορστατίνης, β. και γ. Αλληλεπιδράσεις της α-βενζυλονορστατίνης με τη BACE-1 ¹⁰	48
Σχήμα 17: α. Υδροξυαιθυλαμινικό βιοδραστικό παράγωγο (IC ₅₀ =112 nM) και β. αλληλεπιδράσεις της ένωσης με τη BACE-1. Από το ρακεμικό μίγμα συγκρυσταλλώθηκε μόνο το S ισομερές	50
Σχήμα 18: α. Δομή του υδροξυαιθυλαμινικού παραγώγου (IC ₅₀ =2 nM στη BACE-1 και IC ₅₀ =474 nM στην Cat-D καθώς και IC ₅₀ =1 nM στη βιολογική δοκιμή με HEK (Human Embryonic Kidney) κύτταρα), β. Αλληλεπίδρασή του με την BACE-1	51
Σχήμα 19: α. Δομή του διφθοροαρυλοκυκλοεξυλο παραγώγου, β. Η θήκη S1':οπίσθια, άνω και αριστερή πλευρά, γ. Η θήκη S1': δεξιά και κάτω πλευρά (IC ₅₀ =47 nM στη BACE-1 και IC ₅₀ =25 nM στη καθεψίνη).....	52
Σχήμα 20: α. Δομή του πυραζολικού παραγώγου και β. τρόπος αλληλεπίδρασής του με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της BACE-1 και	

υπέρθηση με την ένωση 1 ($IC_{50}=12$ nM στη BACE-1 και $IC_{50}=300$ nM στη καθεψίνη).....	53
Σχήμα 21: α. Δομή του υδροξυαιθυλαμινικού παραγώγου ($IC_{50}=0,95$ μ M) και β. αλληλεπιδράσεις του υδροξυαιθυλαμινικού παραγώγου με την BACE-1 ...	54
Σχήμα 22: α. Δομή του ακυλογουανιδινικού αναστολέα ($IC_{50}=3,7$ μ M) και αλληλεπιδράσεις του με την BACE-1 σε απεικόνιση δύο και β. τριών διαστάσεων.....	54
Σχήμα 23: α. Δομή του 2-αμινο-3,4-διϋδροκιναζολινικού παραγώγου ($K_i=900$ nM), β. υδρογονικοί δεσμοί με τα ασπαρτικά αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου, γ. υπέρθεση OM99-2 (γαλάζιο) με το 2-αμινο-3,4-διϋδροκιναζολινικό παράγωγο (κίτρινο), δ. υπέρθεση του ενεργού κέντρου του ενζύμου όταν προσδένεται το παράγωγο (ματζέντα) και η ένωση OM99-2 (γαλάζιο).....	55
Σχήμα 24: α. Δομή ρακεμικού μίγματος του παραγώγου ($K_i=11$ nM για το S εναντιομερές), β. εισδοχή του α-εξακυκλικού υποκαταστάτη στην S1' θήκη..	56
Σχήμα 25: α. Δομή παραγώγου αμινοϊμιδαζόλης και β. αλληλεπιδράσεις του με τη BACE-1	57
Σχήμα 26: α. Δομή παραγώγου αμινοϊμιδαζόλης και β. αλληλεπιδράσεις του με τη BACE-1	57
Σχήμα 27: α. Αμινοπυριμιδινικό παράγωγο το οποίο δεν αλληλεπιδρά με την καταλυτική δυάδα των ασπαρτικών αμινοξέων του ενεργού κέντρου, β. αλληλεπιδράσεις του αμινοπυριμιδινικού με το ενεργό κέντρο της BACE-1 ..	58
Σχήμα 28: Ανάπτυξη 6-υποκαταστημένων 2-αμινοπυριδινών 1-4	59
Σχήμα 29: Σε ασθενή με τη νόσο Parkinson (εικόνα δεξιά) παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα ντοπαμίνης σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου. Σύγκριση με μη πάσχοντα (εικόνα αριστερά).....	63
Σχήμα 30: Μεταβολισμός της L-τυροσίνης.....	64
Σχήμα 31: Δομή της τυραμίνης. Ενοχοποιείται για την υπερτασική κρίση και τις εγκεφαλικές αιμορραγίες που προκαλεί στους ασθενείς που λαμβάνουν αναστολείς MAO	65

Σχήμα 32: Η τρανυλοκυπρομίνη είναι ένας μη εκλεκτικός MAO αναστολέας που προκαλεί την παρενέργεια του τυριού	65
Σχήμα 33: Μετατροπή MPTP σε MPP+ από τη MAO-B.....	66
Σχήμα 34: Μη εκλεκτικοί και μη αντιστρεπτοί αναστολείς MAO	67
Σχήμα 35: Εκλεκτικοί μη ανιστρεπτοί MAO-B αναστολείς.....	68
Σχήμα 36: Μεταβολισμός των εκλεκτικών MAO-B αναστολέων σελεγιλίνης και ρασαγιλίνης.....	68
Σχήμα 37: Σύνθεση ντοπαμίνης και ο μεταβολισμός της από τις ισομορφές MAO-A και MAO-B. Στο σχεδιάγραμμα δείχνονται και σημεία που δρουν διάφορα φαρμακευτικά μόρια.....	69
Σχήμα 38: Η μονομερική μονάδα της τρισδιάστατης δομής της ανθρώπινης MAO-B συμπλεγμένης με το 1,3-διφαινυλο-2-βουτένιο. Η περιοχή πρόσδεσης FAD (αμινοξέα 4-79, 211-285 και 391-453) είναι ζωγραφισμένη με μπλε χρώμα, η περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (αμινοξέα 80-210, 286-390 και 454-488) είναι χρωματισμένη με κόκκινο και η C-τελική περιοχή της πρόσδεσης της μεμβράνης (αμινοξέα 489-500) με πράσινο. Το συνένζυμο της FAD και ο αναστολέας παριστάνονται με κίτρινες και μαύρες σφαίρες και ράβδους μοντέλα αντίστοιχα. Ο αναστολέας δεσμεύεται στην κοιλότητα (δείχνεται με κυανή επιφάνεια) η οποία προκύπτει από τη συγχώνευση της εισόδου και τις κοιλότητες υποστρώματος.	70
Σχήμα 39: Τα δύο μόρια ρασαγιλίνη και TVP-1022 στο ενεργό κέντρο.....	71
Σχήμα 40: Κουμαρινικά παράγωγα και η δράση τους ως MAO αναστολείς...	72
Σχήμα 41: Πόζες πρόσδεσης των ενώσεων 22b και 22k (δείχνονται με κίτρινο και κυανό χρώμα αντίστοιχα και με μοντέλα ράβδων). Τα αμινοξέα και ο συμπαράγοντας βρίσκονται γύρω από τα δύο κουμαρινικά παράγωγα. Τα άτομα του άνθρακα παριστάνονται με πράσινο στα αμινοξέα και με κίτρινο στο FAD συμπαράγοντα. Τα μόρια του νερού παριστάνονται με κόκκινες σφαίρες και οι υδρογονικοί δεσμοί με μαυρισμένες μπλε διακεκομμένες γραμμές	73

Σχήμα 42: α. Δομή του ισχυρότερου και εκλεκτικότερου αναστολέα 2-θειαζολυδραζονικού παραγώγου. Σταθερότερα σύμπλοκα του ίδιου μορίου στις β. MAO-A και γ. MAO- B. Ο αναστολέας δείχνεται με μπλε χρώμα και σε CPK μοντέλο το FAD. Αναγράφονται τα αμινοξέα που βρίσκονται στη χωρική γειτονία του αναστολέα.	75
Σχήμα 43: Χημικές δομές παραγώγων: α. φλαβονόνης, β. ετεροαρυλισοπροτυλαμίνης	75
Σχήμα 44: Στη σύγχρονη προσέγγιση για την ανάπτυξη καινοτόμων μορίων σε πολυπαραγοντικές ασθένειες στοχεύονται πολλαπλοί στόχοι σε βιοχημικές οδούς υπεύθυνες για την ασθένεια	77
Σχήμα 45: Στη μέθοδο FBDD χρησιμοποιούνται αρχικά μικρά δομικά τμήματα A και B τα οποία προσδένονται στους στόχους A και B. Τα τμήματα αυτά βελτιώνονται ώστε να λάβουν συμπληρωματικά σχήματα με τις θήκες πρόσδεσης (rocketing).....	79
Σχήμα 46: Η ένωση μεμοκίνη όπως προκύπτει από το σχήμα αποτελεί ένα υβρίδιο της καρποκταμίνης (carpocetamine) και του βενζοκινονικού τμήματος του μιτοχονδριακού αντιοξειδωτικού συνενζύμου Q (CoQ).....	80
Σχήμα 47: Ένωση χρήσιμη για την ασθένεια της Parkinson η οποία περιλαμβάνει δομικά στοιχεία από τα μόρια της ρασαγιλίνης και της νιβαστιγμίνης	81
Σχήμα 48: Καφεΐνη και παράγωγα καφεΐνης ως αναστολείς της A2A και MAO- B	82
Σχήμα 49: Σχεδιάγραμμα πορείας υπολογισμών με το πακέτο Amber	86
Σχήμα 50: Σχηματική παράσταση των μηχανισμών της οξειδωσης των λιπιδίων και της φλεγμονής στην παθογένεια της νόσου Alzheimer	91
Σχήμα 51: Μοριακός μηχανισμός της νευροπροστατευτικής δράσης της ρεσβερατρόλης στη νόσο του Alzheimer	92

Σχήμα 52: Μηχανισμός της νευροπροστατευτικής δράσης της ρεσβερατρόλης ενάντια στον οξειδωτικό θάνατο των κυττάρων HT22 που επάγεται από το γλουταμινικό οξύ	93
Σχήμα 53: Χημικές δομές της ρεσβερατρόλης, γνεΐνης και βιτισΐνης Β	94
Σχήμα 54: Θερμογραφήματα στα οποία εμφένονται οι θερμικές μεταβολές που προκαλούν στις διπλοστιβάδες του DPPC η παρουσία στιλβενοειδών παραγώγων 1-14	101
Σχήμα 55: Κατανομή κατά τον z άξονα της μεμβράνης α) των οξυγόνων (O15, O17 και O19) της ένωσης 2, β) των οξυγόνων (O14, O15 και O16) της ένωσης 14 και των φωσφόρων (P8) των λιπιδίων	103
Σχήμα 56: Προβολή των παραγώγων της ρεσβερατρόλης (κίτρινο) στα μοντέλα του λογισμικού VolSurf: α. αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) και β. Caco2	107
Σχήμα 57: Προβολή των γλυοξυλοϋλο-αροϋλο παραγώγων (κίτρινο) στα μοντέλα του λογισμικού VolSurf : α. αιματοεγκεφαλικού φραγμού και β. Caco2	108
Σχήμα 58: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του LO1 με το ενεργό κέντρο της BACE-1	109
Σχήμα 59: Μορφές ασπαρτικού οξέος	112
Σχήμα 60: Μορφές πρωτονΐωσης και αποπρωτονΐωσης (AspUP) της καταλυτικής δυάδας. Ο συμβολισμός “i” (inner) αναφέρεται στην πρωτονΐωση του εσωτερικού οξυγόνου (OD1) του αμινοξέος και ο συμβολισμός “o” (outer) στην πρωτονΐωση του εξωτερικού οξυγόνου (OD2) του αμινοξέος. ⁶²	112
Σχήμα 61 Δομή του αναστολέα LO1 και προβλεπόμενες τιμές pKa στις αντίστοιχες ομάδες που μπορεί να πρωτονιωθούν σε pH 6,6	117
Σχήμα 62: Διαμόρφωση του αναστολέα του 1W51 όπως προκύπτει από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα (πράσινο) σε σύγκριση με τη διαμόρφωση της προβλεπόμενης διαμόρφωσης (κίτρινο) από το πρόγραμμα Glide.....	118

Σχήμα 63: Σχηματική α. τρισδιάστατη και β. δισδιάστατη παράσταση του ενεργού κέντρου όπου προσδένεται το παράγωγο της ρεσβερατρόλης 14. Οι δεσμοί υδρογόνου της ένωσης 14 με τα αμινοξέα Ser328 και Thr329 παριστάνονται με διακεκομμένη γραμμή. Οι αλληλεπιδράσεις με τα υδρόφοβα αμινοξέα εμφανίζονται με πράσινο χρώμα. Η επεξήγηση των χρωμάτων όλων των Σχημάτων που αφορούν στις μελέτες μοριακής πρόσδεσης παριστάνονται στο Παράρτημα IV.....	121
Σχήμα 64: Σχηματική α. τρισδιάστατη και β. δισδιάστατη παράσταση του ενεργού κέντρου όπου προσδένεται το παράγωγο της ρεσβερατρόλης 12. Ο δεσμός υδρογόνου της ένωσης 12 με τα αμινοξέα Tyr198 και Thr329 παριστάνεται με διακεκομμένη γραμμή.....	122
Σχήμα 65: Επάνω: Θέση πρόσδεσης της διαμόρφωσης του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14 (κίτρινο) και της κρυσταλλογραφημένης δομής του αναστολέα του ενζύμου LO1 (γαλάζιο). Κάτω: Μεγέθυνση όπου παριστάνονται οι λεπτομέρειες των δύο θέσεων πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του LO1 και του παραγώγου της ρεσβερατρόλης.....	123
Σχήμα 66: Θέση πρόσδεσης της διαμόρφωσης του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14 (πράσινο) σε σύγκριση με τη θέση πρόσδεσης της κρυσταλλογραφημένης ένωσης του αναστολέα του ενζύμου LO1 (γαλάζιο) και της ρεσβερατρόλης (γκρι)	124
Σχήμα 67: Χωρική εγγύτητα της 1-αιθυλοπρόπυλο ομάδας της ένωσης 14 και της 10s θηλιάς καθώς και του πτερυγίου	124
Σχήμα 68: α. Δισδιάστατη παράσταση του ενεργού κέντρου όπου προσδένεται το παράγωγο της υδραζόνης 6	125
Σχήμα 69: Διαμόρφωση του γλυοξυλοϋλο-αρούλο παραγώγου 6 (καφέ) που προκύπτει από τη μοριακή πρόσδεση σε σύγκριση με τη διαμόρφωση της κρυσταλλογραφημένης δομής του αναστολέα του ενζύμου LO1 (γαλάζιο)..	125
Σχήμα 70: RMSD του συμπλέγματος της BACE-1 και του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14	126

Σχήμα 71: RMSD του συμπλέγματος της BACE-1 και του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 12	127
Σχήμα 72: Το σύμπλοκο του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14 στο ενεργό κέντρο της BACE-1 μετά από τον υπολογισμό της μοριακής δυναμικής. Με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή εμφανίζονται οι υδρογονικοί δεσμοί με τα αμινοξέα Lys107, Gln326, Ser328.	128
Σχήμα 73 Προβολή των κουμαρινικών παραγώγων στο μοντέλο α. BBB και β. στο μοντέλο Caco2 του λογισμικού VolSurf	134
Σχήμα 74 Χημική δομή της 7-(3-χλωροβενζυλοξυ)-4-(μεθυλοαμινο)μεθυλοκουμαρίνης.....	135
Σχήμα 75: Πρόσδεση της 7-(3-χλωροβενζυλοξυ)-4-(μεθυλοαμινο)μεθυλοκουμαρίνης στο ενεργό κέντρο της MAO-B.....	136
Σχήμα 76: Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της 7-(3-χλωροβενζυλοξυ)-4-(μεθυλοαμινο)μεθυλοκουμαρίνης με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου	136
Σχήμα 77 Διαμόρφωση του αναστολέα του 2V61 όπως προκύπτει από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα (πράσινο) σε σύγκριση με τη προβλεπόμενη διαμόρφωση (κίτρινο) από το πρόγραμμα Glide	137
Σχήμα 78: Προβλεπόμενη διαμόρφωση της ένωσης K9 (πράσινο) σε σύγκριση με τη διαμόρφωση του αναστολέα του ενζύμου (γαλάζιο).....	138
Σχήμα 79: Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του παραγώγου K9 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου παριστάνονται με βέλη	139
Σχήμα 80: Μοριακή δομή BV6	144
Σχήμα 81: ¹ H NMR φάσμα του BV6-Na σε διαλύτη D ₂ O διαχωρισμένο σε έξι περιοχές για την καλύτερη παρουσίαση. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz	146
Σχήμα 82: Η αρωματική περιοχή του 2D DQF-COSY φάσματος του BV6-Na σε διαλύτη D ₂ O. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz Varian INOVA σε θερμοκρασία 25°C	147

Σχήμα 83: Μεγεθυμένη περιοχή φάσματος 2D ROESY φάσματος του BV6-Na σε διαλύτη D ₂ O. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz Varian INOVA σε θερμοκρασία 25°C. Σε αυτό δείχνεται η σχέση μεταξύ H10 και του φαινυλικού δακτυλίου A και H10' με το φαινυλικό δακτύλιο A' και H2	148
Σχήμα 84: Μεγεθυμένη περιοχή του φάσματα 2D ROESY του BV6-Na σε διαλύτη D ₂ O. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz Varian INOVA σε θερμοκρασία 25°C. Στο φάσμα δείχνεται η σχέση μεταξύ H6, H7 και H8 και των πρωτονίων του φαινυλικού δακτυλίου A και του H2 με τα πρωτόνια H6, H7 και H8	149
Σχήμα 85: α, β Θέση πρόσδεσης του BV6 στο ενεργό κέντρο του AT1. Το αμινοξύ Phe 249 (κόκκινο χρώμα) είναι τοποθετημένο μεταξύ των διφαινυλομάδων του τετραζολίου του BV6.....	152
Σχήμα 86: Σύγκριση της διαμόρφωσης της λοσαρτάνης με τη διαμόρφωση του BV6 που προκύπτουν από τη μοριακή πρόσδεση	153
Σχήμα 87: Το πρώτο βήμα αλληλεπίδρασης AT1 ανταγωνιστών με τους υποδοχείς AT1 περιλαμβάνει την εισχώρηση τους στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Εκεί διαχέονται πλευρικά προς το ενεργό κέντρο όπου μέσω αμφοτερικών αλληλεπιδράσεων ενεργοποιούν τον υποδοχέα και τελικά αναστέλλουν τη δράση της αγγειοδιασταλτικής ορμόνης αγγειοτασίνης II.	153
Σχήμα 88: α. Γραφική παρουσίαση του συστήματος προσομοίωσης του BV6-Na όταν ενσωματώνεται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης. Στα σχήματα β. και γ. παριστάνονται οι σταθερότερες διαμορφώσεις που προσαρμόζει το μόριο BV6-Na κατά τον τοπογραφικό εντοπισμό του στις λιπιδικές διπλοστιβάδες	154
Σχήμα 89: HOMO και LUMO τροχιακά του μορίου BV6.....	155
Σχήμα 90: Δενδρόγραμμα με τη χρήση του οποίου αποφασίζεται η κατάταξη των παραγώγων του BV6 σε δραστικά ή μη δραστικά ανάλογα	155
Σχήμα 91: Μετάβαση φάσης λιπιδικής διπλοστιβάδας DPPC, όπως καταγράφεται με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης: (α) φάση στερεάς	

πηκτής (gel phase), (β) προμετάβαση φάσης (pretransition phase), (γ) κυματοειδής φάση (ripple phase), (δ) μετάβαση φάσης (transition phase), (ε) υγρή κρυσταλλική φάση (liquid phase)	159
Σχήμα 92: Διαφορικά θερμογραφήματα σάρωσης λιποειδών διπλοστιβάδων DPPC (κάτω) και των ίδιων διπλοστιβάδων που περιέχουν μοριακή αναλογία BV6 20%.....	159
Σχήμα 93: Λόγοι I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} λιποειδών διπλοστιβάδων διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης απουσία (μαύρες καμπύλες) και παρουσία (κόκκινες καμπύλες) BV6	161
Σχήμα 94: Φάσματα $^{13}\text{C}/\text{MAS}$ απουσία και παρουσία BV6 σε τρεις θερμοκρασίες (25 °C, 35 °C και 45 °C). Τα φάσματα είναι χωρισμένα σε τρεις περιοχές για την καλύτερη παρουσίασή τους.	162
Σχήμα 95: Η απώλεια βάρους του BV6 είναι μικρότερη στο σύστημα SBA-15 συγκριτικά με αυτό που είναι μόνο του. Αυτό είναι μία επιθυμητή ιδιότητα για τα φαρμακευτικά μόρια	163
Σχήμα 96: (α) XRPD φάσματα του BV6 σε σκόνη ή ενσωματωμένο στο μεσοπορώδες υλικό SBA-15. (β) $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ CPMAS φάσματα του BV6 ή BV6 ενσωματωμένου στο μεσοπορώδες υλικό SBA-15. Με τα XRPD κατανοείται ότι μέσα στο μεσοπορώδες υλικό SBA-15 το BV6 δεν έχει την ίδια κρυσταλλικότητα (απουσία κορυφών 5-35 μοίρες) συγκριτικά όταν βρίσκεται μόνο του. Με τα $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ CPMAS φάσματα παρατηρείται ότι τόσο το BV6 μόνο του ή όταν βρίσκεται στο μεσοπορώδες υλικό είναι εμφανείς οι κορυφές από το αρωματικό και αλειφατικό του τμήμα. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στους άνθρακες του σχήματος	163
Σχήμα 97: Θέση πρόσδεσης του BV6 στο ενεργό κέντρο της BACE-1	164
Σχήμα 98: Εμφάνιση δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ του BV6 και των αμινοξέων Tyr198, Arg235 και Thr232 (κίτρινη διακεκομμένη γραμμή)	165

Σχήμα 99: Υδρόφοβες (σφαίρες με πράσινο) και αρωματικές π-π αλληλεπιδράσεις (πράσινα βέλη) της ένωσης BV6 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου 166

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χημικές δομές των υπό μελέτη παραγώγων της ρεσβερατρόλης	96
Πίνακας 2: Χημικές δομές των γλυοξυλοϋλο-αρούλο παραγώγων της υδραζόνης.....	105
Πίνακας 3: Βιολογική αποτίμηση των παραγώγων της ρεσβερατρόλης ^α και της υδραζόνης ^β	110
Πίνακας 4: Σύνοψη των υπολογισμών της βιβλιογραφίας για τον καθορισμό της μορφής πρωτονίωσης.....	116
Πίνακας 5: Η διάρκεια παρουσίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ BACE-1 και του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14 ^α	128
Πίνακας 6: Συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης του παραγώγου 14 στη BACE-1, όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA	130
Πίνακας 7: Χημικές δομές των κουμαρινικών παραγώγων	133
Πίνακας 8: Τιμές βαθμολόγησης της πρόσδεσης των προσδετών (XP GScore) στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.....	138
Πίνακας 9: Βιολογική αποτίμηση των κουμαρινικών παραγώγων.....	140
Πίνακας 10 Χημικές μετατοπίσεις ¹ H NMR του μορίου BV6-Na σε διαλύτη D ₂ O. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz Varian INOVA σε θερμοκρασία 25°C	145
Πίνακας 11: Τιμές logP του BV6 και των AT1 ανταγωνιστών που αποτελούν φαρμακευτικά προϊόντα. Οι τιμές υπολογίστηκαν με χρήση του προγράμματος ALOGPS 2.1 ¹⁰²	156
Πίνακας 12: Τιμές pKa των ατόμων των παραγώγων της υδραζόνης σε pH = 4,5.....	187
Πίνακας 13. Επεξήγηση των χρωμάτων όλων των Σχημάτων που αφορούν στις μελέτες μοριακής πρόσδεσης.....	189

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διδακτορική αυτή διατριβή διεξήχθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα τον Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο.

Το έργο 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 ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Αποδίδονται ευχαριστίες στην κα. Αικατερίνη Δέρβη και κα. Μαριάννα Βλαστού για την άψογη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια του προγράμματος.



ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΝΟΣΟΣ ALZHEIMER

Απόσπασμα από το ποίημα της Irma Atlas αφιερωμένο στην ασθενή μητέρα της με Alzheimer

One thing that can't die

*Where is my mother?
Where did she go?
The one I so depended on,
The one I loved so.
She's here, but she's not,
Alzheimer's making her brain rot.
I look but do not find
My sweet mother so kind
And yet I know she is there
Even when she is not aware
Her love cannot be killed
It lives on inside her still
My love also will not die*

Irma Atlas

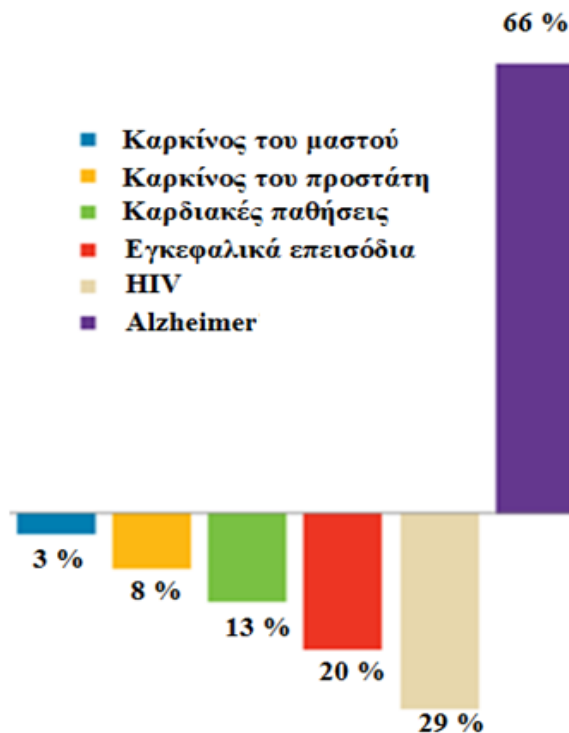
Κάτι που δεν πεθαίνει

*Που είναι η μητέρα μου;
Που να πήγε άραγε;
Από αυτήν εξαρτιόμουνα
Την αγαπούσα τόσο πολύ
Είναι παρούσα αλλά και απύσα
Η Αλζχάϊμερ της προκαλεί σήψη εγκεφαλική
Τη ψάχνω μα δε τη βρίσκω
Τη γλυκιά και καλοσυνάτη μητέρα μου
Αλλά ξέρω ότι είναι εκεί
κι' ας μη το ξέρει αυτή
Η αγάπη της δεν μπορεί να φονευθεί
Γιατί μεσ' την καρδιά της ακόμη ζει
Έτσι είναι η αγάπη μου γι' αυτή*

Ηλεκτρονική Πηγή: "Poems from the heart by caregivers, family members, and Alzheimer's victims", <http://www.zarcrom.com/users/yeartorem/ADpoetry/>

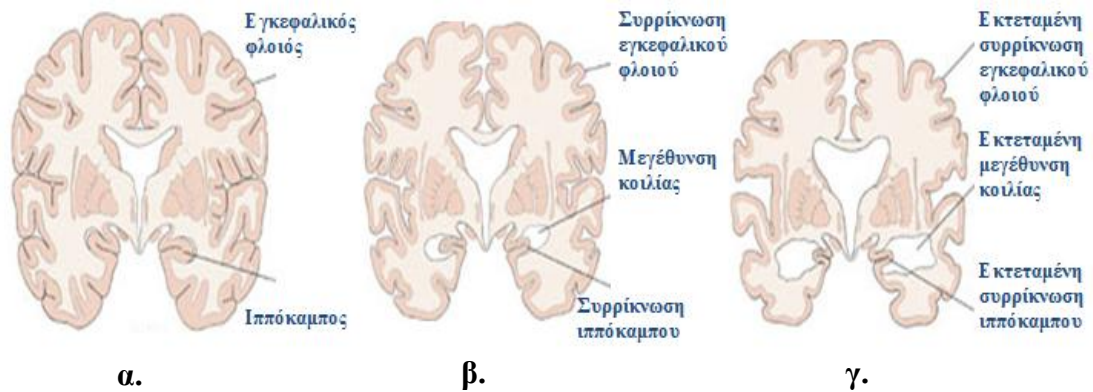
1.1 Εισαγωγή

Η νόσος Alzheimer (NA) αποτελεί τη συχνότερα απαντώμενη μορφή άνοιας, για την οποία όμως δεν υπάρχει μέχρι σήμερα διαγνωστική ή θεραπευτική μέθοδος. Με την αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης έχει αυξηθεί δραματικά ο αριθμός των πασχόντων. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό θνησιμότητας λόγω της NA αυξήθηκε κατά 66% από το 2000 έως και το 2008, σε αντίθεση με άλλες θανατηφόρες νόσους όπως ο καρκίνος όπου παρατηρήθηκε μείωση¹ (Σχήμα 1).



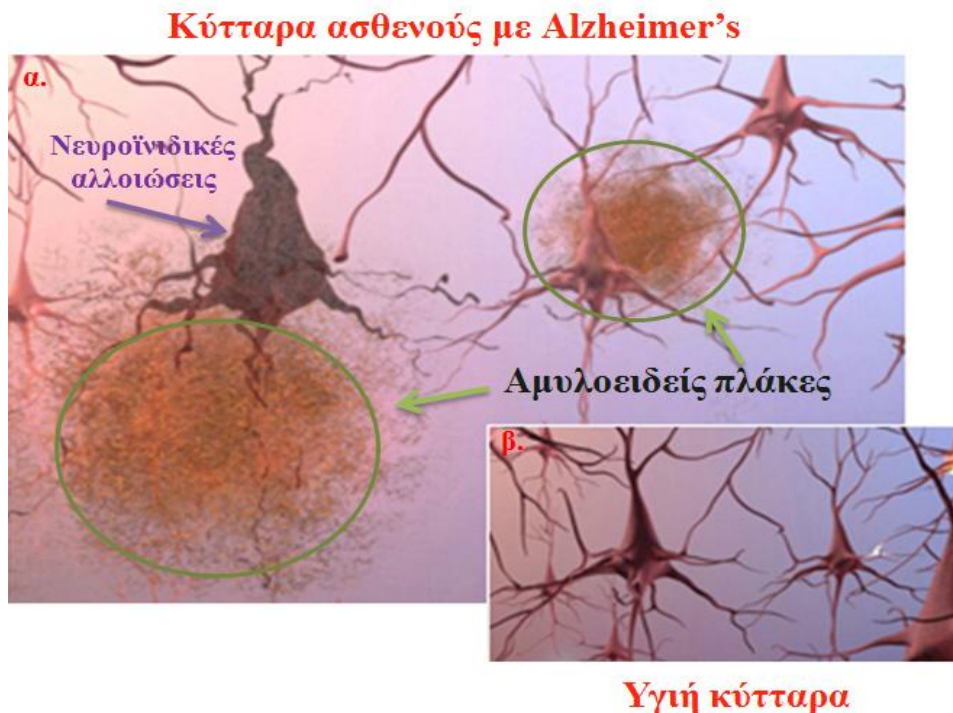
Σχήμα 1: Διακυμάνσεις στα ποσοστά θνησιμότητας θανατηφόρων ασθενειών τα έτη 2000-2008¹

Η NA προκαλεί μία βαθμιαία εκφύλιση των νευρώνων του εγκεφάλου και έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή έκπτωση των νοητικών ικανοτήτων, της κινητικότητας και της καθημερινής λειτουργικότητας του ατόμου. Στο Σχήμα 2 παρατηρούνται οι διαφοροποιήσεις στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του εγκεφάλου ενός ασθενούς με Alzheimer σε σχέση με ένα φυσιολογικό εγκέφαλο.



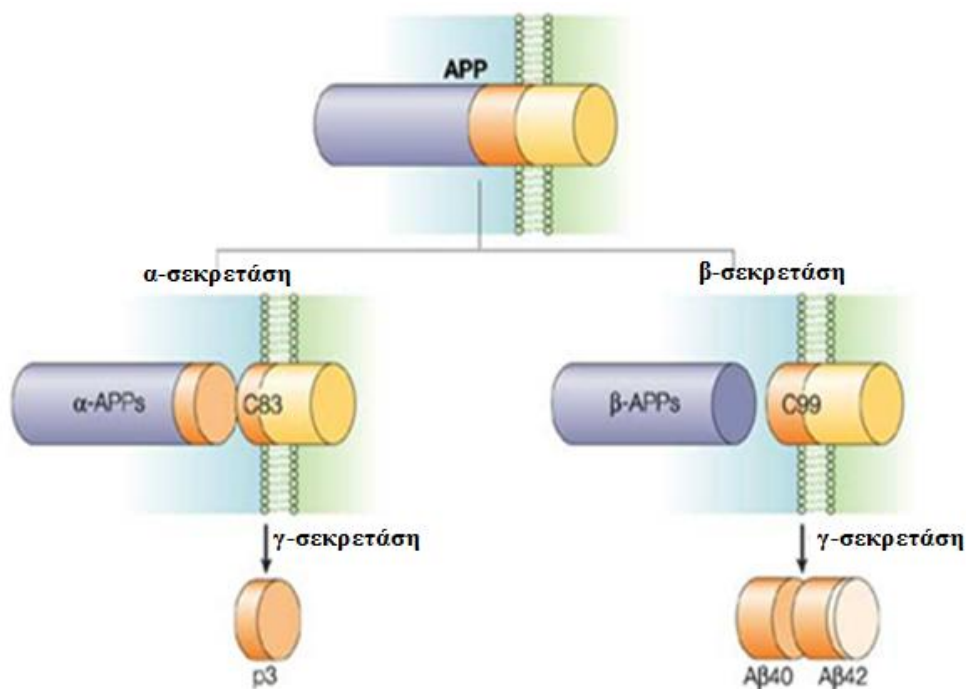
Σχήμα 2: Στη ΝΑ παρατηρείται συνολική συρρίκνωση του εγκεφάλου, α. φυσιολογικός εγκέφαλος, β. ήπια μορφή ΝΑ, γ. σοβαρή μορφή ΝΑ (<http://www.memeron.com/alzheimers.html>)

Παθολογικά χαρακτηρίζεται από τις γεροντικές ή αμυλοειδείς πλάκες (ΑΠ) και τις νευροϊνιδικές αλλοιώσεις (ΝΙΑ) (Σχήμα 3).



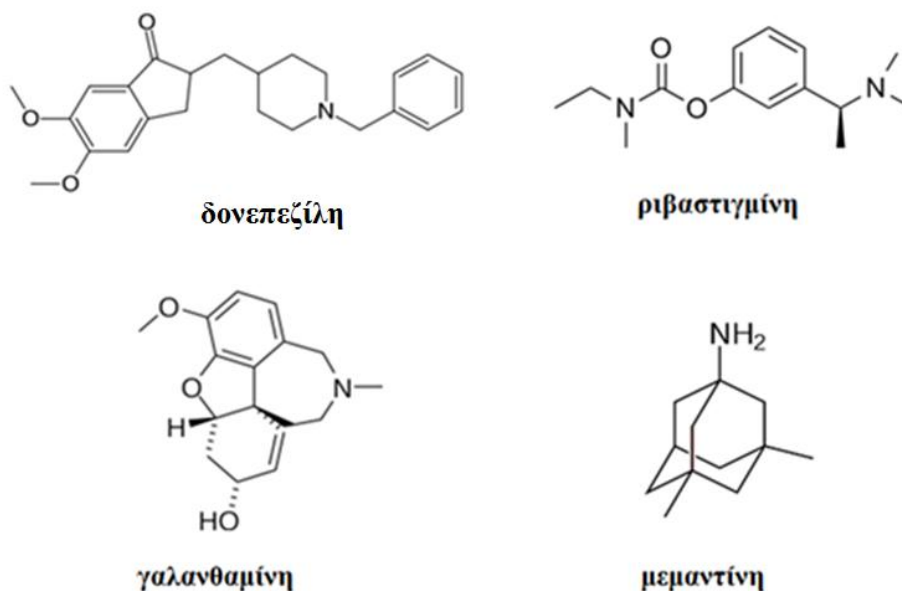
Σχήμα 3: Σύγκριση κυττάρων α. πάσχοντα από τη νόσο Alzheimer και β. υγιή (http://www.alz.org/research/science/alzheimers_brain_tour.asp)

Οι αμυλοειδείς πλάκες αποτελούνται από το β-αμυλοειδές (Aβ), ένα πρωτεϊνικό τμήμα μιας μεγαλύτερης πρωτεΐνης που ονομάζεται πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP). Η πρωτεΐνη APP είναι μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα που περατώνει στην αμινοτελική ομάδα και ένα μικρό εσωκυττάριο τμήμα που περατώνει στην καρβοξυτελική ομάδα. Οι κύριες μεταβολικές οδοί κατά τις οποίες διασπάται η APP είναι: η οδός της α-σεκρετάσης και η οδός σχηματισμού του β-αμυλοειδούς. Στην πρώτη περίπτωση, η α-σεκρετάση διασπά στη μέση της αμυλοειδούς περιοχής και παράγεται ένα μεγάλο διαλυτό θραύσμα μη παθογόνο α-APPs. Το καρβοξυτελικό πεπτίδιο C83 μεταβολίζεται σε p3 (Aβ 17-42) (μη παθογόνο) από τη γ-σεκρετάση. Στην δεύτερη μεταβολική οδό, η β-σεκρετάση απελευθερώνει ένα μεγάλο διαλυτό θραύσμα β-APPs. Το καρβοξυτελικό πεπτίδιο C99 διασπάται έπειτα διά της γ-σεκρετάσης σε διάφορες θέσεις, που οδηγούν στο σχηματισμό του Aβ 40 (μη παθογόνο) και του παθογόνου αμυλοειδούς (Aβ 42)² (Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Μεταβολικές οδοί της APP²

Η φαρμακολογική παρέμβαση σε μοριακό επίπεδο δεν είναι αιτιολογική αλλά αποσκοπεί στη βελτίωση ή και την αποκατάσταση των μεταβολών που παρατηρούνται κατά τη νόσο. Τα μέχρι στιγμής εγκεκριμένα φάρμακα για την αντιμετώπιση της νόσου είναι μια ομάδα αναστολέων της ακετυλοχολινεστεράσης, ενός ενζύμου που διασπά το νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (στον εγκέφαλο ασθενών με ΝΑ έχει παρατηρηθεί ελάττωση της δραστηριότητας της ακετυλοχολίνης): Τέτοια φάρμακα αποτελούν η δονεπεζίλη (Aricept), ριβαστιγμίνη (Exelon) και γαλανθαμίνη (Reminyl). Ακόμη, χορηγείται η μεμαντίνη (Ebixa) ένα φάρμακο το οποίο αναστέλλει την αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης Ca^{2+} που προκύπτει από την ανώμαλη ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA (N-methyl-D- aspartate) στη νόσο ΝΑ (Σχήμα 5).



Σχήμα 5: Δομές εγκεκριμένων φαρμάκων που χορηγούνται για την ασυμπτωματική βελτίωση θεραπεία της νόσου Alzheimer

Τα φάρμακα αυτά βελτιώνουν τη μνήμη και την ικανότητα σκέψης ασθενών με ΝΑ, αλλά όπως έχει αναφερθεί δε στοχεύουν στην αιτιολογική θεραπεία. Για το λόγο αυτό οι νεότερες επιστημονικές έρευνες εστιάζονται στην παρεμπόδιση του σχηματισμού και της συγκέντρωσης του β-αμυλοειδούς.

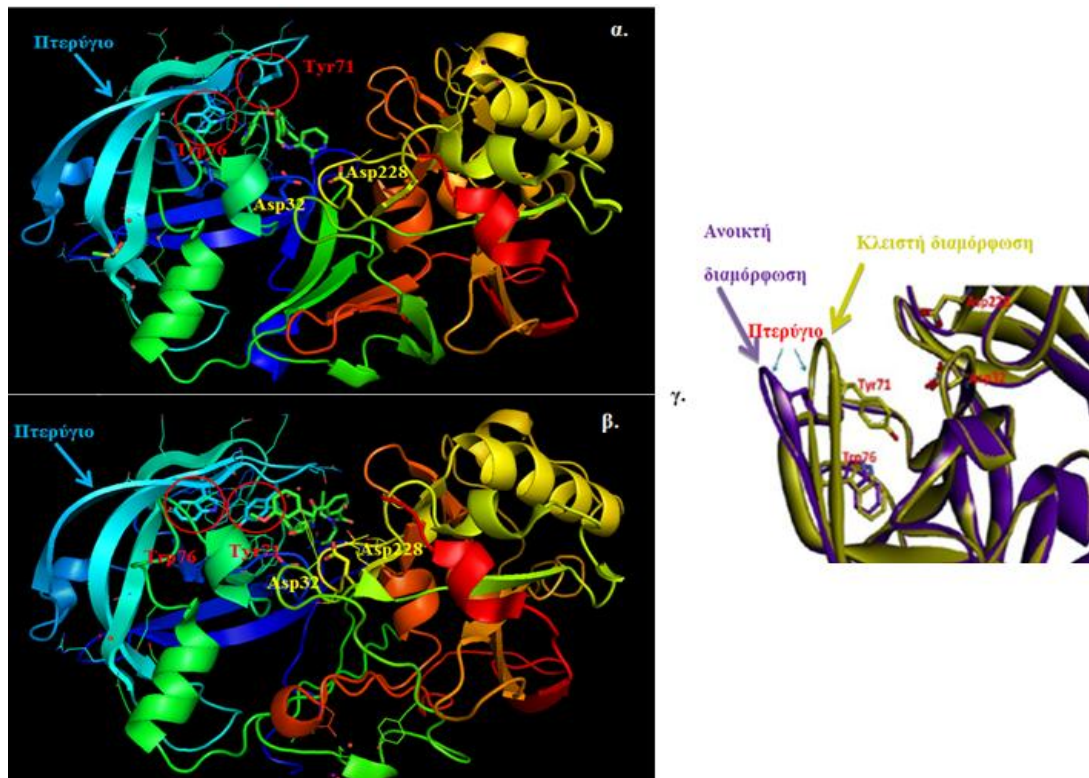
1.2 β- Σεκρετάση (β-site of Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme, BACE-1)

Η BACE-1³ είναι μία ασπαρτική, μονομερής πρωτεάση στο ενεργό κέντρο της οποίας υπάρχουν δύο ασπαρτικά αμινοξέα, τα Asp32 και Asp228, που βρίσκονται μεταξύ των N- και C- τελικών περιοχών και κατευθύνουν την υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών των υποστρωμάτων. Το ενεργό κέντρο είναι προστατευμένο από ένα β βρόχο φουρκέτα (β hairpin loop) μεταξύ των αμινοξέων Val67 και Glu77, ο οποίος σχηματίζει ένα μεγάλο τμήμα της περιοχής πρόσδεσης και παρέχει θωράκιση από το διαλύτη για να διευκολύνεται η κατάλυση.

Ο β βρόχος φουρκέτας, κοινώς "πτερύγιο" (flap), είναι το πιο ευέλικτο τμήμα της θέσης πρόσδεσης και λαμβάνει πολλαπλές διαμορφώσεις σε θερμοκρασία δωματίου. Η Tyr71, υιοθετεί μια διαμόρφωση συμπληρωματική ως προς το σχήμα και τη φύση του υποκαταστάτη που προσδένεται στο ενεργό κέντρο.

Η διαμόρφωση της πρωτεΐνης ορίζεται ως "κλειστή", όταν η Tyr71 βρίσκεται ανάμεσα στις περιοχές S1 και S2, και σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου της Tyr71 και της ομάδας -NH της Trp76. Η διαμόρφωση της BACE-1 ορίζεται ως "ανοικτή" όταν το πτερύγιο κινείται μακριά από την καταλυτική ασπαρτική δυάδα με αποτέλεσμα να μη σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων του πτερυγίου Tyr71 και Trp76 και η Tyr71 να μην κατέχει θέση μεταξύ των S1 και S2 περιοχών (Σχήμα 6).

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένα σύμπλοκα στην ανοικτή μορφή, όπου παρατηρείται ασθενής δεσμός υδρογόνου ή υδατο-μεσολαβούμενος δεσμός υδρογόνου μεταξύ της Tyr71 και της Trp76. Αυξημένη ευελιξία παρατηρείται επίσης και με πολλαπλές διαμορφώσεις στο βρόχο 10s, που γειτνιάζει με τη Ser10 και βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με τη θήκη S3. Η BACE1 σε ελεύθερη κατάσταση έχει ένα δίαυλο νερού στην "ειδική θήκη" κοντά στην περιοχή του βρόχου 10s (ορίζεται ως ειδική θήκη, γιατί τα αρχικά πεπτιδικά υποστρώματα δεν περιείχαν αμινοξέα που να καταλαμβάνουν αυτό το χώρο).

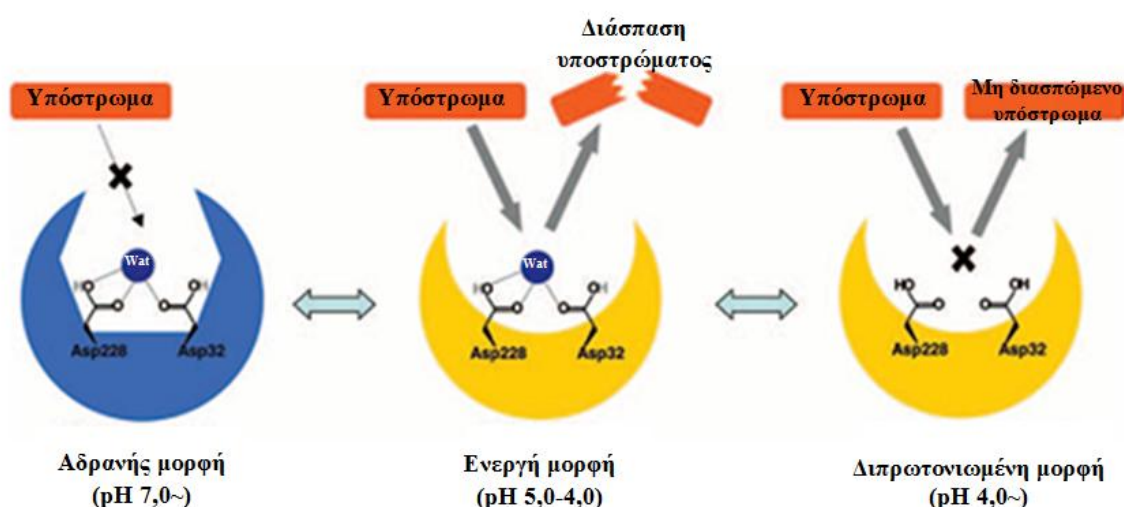


Σχήμα 6: α. Απεικόνιση της κρυσταλλογραφικής δομής της ανοικτής διαμόρφωσής της BACE-1 (PDB 2OHU), β. απεικόνιση της κρυσταλλογραφική δομής της κλειστής διαμόρφωσής της (PDB 1W51), γ. μεγεθυμένη απεικόνιση της υπέρθεσης του ενεργού κέντρου των δύο πρωτεϊνών (η ανοικτή διαμόρφωση παριστάνεται με μωβ και η κλειστή διαμόρφωση με κίτρινο). Η Tyr71 στην ανοιχτή δομή λαμβάνει μια τέτοια διαμόρφωση έτσι ώστε να μη σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Trp76 και να μην καταλαμβάνει θέση ανάμεσα στις περιοχές S1 και S2.³

Σε κρυστάλλους της ελεύθερης, μη συμπλοκοποιημένης μορφής του ενζύμου, παρατηρείται ένα μόριο νερού μεταξύ των καταλυτικών αμινοξέων Asp32 και Asp228 (PDB κωδικός 1W50) και το νερό αυτό πιστεύεται ότι λαμβάνει μέρος στην κατάλυση της υδρολυτικής διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων Met και Asp της APP. Στην πλειοψηφία των κρυσταλλικών δομών της BACE-1, οι καρβοξυλικές ομάδες της καταλυτικής δυάδας βρίσκονται σχεδόν στο ίδιο επίπεδο με ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου που αφορούν τις ομάδες -NH των αμινοξέων Gly34 και Thr231, και των υδροξυλίων της Ser35 και της Thr231. Αυτή η δομή των καταλυτικών αμινοξέων έχει προταθεί ως ένα ουσιαστικό στοιχείο για την εκδήλωση

δράσης των ασπαρτυλο-πρωτεασών και αυτό ενδέχεται να ισχύει και στη BACE-1.

Οι τιμές pK_a των δύο ασπαρτικών αμινοξέων έχουν προσδιοριστεί με κινητικές μελέτες ισοτόπων διαλύτη και είναι 3,5 για τη βάση $Asp-COO^-$ και 5,2 για το οξύ $Asp-COOH$. Το ένζυμο παρουσιάζει βέλτιστη καταλυτική δράση σε pH 4,5 *in vitro*⁴ (Σχήμα 7) και πιστεύεται ότι λειτουργεί σε ελαφρώς υψηλότερο pH *in vivo* στον αυλό των ενδοσωμάτων. Αναστολείς που περιέχουν μια βασική αμίνη με τιμή pK_a 6,0 ή μεγαλύτερη εμφανίζουν ισχυρή συγγένεια με τη BACE-1 (στη βέλτιστη όξινη συνθήκη για το ένζυμο).

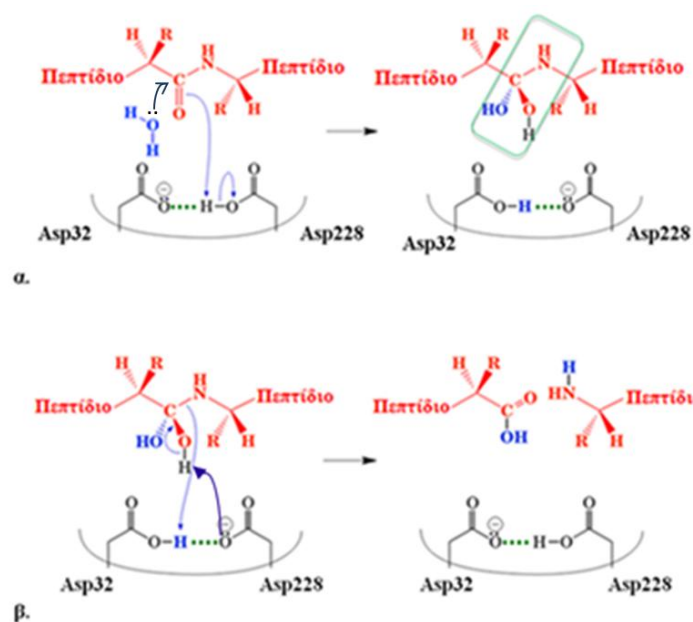


Σχήμα 7: Σχηματική παρουσίαση του μηχανισμού δράσης της BACE-1⁴

Σε $pH=7,0$ το υπόστρωμα προσδένεται χωρίς να προκαλεί τη διάσπαση. Η διάσπαση προκαλείται σε $pH=5,0-4,0$. Όταν το pH ελαττωθεί ακόμη περισσότερο το υπόστρωμα δεν ενεργεί στο καταλυτικό κέντρο για να διασπασθεί.

Ο μηχανισμός της κατάλυσης πραγματοποιείται σε δύο στάδια: κατά το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα μία πυρηνόφιλη προσθήκη από ένα μόριο νερού, που βρίσκεται στο καταλυτικό κέντρο, στο καρβονύλιο του υποστρώματος και ακολουθεί απόσπαση ενός πρωτονίου από το Asp228 (Σχήμα 8α). Κατά το δεύτερο στάδιο το Asp228 αποσπά ένα πρωτόνιο από τα

δύο υδροξύλια του υποστρώματος που έχουν σχηματιστεί και ταυτόχρονα διασπάται ο αμιδικός δεσμός C-N (Σχήμα 8β).⁵



Σχήμα 8: α. 1ο στάδιο και β. 2ο στάδιο μηχανισμού κατάλυσης των υποστρωμάτων πεπτιδικής φύσεως από τη BACE-1⁵

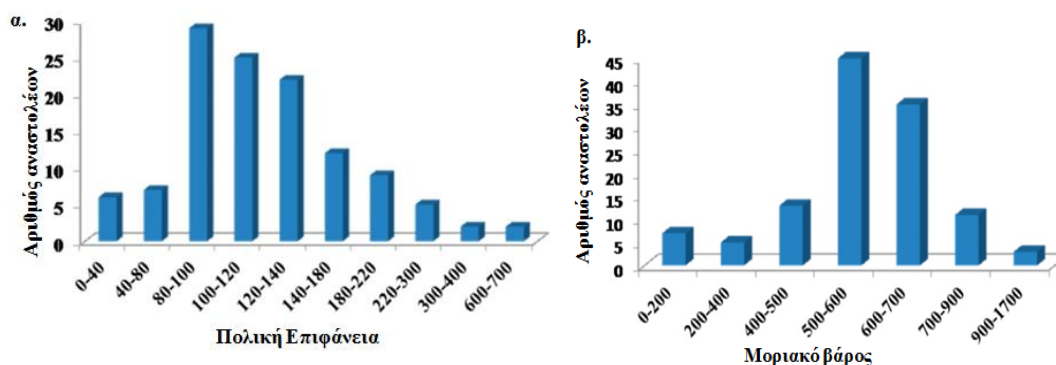
2.2 Ορθολογικός Σχεδιασμός (Rational Drug Design) αναστολέων β-σεκρετάσης

Τα πεπτίδια γενικά αποτελούν υποστρώματα σε πολλές ενζυμικές αντιδράσεις και μπορούν να ρυθμίζουν την ενεργοποίηση ή παρεμπόδιση πολλών βιολογικών διεργασιών. Θεωρητικά, θα μπορούσαν να έχουν ευρεία εφαρμογή ως πιθανά θεραπευτικά μέσα. Παρουσιάζουν όμως αρκετά φαρμακοκινητικά μειονεκτήματα όταν εισέρχονται στον οργανισμό. Η ύπαρξη του πεπτιδικού δεσμού οδηγεί σε βιολογική αστάθεια με ταχεία πρωτεόλυση, μεταβολισμό, μεγάλο μοριακό βάρος, ενώ η υδροφιλία τους έχει ως αποτέλεσμα τη μη ικανοποιητική απορρόφηση από το επιθήλιο τοίχωμα του εντέρου, τη μικρή διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Για την άρση αυτών των μειονεκτημάτων συντίθενται πεπτιδομιμητικά μόρια. Είναι μόρια Δούρειοι Ίπποι γιατί ξεγελούν το βιολογικό σύστημα αφού το πεπτίδιο

υφίσταται συγκεκριμένες δομικές τροποποιήσεις για να μην παρουσιάζει τα μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν. Τέτοιες τροποποιήσεις είναι: κυκλοποίηση, μεταβολή πλευρικών αλυσίδων, αμιδικών δεσμών και σκελετού κ.λ.π.

Ήταν φανερό ότι η ερευνητική κοινότητα θα έπρεπε να προχωρήσει σε μη πεπτιδομιμητικούς αναστολείς. Μικρότερα δηλαδή οργανικά μόρια που δεν είχαν τα παραπάνω μειονεκτήματα. Τα πεπτιδομιμητικά μόρια που συντέθηκαν αποτέλεσαν τα μόρια οδηγούς για να εφαρμοσθεί ενδελεχής στρατηγική με βάση τη δομή ώστε να αναπτυχθούν καινοτόμα μικρού μοριακού βάρους οργανικά μόρια (Structure-Based Approach).

Οι πρώτες κρυσταλλογραφικές δομές της BACE-1 με πεπτιδομιμητικούς αναστολείς αφορούν σε υδροξυαιθυλενικά και υδροξυαιθυλαμινικά παράγωγα που αλληλεπιδρούν με την καταλυτική δυάδα Asp32 και Asp228. Αυτά τα μόρια είναι συνδεδεμένα με τη κλειστή μορφή του ενζύμου. Οι ισχυροί αναστολείς της κατηγορίας αυτής είναι υψηλού μοριακού βάρους και υψηλής πολικής επιφάνειας (Polar Surface Area, PSA) και κατά συνέπεια κατέχουν χαμηλές ικανότητες πρόσδεσης (poor binding efficiency)³ (Σχήμα 9)⁶.

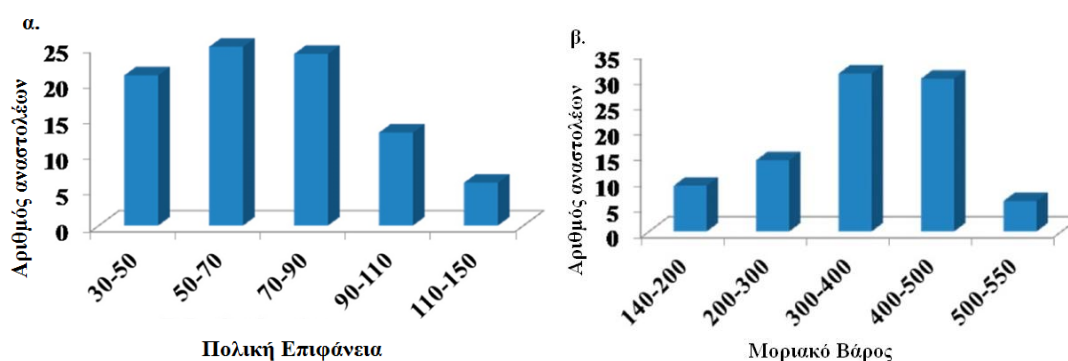


Σχήμα 9: Υπολογιζόμενες φυσικοχημικές ιδιότητες α. πολικής επιφάνειας και β. μοριακού βάρους 119 αντιπροσωπευτικών αναστολέων που προσδένονται στην κλειστή διαμόρφωση της BACE-1

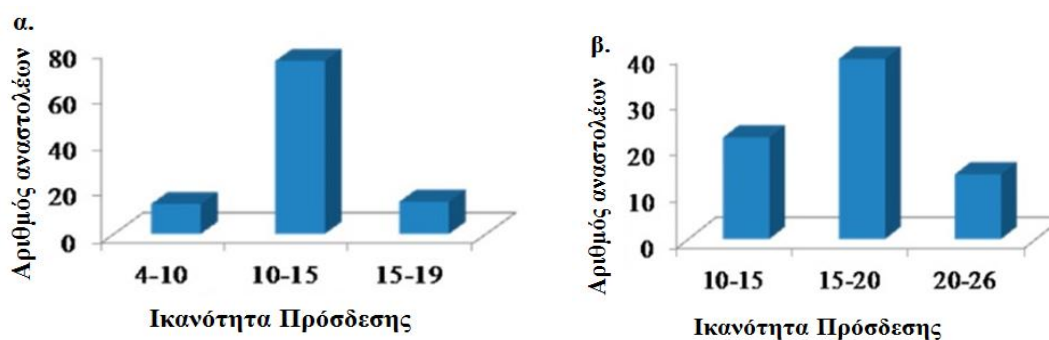
Γενικά, οι ενώσεις αυτές έχουν χαμηλή *per os* απορρόφηση και χαμηλή διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού λόγω υψηλών τιμών εκροής τους μέσω Ρ-γλυκοπρωτεΐνης (P-gp). Μόνο λίγοι αναστολείς της κατηγορίας

αυτής διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και έχουν μετρήσιμες φαρμακολογικές δράσεις *in vivo*.

Οι δεύτερης γενιάς αναστολείς συνδέονται με την ανοικτή μορφή του ενζύμου και διαπερνούν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Χαρακτηρίζονται από μικρότερο μοριακό βάρος (MB <500), μικρότερες τιμές πολικής επιφάνειας και χαμηλές τιμές εκροής μέσω P-gp (Σχήμα 10) καθώς και υψηλότερες ικανότητες πρόσδεσης (Σχήμα 11).



Σχήμα 10: Υπολογιζόμενες φυσικοχημικές ιδιότητες α. πολικής επιφάνειας και β. μοριακού βάρους 92 αντιπροσωπευτικών αναστολέων που προσδέονται στην ανοικτή διαμόρφωση της BACE-1³



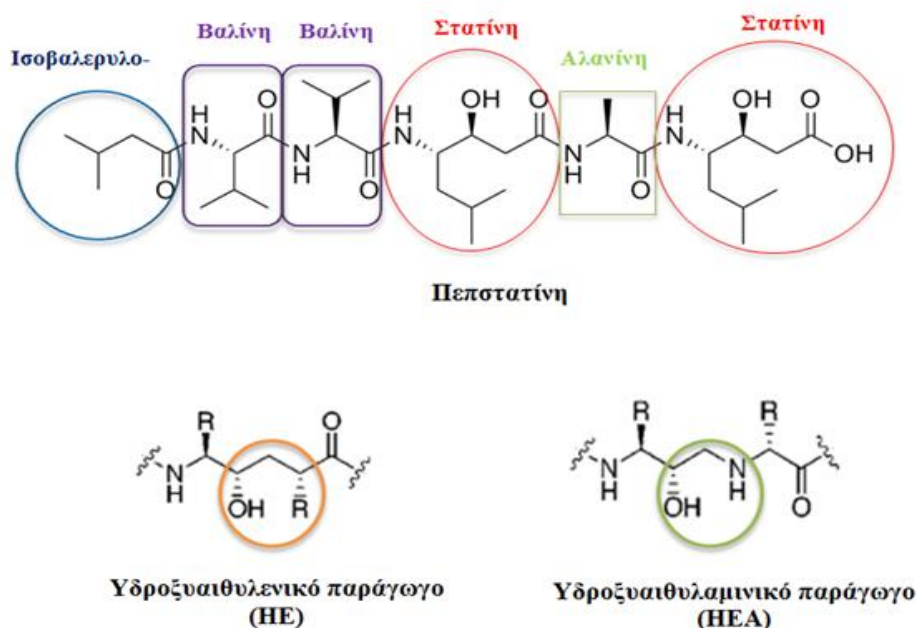
Σχήμα 11: Ικανότητες πρόσδεσης αναστολέων της α. κλειστής διαμόρφωσης και β. της ανοικτής διαμόρφωσης της BACE-1³

Οι αναστολείς που περιγράφονται παρακάτω κατηγοριοποιούνται σε πεπτιδομιμητικούς και μη πεπτιδομιμητικούς αναστολείς, ενώ αναλυτικός πίνακας με τους αναστολείς της κλειστής και της ανοικτής διαμόρφωσης της BACE-1 παρατίθεται στο Παράρτημα Ι³.

2.2.1 Πεπτιδομιμητικοί αναστολείς της β-σεκρετάσης

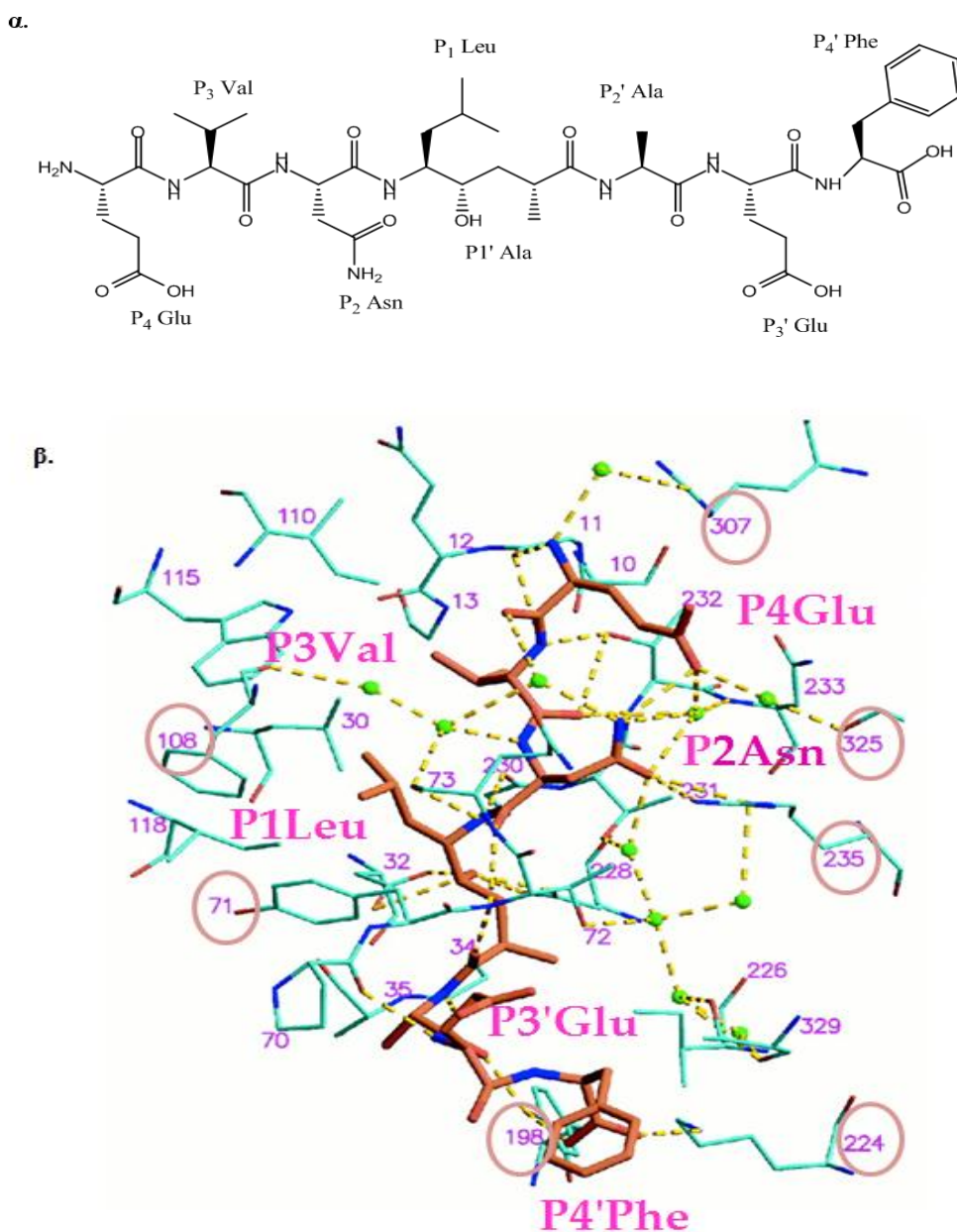
A. Υδροξυαιθυλενικά παράγωγα (HE) ως αναστολείς της BACE-1

Η πρώτη στρατηγική που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση BACE-1 αναστολέων ήταν βασισμένη στη μέθοδο υποστρώματος (design by a substrate-based method). Ένα δομικό στοιχείο κλειδί αυτών των αναστολέων είναι η υδροξυλομάδα ή μία βιοϊστερής ομάδα η οποία δεσμεύεται με τα δύο καταλυτικά ασπαρτικά οξέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αυτό το δομικό χαρακτηριστικό ανακαλύφθηκε στο πεπτίδιο πεπστατίνη. Πρόκειται για ένα N-ακυλο-πενταπεπτίδιο, που φέρει στη δομή του δύο φορές το μη φυσικό αμινοξύ στατίνη. Η στατίνη προτάθηκε ότι μιμείται τη μεταβατική κατάσταση της αμιδικής υδρόλυσης. Εκτός των παραγώγων στατίνης συντέθηκαν υδροξυαιθυλενικά παράγωγα (HE) και υδροξυαιθυλαμινικά παράγωγα (HEA)⁶ (Σχήμα 12).



Σχήμα 12: Πεπστατίνη και ισοστερείς ομάδες πεπτιδομιμητικών αναστολέων της BACE-1⁶

Ο πρώτος ισχυρός αναστολέας και υδροξυαιθυλενικό παράγωγο που κρυσταλλώθηκε με τη BACE-1 ήταν ο OM99-2 (Σχήμα 13).⁷ Ο σχεδιασμός αυτού του μορίου βασίστηκε σε ένα υπόστρωμα β-σεκρετάσης στο οποίο αντικαταστάθηκε ο τμητός (scissile) δεσμός του διπεπτιδίου Leu-Ala από το υδροξυαιθυλενικό ισοστερές μεταβατικής κατάστασης. Το σύμπλοκο αυτό έδωσε πληροφορίες για τα 8 τμήματα πρόσδεσης (Σχήμα 13α).



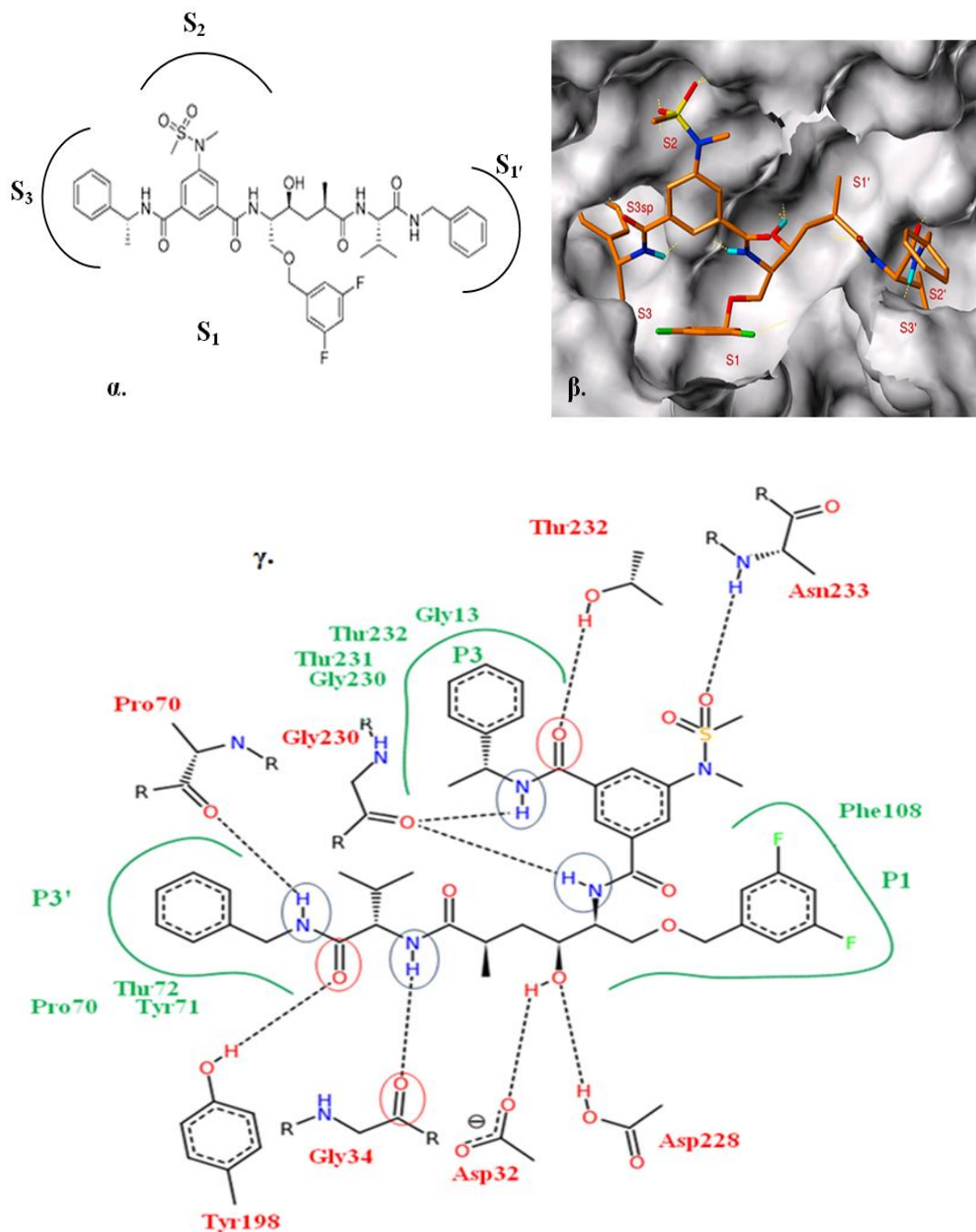
Σχήμα 13: α. Το μόριο του OM99-2 ($K_i=1,6$ nM) με τα αμινοξέα που περιλαμβάνει β. αλληλεπιδράσεις του OM99-2 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου⁷

Στο Σχήμα 13β παριστάνονται οι αλληλεπιδράσεις του OM99-2 με τη β-σεκρετάση. Αυτές περιλαμβάνουν τέσσερις υδρογονικούς δεσμούς μεταξύ των δύο ενεργών κέντρων ασπαρτικών οξέων και του υδροξυλίου του ισοστερούς μεταβατικής κατάστασης καθώς και δέκα υδρογονικών δεσμών από διάφορα τμήματα της σχισμής δέσμησης και πτερυγίου (flap) στο σκελετό του αναστολέα.

Πέντε NH₂- τελικά αμινοξέα του OM99-2 είναι σε εκτεταμένη διαμόρφωση και με εξαίρεση την P₁'-Ala όλα έχουν επαφές (σε απόσταση 4 Å) που προσδιορίζουν τους υποχώρους της πρωτεάσης. Ο S₄ υποχώρος είναι κυρίως υδρόφιλος και ανοικτός στο διαλύτη. Η πλευρική αλυσίδα P₄-Glu του αναστολέα δημιουργεί υδρογονικό δεσμό με το P₂-Asn και είναι επίσης σε χωρική εγγύτητα με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Arg235 και Arg307. Ο υποχώρος S₂ είναι επίσης υδρόφιλος και επικοινωνεί με το διαλύτη. Ο σχετικά μικρός υποχώρος S₂ με τα αμινοξέα Ser325 και Ser327 μπορούν να προσαρμόσουν πλευρική αλυσίδα αναστολέα μεγαλύτερη από την P₂-Asn. Οι S₁ και S₃ υποχώροι αποτελούνται κυρίως από υδρόφοβα αμινοξέα. Οι πλευρικές αλυσίδες του αναστολέα P₃-Val και P₁-Leu είναι πακεταρισμένες πολύ κοντά η μία στην άλλη και έχουν σημαντικές υδρόφοβες επαφές με το ένζυμο, ιδιαίτερα η P₁ η οποία αλληλεπιδρά με την Tyr71 και Phe108. Η πλευρική αλυσίδα του αναστολέα P₂-Asn δημιουργεί υδρογονικούς δεσμούς με το P₄-Glu και Arg235. Δεν παρατηρήθηκε η P₁'-Ala να βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με κάποιο τμήμα του υποδοχέα.

Η κατεύθυνση περιστροφής των αλυσίδων στις P₂', P₃' και P₄' προς την επιφάνεια της πρωτεΐνης έχει ως αποτέλεσμα ο σκελετός των τριών αυτών αμινοξέων να μην έχει την κανονική εκτεταμένη διαμόρφωση. Αυτές έχουν μικρή αλληλεπίδραση με την πρωτεάση, ενώ η τελική καρβοξυλομάδα του P₄, έχει γέφυρα άλατος με τη Lys224 και υδρογονικό δεσμό με την υδροξυλομάδα της Tyr198.

Ο Wangsell και οι συνεργάτες του εισήγαγαν ένα οξυγόνο στη θήκη S_1 .⁸ Το πιο κάτω δραστικό ανάλογο βρέθηκε να έχει τις ακόλουθες αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 14).



Σχήμα 14: α. Δομή υδροξυαιθυλενικού παραγώγου ($IC_{50}=6,6$ nM) που συγκρυσταλλώθηκε με τη BACE-1 και το οποίο έχει ισχυρότερη δράση από το πρωτότυπο μόριο OM99-2, β. απεικόνιση της ένωσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, γ. κυριότερες αλληλεπιδράσεις του μορίου με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου⁸

Η υδροξυλομάδα του τοποθετείται μεταξύ των καταλυτικών τμημάτων Asp32 και Asp228, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Επιπλέον, ο αναστολέας σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το σκελετό της BACE-1. Συγκεκριμένα, το P3 NH με Gly230, το S3 καρβονύλιο με τη Thr232, το P2 καρβονύλιο με Gln73, το P1 NH με Gly230, το P1' καρβονύλιο με Thr72, το P2' NH με Gly34, το P2' καρβονύλιο πλευρικής αλυσίδας με το υδροξύλιο της Tyr198, το P₃NH με Pro70, το σουλφοναμίδιο του P2 με τα σκελετικά NH της Thr232 και Asn233 καθώς και με την πλευρική αλυσίδα της Arg235.

Η P2' πλευρική αλυσίδα της βαλίνης αλληλεπιδρά κυρίως με Ser35, Val69, Ile126, Arg128 στην S2' θήκη και το P3' καλυμμένο βενζόλιο δεσμεύεται στην κορυφή του πτερυγίου και αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα Pro70, Tyr71 και Thr72.

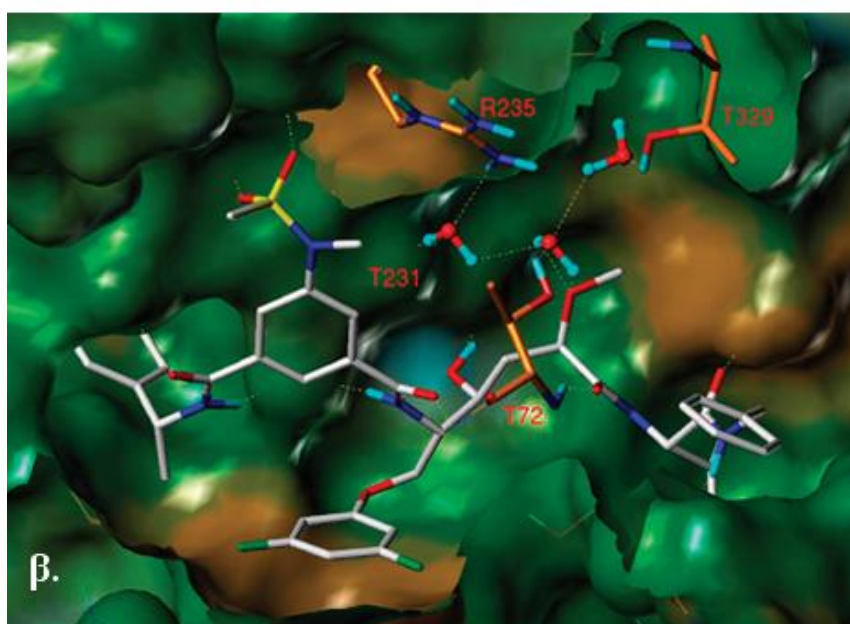
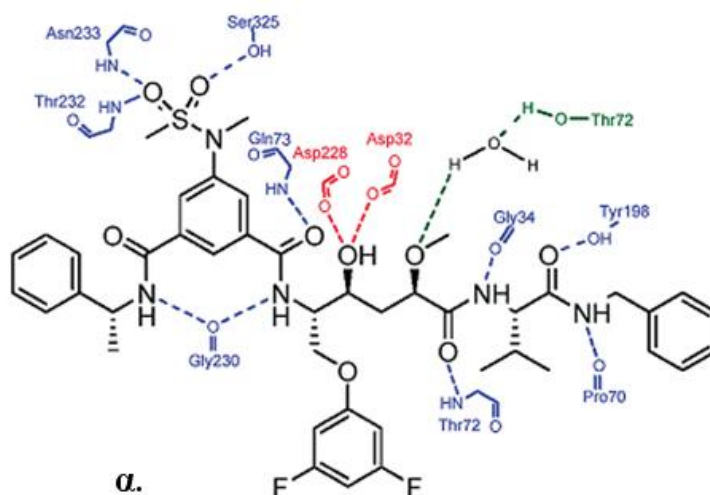
Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συνεισφέρουν σημαντικά στη δράση της ένωσης: η P3 ομάδα του φαινυλίου αλληλεπιδρά με αρκετές ομάδες του S3 υποχώρου. Στιβάζεται μεταξύ των αμινοξέων Thr232 και Gly13 και αλληλεπιδρά ισχυρά με τα αμινοξέα Gly11, Tyr14, Ser229, Gly230 και Arg307. Η P3 μεθυλομάδα έχει ισχυρές αλληλεπιδράσεις με Gln12, Gly13, Leu30, Ile110 και Trp115. Ο αρωματικός δακτύλιος του P2 στιβάζεται μεταξύ Thr231 και με την πλευρική αλυσίδα του αμινοξέος Gln73 του πτερυγίου.

Το αρωματικό τμήμα της P1 πλευρικής αλυσίδας περιβάλλεται από αρωματικά και υδρόφοβα τμήματα στην S₁ θήκη, συγκεκριμένα τα αμινοξέα Phe108, Ile110, Trp115 και το αμινοξύ Tyr71 του πτερυγίου. Επιπρόσθετα, υπάρχει ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ του P1 μετα-φθοροϋποκαταστατών με τον αμιδικό σκελετό του Gln73 και του αμινοξέος Gly74 που βρίσκεται στο πτερύγιο. Αυτή η αλληλεπίδραση επάγει μεταβολή στη διέδρη γωνία του αμιδικού δεσμού ώστε αυτή η περισσότερο εκτεταμένη P1 πλευρική αλυσίδα του μπορεί και προσαρμόζεται στην S1 θήκη της BACE-1.

Η Björklund και οι συνεργάτες της συνέθεσαν ισχυρό HE ανάλογο με IC₅₀=0,3 nM, το οποίο φέρει μία μεθόξυ ομάδα P1' και μία 3,5-διφθοροφαινοξυμεθυλομάδα P1. Επιπλέον, εμφανίζει σταθερά σύνδεσης

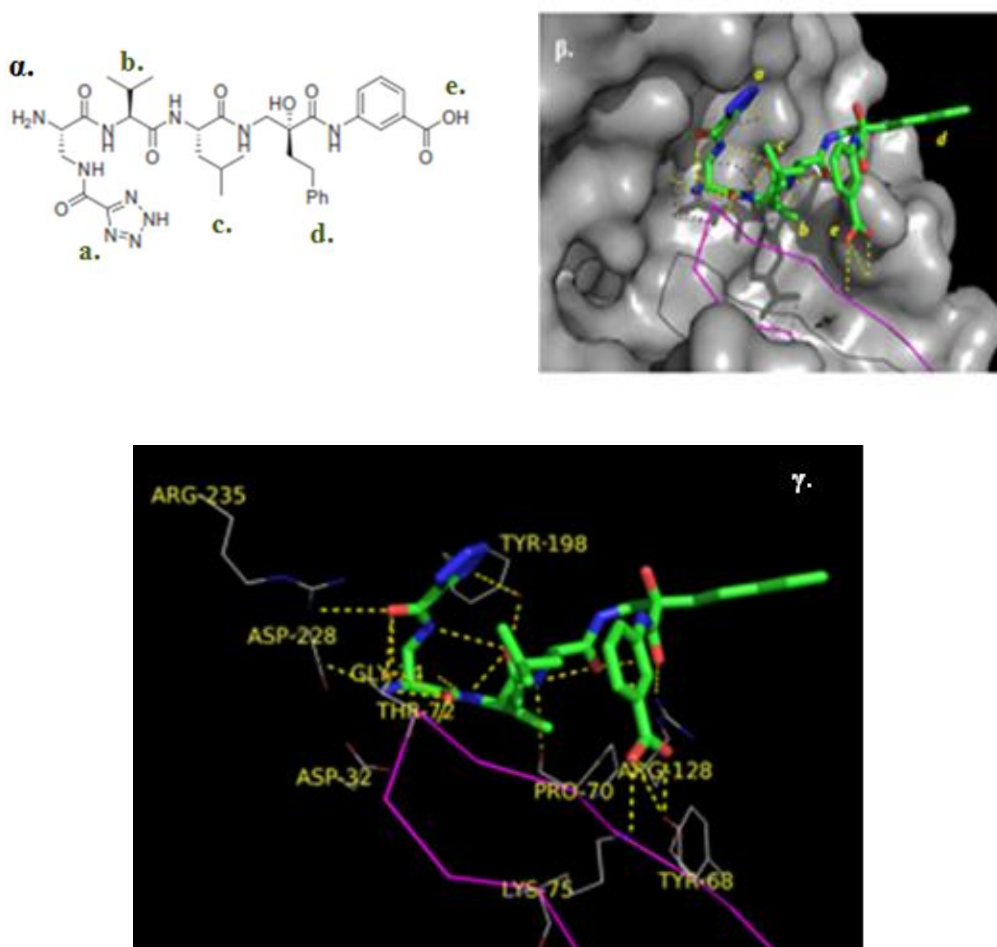
$K_i \ll 1$ nM και $K_i = 1100$ nM για την καθεψίνη.⁹ Επομένως το μόριο αυτό είναι >1000 εκλεκτικό έναντι της καθεψίνης.

Στο Σχήμα 15α παριστάνονται εκτός από τη δομή του ΗΕ παραγώγου και οι διάφοροι υδρογονικοί δεσμοί που δημιουργεί με την BACE-1. Το σύμπλοκο του μορίου αυτού με τη BACE-1 παριστάνεται στο Σχήμα 15β.



Σχήμα 15: α. Δομή του ΗΕ παραγώγου και οι διάφοροι υδρογονικοί δεσμοί που δημιουργεί με την BACE-1, β. αλληλεπιδράσεις του ΗΕ παραγώγου με τη BACE-1⁹

Επίσης, ο Wangsell και οι συνεργάτες του¹⁰ συνέθεσαν την α-βενζυλονορστατίνη (t-αλκοόλη) με $IC_{50}=0,19 \mu M$ (Σχήμα 16α).



Σχήμα 16: α. Δομή της α-βενζυλονορστατίνης, β. και γ. Αλληλεπιδράσεις της α-βενζυλονορστατίνης με τη BACE-1¹⁰

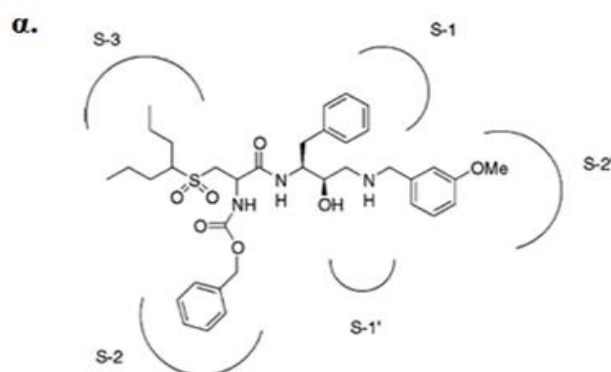
Ανάλυση της κρυσταλλογραφικής δομής της BACE-1 όταν δεσμεύεται το μόριο αυτό ανέδειξε τις ακόλουθες αλληλεπιδράσεις (Σχήμα 16γ). Η N-τελική αμίνη δημιουργεί υδρογονικό δεσμό με το Asp228. Επιπρόσθετα, το καρβονύλιο που συνδέεται με το τετραζόλιο είναι σε χωρική εγγύτητα με την Arg235 και ένα από τα άζωτα του τετραζολίου δημιουργεί υδρογονικό δεσμό με την Tyr198. Το N-τελικό καρβονύλιο στον αναστολέα αλληλεπιδρά με το αμινοξύ Thr72 του πτερυγίου.

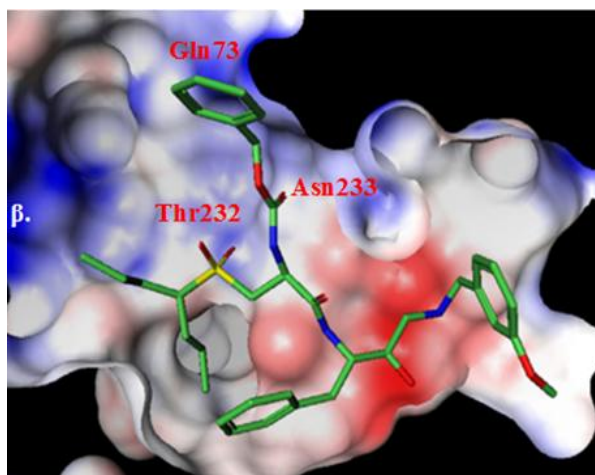
Η Val-NH συντάσσεται με τη Gly34 και το καρβονύλιο της βαλίνης με τη Tyr198. Όπως συνάγεται από την κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, η Leu-NH

δημιουργεί υδρογονικούς δεσμούς με το αμινοξύ του πτερυγίου Pro70 και το καρβονύλιο της Leu είναι σε χωρική εγγύτητα με το αμινοξύ Tyr198. Η C-τελική καρβοξυλομάδα δημιουργεί πολικές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Tyr68 και Lys75 και το καρβονύλιο που βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με τη t-αλκοόλη δημιουργεί υδρογονικό δεσμό με το αμινοξύ Arg128. Η πλευρική φαινυλοαιθυλική αλυσίδα της ισοστερούς α-βενζυλονορστατίνης εκτείνεται πέρα από την πρωτεϊνική επιφάνεια. Επομένως, το δομικό αυτό τμήμα μπορεί να μην είναι αναγκαίο για την πρωτεϊνική αλληλεπίδραση (Σχήμα 16β).

B. Υδροξυαιθυλαμινικά παράγωγα ως αναστολείς της BACE-1 (HEA)

Το παρακάτω δραστικό επίσης υδροξυαιθυλαμινικό παράγωγο κρυσταλλώθηκε με τη BACE-1 ως ρακεμικό μίγμα.¹¹ Ενδιαφέρον παρουσιάζει το μόριο αυτό γιατί από το ρακεμικό μίγμα μόνο το S εναντιομερές κρυσταλλώθηκε. Ένα από τα οξυγόνα της σουλφονικής ομάδας δημιουργεί δέκτη υδρογονικού δεσμού με τη Thr232 NH (3,0 Å). Η βενζυλοξυ καρβονυλική ομάδα (Cbz) προβάλλεται προς τη P₂, διασχίζει την Arg235 και προσανατολίζεται προς το διαλύτη. Η καρβονυλομάδα της Cbz εμπλέκεται σε αλληλεπίδραση μέσω νερού με την κύρια αλυσίδα NH της Asn233 (3,7 Å) και το βενζυλικό τμήμα φωλιάζει σε χωρική εγγύτητα με τη Gln73. Οι υπόλοιπες αλληλεπιδράσεις είναι όμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν με τα μόρια τα οποία έχουν ήδη συζητηθεί.

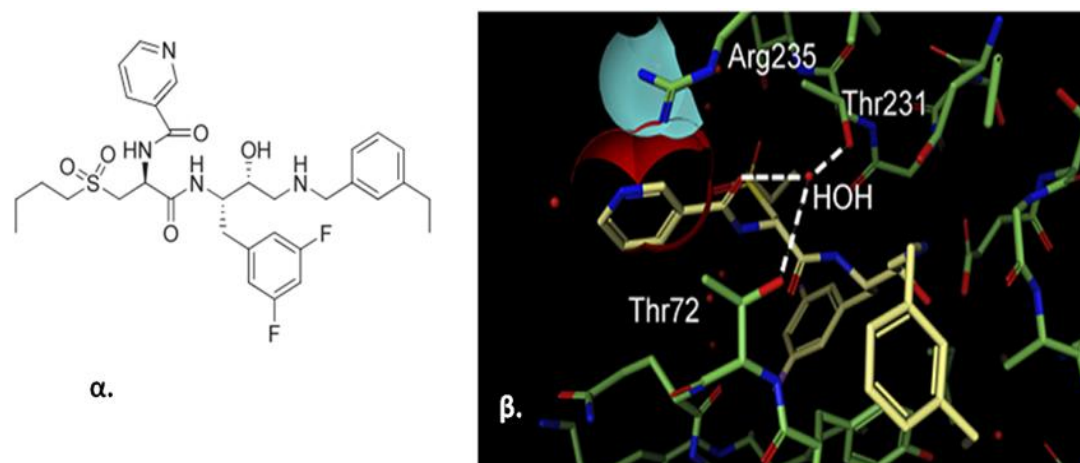




Σχήμα 17: α. Υδροξυαιθουλαμινικό βιοδραστικό παράγωγο ($IC_{50}=112$ nm) και β. αλληλεπιδράσεις της ένωσης με τη BACE-1. Από το ρακεμικό μίγμα συγκρυσταλλώθηκε μόνο το S ισομερές

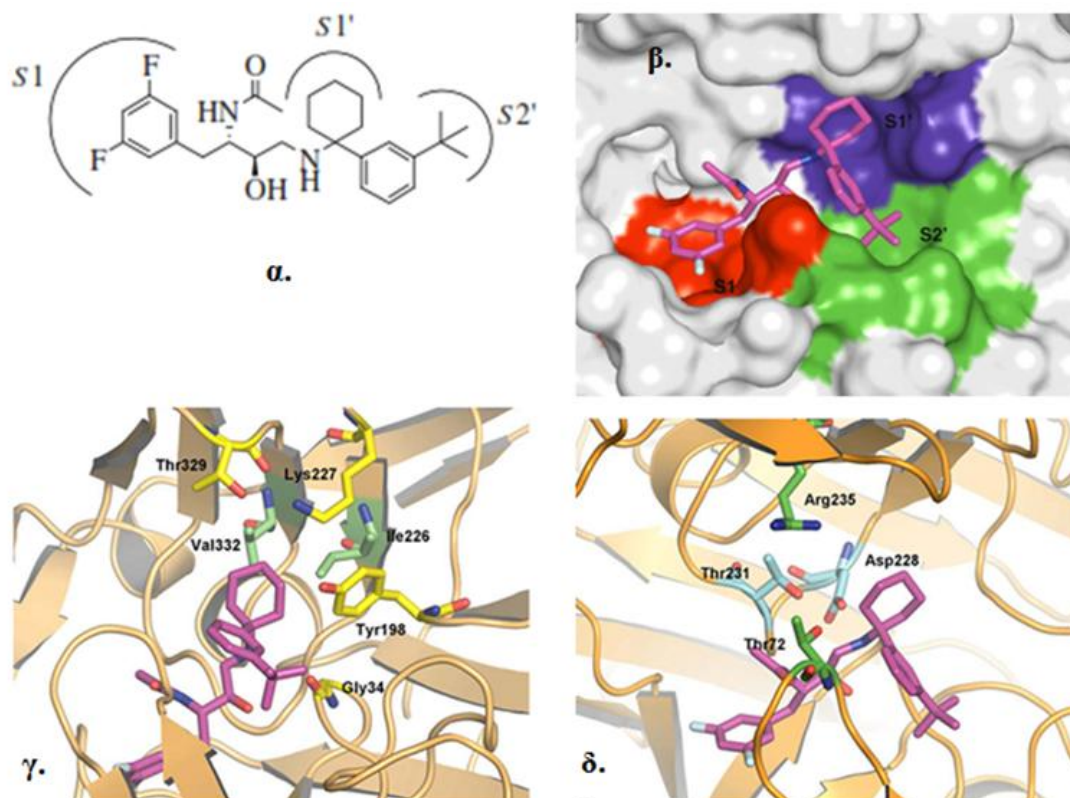
Σε μία επόμενη μελέτη ο Frescos και οι συνεργάτες του μελέτησαν την εκλεκτικότητα των υδροξυαιθουλαμινικών παραγώγων στην BACE-1.¹² Από προηγούμενες τρισδιάστατες δομές και μελέτες μοριακής μοντελοποίησης ήταν γνωστό ότι η αλληλεπίδραση του S2 υποχώρου με την Arg235 μπορούσε να παράγει πολύ ισχυρούς BACE-1 αναστολείς με ικανοποιητική εκλεκτικότητα στην καθεψίνη D (cat-D), (η καθεψίνη D είναι η πιο άφθονα ευρισκόμενη ασπαρτική πρωτεάση στα ανθρώπινα κύτταρα). Αυτή η υπόθεση βασίστηκε στο γεγονός της παρουσίας δύο μεθειονινών στην Cat-D (Met307 και Met309) οι οποίες βοηθούν στο σχηματισμό της S2 θήκης σε αντίθεση με την Arg235 που βρίσκεται στην BACE-1. Οι ερευνητές Frescos *et al.* συνέθεσαν νέες ενώσεις για να το επιτύχουν αυτό. Η πιο κάτω ένωση (Σχήμα 18α) έχει αυτή την εκλεκτικότητα και συγκρυσταλλώθηκε με την BACE-1. Η τρισδιάστατη απεικόνιση (Σχήμα 18β) δείχνει την ισχυρή σύνδεση μεταξύ του 3-πυριδινικού αζώτου και Arg235 στην S₂ (ο προσανατολισμός του πυριδινικού αζώτου επιβεβαιώνεται από την παρουσία του μορίου του νερού το οποίο σχηματίζει υδρογονικό δεσμό με το πυριδινικό άζωτο). Αν και η γεωμετρία αλληλεπίδρασης δεν επιτρέπει υδρογονικό δεσμό, το μερικώς αρνητικό φορτίο της πυριδίνης συμπληρώνεται με το θετικό φορτίο της αργινίνης παρέχοντας τη βάση εξειδίκευσης για την ένωση αυτή στην BACE-1 σε σχέση με τη Cat-D. Επιπρόσθετα, υπάρχει ένα μόριο νερού κλειδί, το

οποίο είναι δεσμευμένο με υδρογονικό δεσμό μεταξύ των υδροξυλικών πλευρικών αλυσίδων της Thr231 (2,8 Å) και Thr72 (3,2 Å) το οποίο βρίσκεται σε απόσταση υδρογονικού δεσμού με το καρβονυλικό οξυγόνο του αμιδίου (2,6 Å).



Σχήμα 18: α. Δομή του υδροξυαιθυλαμινικού παραγώγου ($IC_{50}=2$ nM στη BACE-1 και $IC_{50}=474$ nM στην Cat-D καθώς και $IC_{50}=1$ nM στη βιολογική δοκιμή με HEK (Human Embryonic Kidney) κύτταρα), β. Αλληλεπίδρασή του με την BACE-1

Ο Sealy και οι συνεργάτες του¹³ βασίστηκαν στη διαφορά των αμινοξέων της BACE-1 και cat-D στην S_1 -θήκη για να συνθέσουν νέα βιοδραστικά ανάλογα. Τέτοια ανάλογα είναι οι παρακάτω δύο ενώσεις. Στην πρώτη ένωση οι διφθοροαρυλο, κυκλοεξυλο και η t-Bu υποκαταστάτες καταλαμβάνουν τους S_1 , S_1 και S_2 -υποχώρους, αντίστοιχα, όπως δείχνεται στο Σχήμα 19. Η S_1 -θήκη έχει αμφίφιλες ιδιότητες. Η οπίσθια πλευρά οριοθετείται από δύο υδρόφοβα αμινοξέα τη Val232 και Ile226. Δύο υδρόφιλα αμινοξέα, η Lys227 και Thr329 συνιστούν την κορυφή και η δεξιά πλευρά συνίσταται από τα αμινοξέα Tyr198 και Gly34 (Σχήμα 19β). Η αριστερή πλευρά περιέχει την Arg235 και Thr72 που είναι τμήμα του πτερυγίου, ενώ τα αμινοξέα Asp228 και Thr231 συνιστούν το κάτω τμήμα (Σχήμα 19γ).

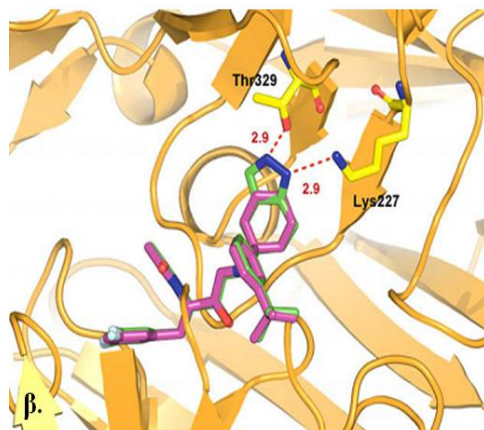
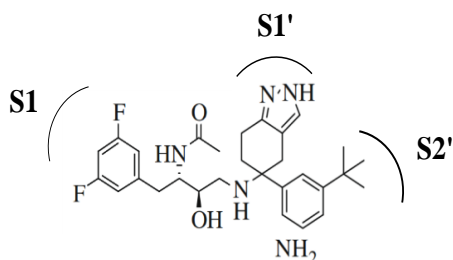


Σχήμα 19: α. Δομή του διφθοροαρυλοκυκλοεξυλο παραγώγου, β. Η θήκη S1': οπίσθια, άνω και αριστερή πλευρά, γ. Η θήκη S1': δεξιά και κάτω πλευρά ($IC_{50}=47$ nM στη BACE-1 και $IC_{50}=25$ nM στη καθεψίνη)

Οι πρωτονιομένες αμινο και υδρόξυ ομάδες δεσμεύονται στην τμητή θήκη του Asp32 και Asp228 αντίστοιχα (δε δείχνονται). Το καρβονύλιο της Gly34 σχηματίζει επίσης ένα υδρογονικό δεσμό με την ιοντισμένη αμίνη και το υδρογόνο στον αρυλικό συνδέτη που πλευρίζεται από δύο αλκυλικές ομάδες (δε δείχνεται). Το ακεταμίδιο λειτουργεί ως δισχιδής προσδέτης σχηματίζοντας ένα υδρογονικό δεσμό μεταξύ του καρβονυλίου με το αμινοξύ του πτερυγίου Gln73, ενώ το NH αλληλεπιδρά με τη Gly230 (δε δείχνεται).

Στη συγκρυσταλλωμένη δομή της δεύτερης ένωσης με τη BACE-1 δείχνεται καθαρά ότι η πυραζόλη λειτουργεί ως δισχιδής προσδέτης σχηματίζοντας υδρογονικό δεσμό με τη Thr329 και Lys227 σε απόσταση 2,9 Å (Σχήμα 20α και β).

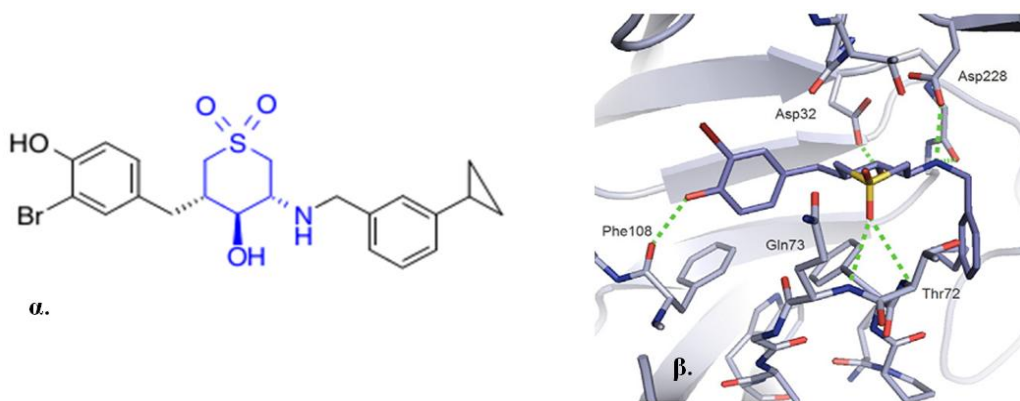
α.



Σχήμα 20: α. Δομή του πυραζολικού παραγώγου και β. τρόπος αλληλεπίδρασής του με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της BACE-1 και υπέρθεση με την ένωση 1 (IC₅₀=12 nM στη BACE-1 και IC₅₀=300 nM στη καθεψίνη)

Ο Rueeger και οι συνεργάτες του συνέθεσαν καινοτόμους αναστολείς υδροξυαιθυλαμίνης με στόχο να αυξήσουν τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες των προηγούμενων συντεθέντων μορίων.¹⁴

Η στρατηγική ήταν να ελαττώσουν τη διαμορφωτική ευελιξία και τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων των υποχώρων S2' και S1/S3 σε σύγκριση με τους HE όπως τον OM99-2 και HEA διπεπτιδικούς ισοστερικούς αναστολείς. Όπως έχουμε ήδη παρατηρήσει από τα προηγούμενα παραδείγματα οι HEA έχουν παρόμοιο τρόπο αλληλεπίδρασης. Η συγκρυστάλλωση του υδροξυαιθυλαμινικού παραγώγου (Σχήμα 21α) με τη BACE-1 έδειξε το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών με τα καταλυτικά αμινοξέα Asp32 και Asp228. Το φαινολικό υδροξύλιο δημιουργεί επίσης υδρογονικό δεσμό με το σκελετικό αμίδιο του Phe108. Το σουλφονικό τμήμα στο κυκλικό HEA υπόστρωμα ελαττώνει τη βασικότητα της αμινομάδας (pKa=5,7) και βελτιστοποιεί τους υδρογονικούς δεσμούς με τα αμινοξέα του πτερυγίου Thr72 και Gln73. Η ένωση δεσμεύεται με κλειστή διαμόρφωση της πρωτεΐνης όμοια με των ακυλικών και μακροκυκλικών HEA αναστολέων (Σχήμα 21β).

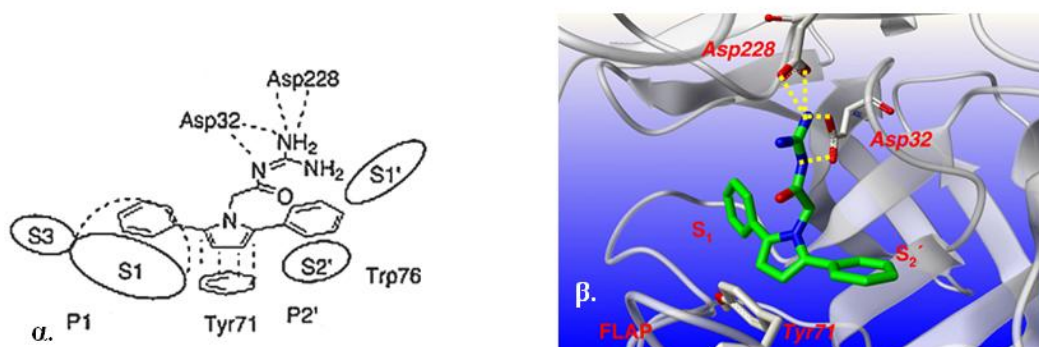


Σχήμα 21: α. Δομή του υδροξυαιθουλαμινικού παραγώγου ($IC_{50}=0,95 \mu M$) και β. αλληλεπιδράσεις του υδροξυαιθουλαμινικού παραγώγου με την BACE-1

2.2.2 Μη πεπτιδομιμητικοί αναστολείς της BACE-1

A. Ακυλογουανιδικά παράγωγα ως αναστολείς της BACE-1

Ο Cole και οι συνεργάτες του συνέθεσαν τον ακυλογουανιδικό αναστολέα¹⁵ (Σχήμα 22α). Η συγκρυσταλλωμένη δομή ανέδειξε ότι το N-ακυλογουανιδίνο τμήμα σχηματίζει υδρογονικούς δεσμούς με καταλυτικά ασπαρατικά αμινοξέα. Ο πυρρολικός δακτύλιος σχηματίζει αλληλεπίδραση π-στίβαξης με το αμινοξύ Tyr71 που υπάρχει στο πτερύγιο σταθεροποιώντας το ένζυμο σε μία ανοικτή διαμόρφωση. Οι δύο φαινυλικές ομάδες εκτείνονται στις S1 και S2' θήκες (Σχήμα 22β).

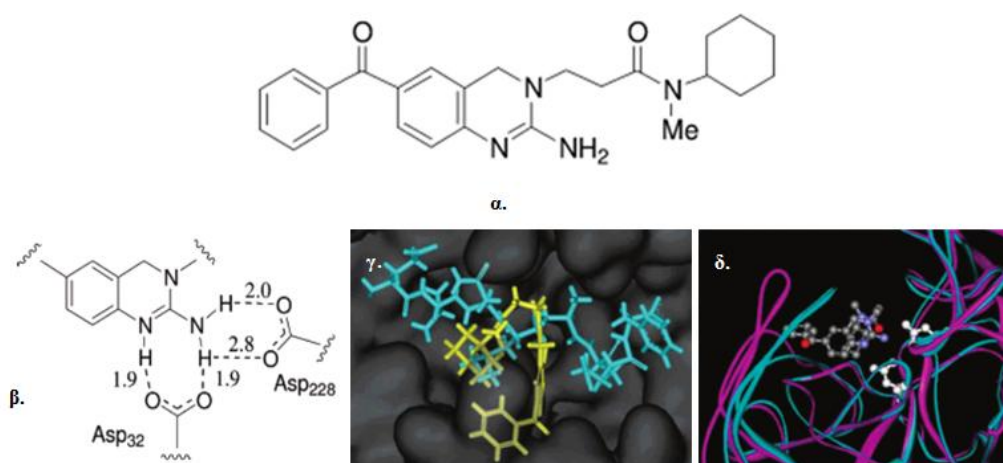


Σχήμα 22: α. Δομή του ακυλογουανιδινικού αναστολέα ($IC_{50}=3,7 \mu M$) και β. αλληλεπιδράσεις του με την BACE-1 σε απεικόνιση δύο και β. τριών διαστάσεων

B. Αμινοκιναζολινικά παράγωγα ως αναστολείς της BACE-1

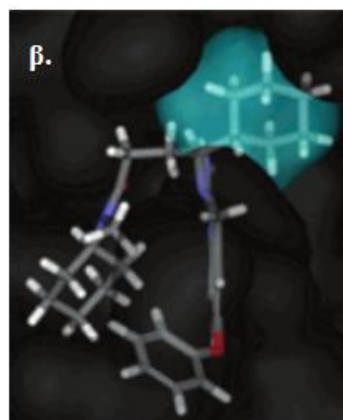
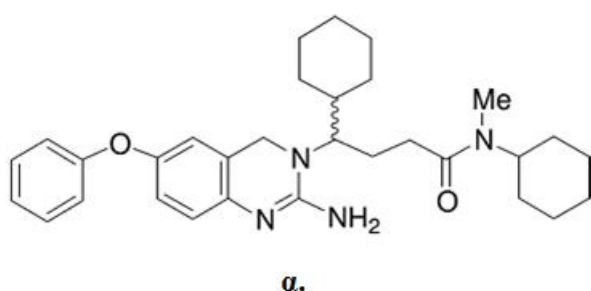
Το επόμενο παράδειγμα αναφέρεται στη 2-αμινο-3,4-διϋδροκιναζολίνη (Σχήμα 23α).¹⁶ Στο Σχήμα 23β δείχνεται το τμήμα του αναστολέα και τους υδρογονικούς δεσμούς που δημιουργεί με τα καταλυτικά τμήματα των ασπαρτικών οξέων. Στο Σχήμα 23γ υπερτίθεται με το OM99-2, ενώ στο Σχήμα 23δ υπερτίθενται τα ενεργά κέντρα των δύο συμπλόκων.

Η διαμόρφωση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο της BACE-1 είναι συμπαγής, με την πλευρική αλυσίδα να κάμπτεται σε ένα προσανατολισμό φουρκέτας. Αυτό επιτρέπει τον N-εξακυκλικό υποκαταστάτη να καταλάβει τον υποχώρο S1. Επιπλέον, η περιοχή περυγίου της πρωτεΐνης υιοθετεί μια "ανοικτή" δομή στην οποία η Tyr 71 είναι εκτοπισμένη 4 Å σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στο σύμπλοκο με τον πεπτιδικό αναστολέα OM99-2. Παρόμοια ευελιξία το περυγίου έχει παρατηρηθεί και σε άλλες ασπαρτυλοπρωτεάσες όπως η ρενίνη και η HIV-1.



Σχήμα 23: α. Δομή του 2-αμινο-3,4-διϋδροκιναζολινικού παραγώγου ($K_i=900$ nM), β. υδρογονικοί δεσμοί με τα ασπαρτικά αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου, γ. υπέρθεση OM99-2 (γαλάζιο) με το 2-αμινο-3,4-διϋδροκιναζολινικό παράγωγο (κίτρινο), δ. υπέρθεση του ενεργού κέντρου του ενζύμου όταν προσδένεται το παράγωγο (ματζέντα) και η ένωση OM99-2 (γαλάζιο).

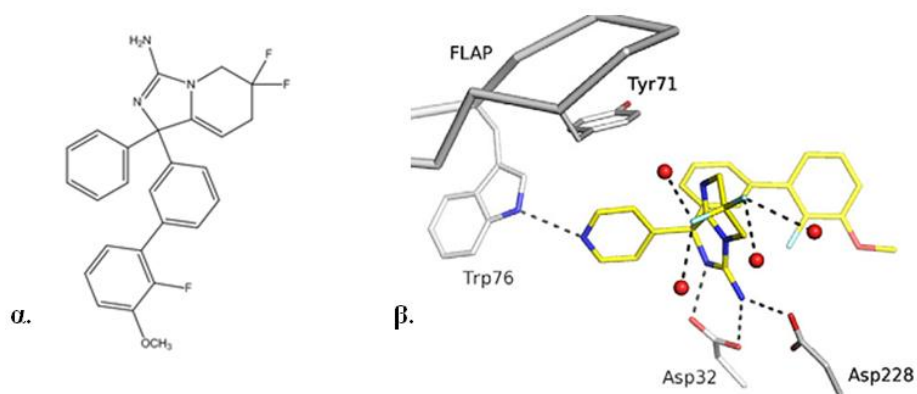
Περαιτέρω εξέταση της κρυσταλλογραφική δομής του παραγώγου προσδεμένο στην BACE-1, έδειξε ότι ο κενός υδρόφοβος υποχώρος S1' θα μπορούσε να καλυφθεί από υποκαταστάτη με στερεοχημεία *S* στον α-άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας. Αρχικά συντέθηκε το παρακάτω ρακεμικό μίγμα (Σχήμα 24α) με ανασταλτική δράση ($K_i=30$ nM) μεγαλύτερη του παραγώγου που αναφέρθηκε. Το μίγμα διαχωρίστηκε στα εναντιομερή του και το *S* εναντιομερές εμφάνισε μεγαλύτερη δράση ($K_i=11$ nM). Στο Σχήμα 24β παριστάνεται η εισδοχή του α-εξακυκλικού υποκαταστάτη στην S1' θήκη.



Σχήμα 24: α. Δομή ρακεμικού μίγματος του παραγώγου ($K_i=11$ nM για το *S* εναντιομερές), β. εισδοχή του α-εξακυκλικού υποκαταστάτη στην S1' θήκη

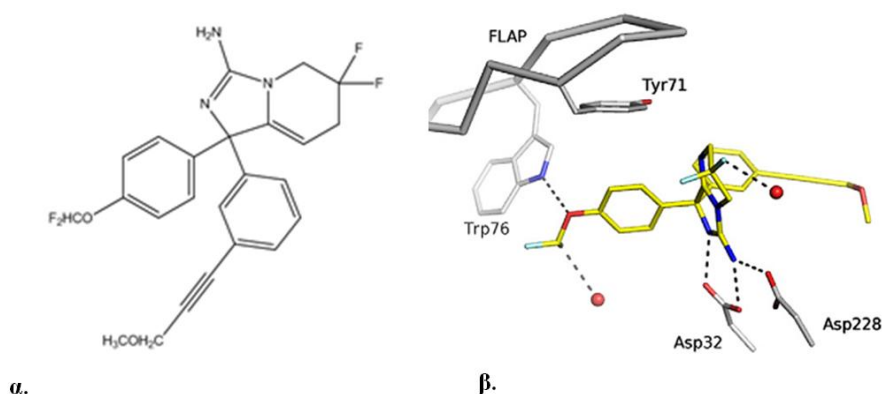
Γ. Αμινοϊμιδαζολικά παράγωγα ως αναστολείς της BACE-1

Η αμινοϊμιδαζολική ομάδα του παραγώγου που παριστάνεται στο Σχήμα 25α αλληλεπιδρά μέσω ενός δικτύου υδρογονικών δεσμών με τα καταλυτικά αμινοξέα Asp32 και Asp228.¹⁷ Η ένωση δεσμεύεται στην πρωτεΐνη όταν το πτερύγιο είναι ανοικτό. Αυτό επιτρέπει στο άζωτο του 4-πυριδινικού δακτυλίου να γίνεται δέκτης υδρογονικού δεσμού από την Trp76. Τα δύο φθόρια της τετραϋδροϊμιδαζολοπυριμιδίνης είναι ολικά επιδιαλυτωμένα και δεν αλληλεπιδρούν με πρωτεϊνικά τμήματα (Σχήμα 25β).



Σχήμα 25: α. Δομή παραγώγου αμινοϊμιδαζόλης και β. αλληλεπιδράσεις του με τη BACE-1

Παρόμοιες αλληλεπιδράσεις παρατηρήθηκαν επίσης στο παράγωγο της αμινοϊμιδαζόλης που παριστάνεται στο Σχήμα 26.

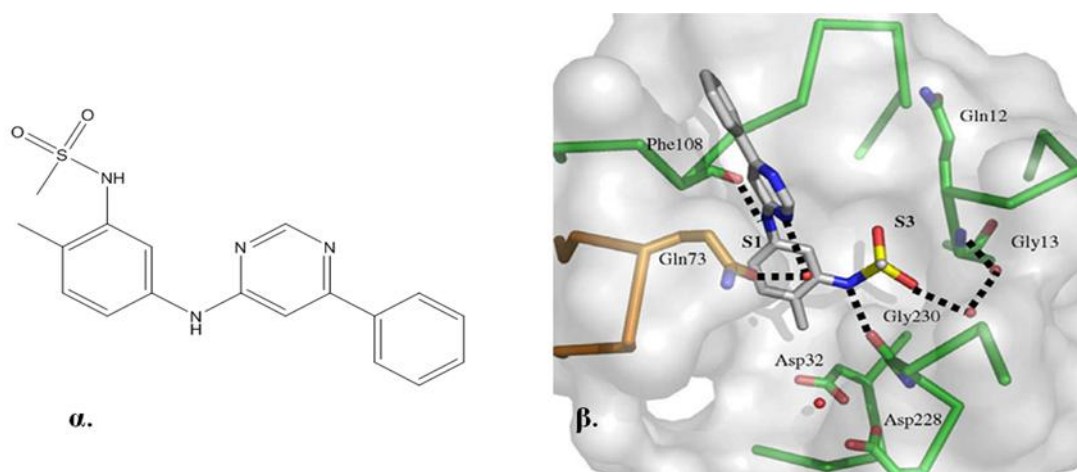


Σχήμα 26: α. Δομή παραγώγου αμινοϊμιδαζόλης και β. αλληλεπιδράσεις του με τη BACE-1

Δ. Αμινοπυριμιδινικά παράγωγα ως αναστολείς της BACE-1

Μέχρι στιγμής τα μόρια αναστολείς αντιδρούσαν με την καταλυτική δυάδα των ασπαρτικών αμινοξέων. Ο Steele και οι συνεργάτες του¹⁸ συνέθεσαν μόρια αναστολείς χωρίς να υπάρχει η απαίτηση να αλληλεπιδρούν με τα δύο ασπαρτικά οξέα. Ένα τέτοιο μόριο παριστάνεται στο Σχήμα 27α και οι αλληλεπιδράσεις του με τη BACE-1 στο Σχήμα 27β. Αξιοσημείωτο είναι ότι η ένωση αυτή όχι μόνο δεν αντιδρά με την καταλυτική δυάδα αλλά ούτε έμμεσα

μέσω νερού. Στο συγκρυσταλλωμένο σύμπλοκο τα καταλυτικά ασπαρτικά οξέα είναι στην κατάσταση ηρεμίας (resting-state) και είναι δεσμευμένα με το καταλυτικό νερό που το ένζυμο χρησιμοποιεί για την υδρόλυση.



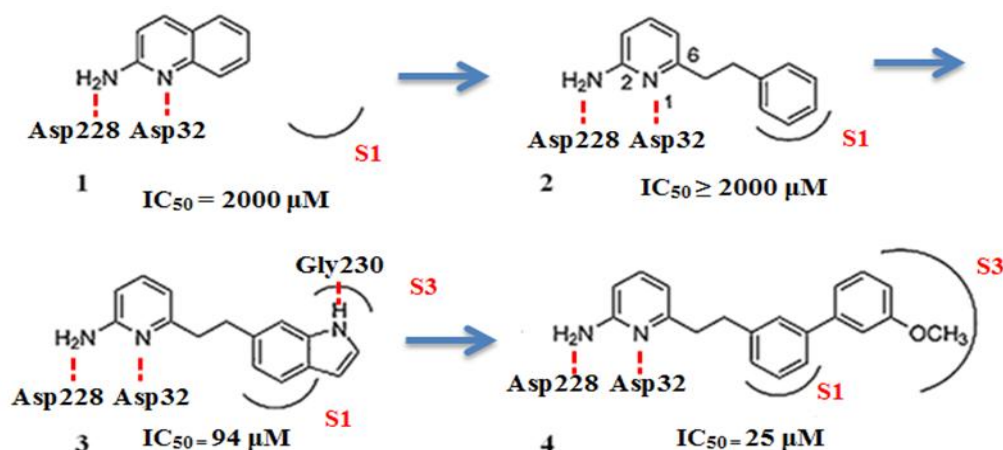
Σχήμα 27: α. Αμινοπυριμιδινικό παράγωγο το οποίο δεν αλληλεπιδρά με την καταλυτική δυάδα των ασπαρτικών αμινοξέων του ενεργού κέντρου, β. αλληλεπιδράσεις του αμινοπυριμιδινικού με το ενεργό κέντρο της BACE-1

Ο αρυλικός σουλφοναμιδικός δακτύλιος καταλαμβάνει τμήμα του S1 υποχώρου με το σουλφοναμίδιο να προσανατολίζεται στην S3 θήκη. Τα στοιχεία κλειδιά πρόσδεσης της παραπάνω δομής οφείλονται στους πολικούς υποκαταστάτες δηλαδή το σουλφοναμίδιο και την ανιλίνη. Ειδικότερα, ένα μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του οξυγόνου του σουλφοναμιδίου δημιουργεί υδρογονικό δεσμό διαμέσου δικτύου μορίων νερού με το σκελετικό άζωτο της Gly13. Το -NH του σουλφοναμιδίου εμπλέκεται σε υδρογονικό δεσμό με το καρβονύλιο της Gly230. Το -NH της ανιλίνης αλληλεπιδρά με το καρβονύλιο του Phe108. Μία άλλη αλληλεπίδραση άξια παρατήρησης είναι η δέσμευση του αζώτου της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος, του πτερυγίου Gln73 και του N₃ της πυριμιδίνης διαμέσου μορίου νερού. Ο αναστολέας δεσμεύεται όταν το πτερύγιο είναι ανοικτό. Είναι αρκετά ενδιαφέρον ότι ένας αναστολέας χωρίς να αλληλεπιδρά με την καταλυτική δυάδα σχηματίζει μόνο ένα δίκτυο υδρογονικών δεσμών και έχει μέτρια βιολογική δράση (IC₅₀=24 μM).

2.2.3 Άλλες προσεγγίσεις για την ανάπτυξη καινοτόμων αναστολέων της BACE-1

Αξίζει να αναφέρουμε δύο προσεγγίσεις για την ανάπτυξη καινοτόμων BACE-1 αναστολέων. Η μία αναφέρεται στη σάρωση χημικών βιβλιοθηκών (high-throughput screening) και η δεύτερη στη χρήση τμηματικής δόμησης (Fragment Based Drug Discovery-FBDD). Η πρώτη προσέγγιση δεν οδήγησε σε αναστολείς με κλινικές μελέτες. Η δεύτερη προσέγγιση η οποία συνοδεύεται με σύζευξη βιοφυσικών τεχνικών (NMR, κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, κ.λ.π), υπολογιστικών εργαλείων και βιοχημικών δοκιμών οδήγησε σε βιοδραστικά μόρια που έφθασαν μέχρι το στάδιο των κλινικών δοκιμών.

Ένα παράδειγμα της χρήσης της FBDD είναι το παρακάτω (Σχήμα 28).



Σχήμα 28: Ανάπτυξη 6-υποκαταστημένων 2-αμινοπυριδινών 1-4

Η σύνθεση του μορίου **4** άρχισε από το μικρό μόριο της 2-αμινοκινολίνης (**1**). Η παρατήρηση ότι για να καλυφθεί ο υποχώρος S1 χρειαζόταν υποκατάσταση στην 6 θέση με φαινυλαιθυλο ομάδα οδήγησε στην ένωση **2**. Επειδή η βιολογική της δράση δεν ήταν ικανοποιητική αντικαταστάθηκε ο φαινυλικός δακτύλιος με ινδολικό. Παρατηρήθηκε ότι ο ινδολικός δακτύλιος σχηματίζει μια νέα αλληλεπίδραση με τον S3 υποχώρο. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην χρήση μεγαλύτερης υδρόφοβης υποκατάστασης, της 3'-μεθοξυδιφαινυλο-3-υλ-ομάδας και στο παράγωγο **4** που είναι 80 φορές πιο δραστικό συγκριτικά με το παράγωγο **1**.¹⁹

2.3 Συμπεράσματα

Οι συγκρυσταλλωμένες δομές BACE-1/αναστολέα έδωσαν ώθηση στον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων βιοδραστικών μορίων. Οι κρυσταλλογραφικές αυτές δομές συμπλόκων βοήθησαν να εφαρμοσθεί μοριακή μοντελοποίηση με τρισδιάστατες σχέσεις δομής δράσης²⁰ για την εξεύρεση καινοτόμων βιοδραστικών δομών. Η εξερεύνηση φυσικών προϊόντων με παρεμφερείς δομές των ήδη αναπτυχθέντων μορίων θα βοηθήσει ακόμη περισσότερο την προώθηση της έρευνας για την εξεύρεση καινοτόμων αναστολέων της BACE-1.²¹

Οι μέχρι στιγμή συντεθέντες αναστολείς της BACE-1 δρουν σε κοιλότητα όπου υπάρχει η καταλυτική δυάδα των ασπαρτικών αμινοξέων Asp32 και Asp228. Στις περισσότερες από τις κρυσταλλογραφικές δομές τα δύο αυτά καταλυτικά αμινοξέα παίζουν σημαίνοντα ρόλο στη πρόσδεση. Παρατηρήθηκε όμως επίσης ότι μπορεί και να μην έχουν ρόλο στην πρόσδεση.¹⁸ Από αυτά τα δεδομένα προκύπτει ότι αυτό που ενεργοποιεί το βιολογικό γεγονός ίσως να μην είναι η παρουσία των δύο ασπαρτικών αυτών οξέων αλλά η κοιλότητα στην οποία βρίσκονται. Τα μόρια BACE-1 αναστολείς εισερχόμενα στην κατάλληλη κοιλότητα όπου παρόντα είναι τα δύο ασπαρτικά οξέα εξασκούν διάφορα είδη αλληλεπιδράσεων με αρκετά αμινοξέα που τη συνιστούν. Για παράδειγμα το αμινοξύ Arg235 συμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις με πληθώρα συγκρυσταλλωμένων αναστολέων της BACE-1 και του ενζύμου. Άλλα αμινοξέα με ποικίλη πολικότητα τα οποία φέρονται να συμμετέχουν ενεργά σε αλληλεπιδράσεις με τους αναστολείς είναι: Glu12, Gly13, Gly34, Tyr71, Thr72, Gln73, Trp76, Phe108, Tyr198, Lys227, Thr329, Thr231, Arg307, Ser327, Ser325 και Thr232.

Είναι σαφές ότι για τον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων μορίων αυτά θα πρέπει να εισέρχονται στην κοιλότητα αυτή και να αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα που την απαρτίζουν. Παραμένει όμως ανοικτό θέμα ποιές είναι οι απαιτήσεις της κοιλότητας να προσδένουν τον κατάλληλο αναστολέα που θα αποτελέσει υποψήφιο φάρμακο κατά της ασθένειας Alzheimer.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΝΟΣΟΣ PARKINSON



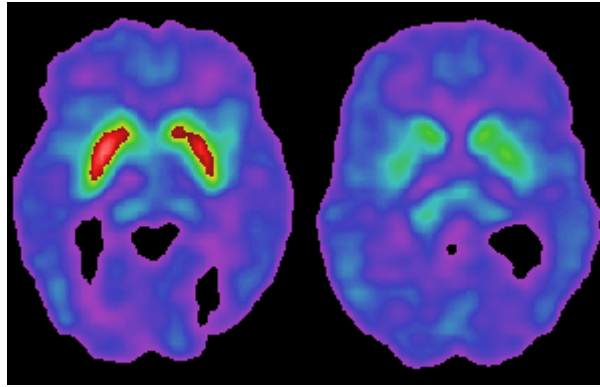
Εικόνα από το άρθρο:

“How should Parkinson’s disease be managed perioperatively?”

Swati G. Patel, MD, Chad R. Stickrath, MD, Mel Anderson, MD, and Olga Klepitskaya, MD, University of Colorado Denver, The Hospitalist, June 2010

2.1 Εισαγωγή

Η ασθένεια Parkinson είναι μία νευροεκφυλιστική ασθένεια της μέλαινας ουσίας (substantia nigra), η οποία αποτελεί τμήμα ενός δικτύου πυρήνων στις εσωτερικές περιοχές του εγκεφάλου που καλούνται βασικά γάγγλια. Συγκεκριμένα, στην ασθένεια αυτή τα κύτταρα της μέλαινας ουσίας προοδευτικά νεκρώνονται και παύουν να παράγουν το νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη που βοηθά τη δημιουργία και τον έλεγχο της κίνησης του σώματός μας. Η έλλειψη της ντοπαμίνης σε δομές των βασικών γαγγλίων, είναι η αιτία των εξωπυραμιδικών συμπτωμάτων (Σχήμα 29), τα οποία μπορεί είναι τρόμος ηρεμίας (τρεμούλα), δυσκαμψία ή ακαμψία, βραδυκινησία ή ακινησία και αστάθεια. Άλλα συμπτώματα σε μερικούς ασθενείς περιλαμβάνουν πόνους και ενοχλήσεις στα χέρια και στα πόδια, άγχος και κατάθλιψη, βραδύτητα σκέψης και μνήμης και ανήσυχο ύπνο. Η δυσκοιλιότητα και προβλήματα κύστης είναι πολύ συνηθισμένα. Ιδιαίτερα μπορούν να εμφανιστούν τάση για συχνή ούρηση με αίσθημα επείγουσας ανάγκης και μεγαλύτερο άγχος. Σεξουαλικά προβλήματα μπορεί επίσης να απασχολούν αρκετούς ασθενείς. Τα προβλήματα ομιλίας και κατάποσης γίνονται πιο έντονα με το πέρασμα του χρόνου. Τα παθολογοανατομικό στοιχείο που χαρακτηρίζει τη νόσο Parkinson είναι τα σωμάτια Lewy. Πρόκειται για ηωσινόφιλα κυτταροπλασματικά έγκλειστα που βρίσκονται κυρίως μέσα στους νευρώνες της μέλαινας ουσίας αλλά και σε περιοχές όπου παρατηρείται εκφύλιση και αποτελούνται από στοιχεία του κυτταρικού σκελετού. Ειδικές χρώσεις αποκαλύπτουν την παρουσία α-συνουκλεΐνης, ουμπικουϊτίνης κ.ά. Έντονες ερευνητικές προσπάθειες διεξάγονται για να δειχθεί εάν η α-συνουκλεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης στην ασθένεια. Η αιτιολογία της νόσου στις περισσότερες περιπτώσεις παραμένει άγνωστη. Σε μικρό ποσοστό ασθενών υπάρχει κληρονομικότητα (οικογενής N. Parkinson). Στην Ελλάδα, πάνω από 20000 ασθενείς πάσχουν από τη νόσο Parkinson και συναφή κινητικά νοσήματα. Το γεγονός αυτό δεν επιφέρει μόνο σημαντική ταλαιπωρία στον ασθενή αλλά και τον κοινωνικό περίγυρο που θα πρέπει να το φροντίζει. Επομένως, η θεραπεία της ασθένειας αποτελεί πρόκληση προς το επιστημονικό ερευνητικό προσωπικό.²²

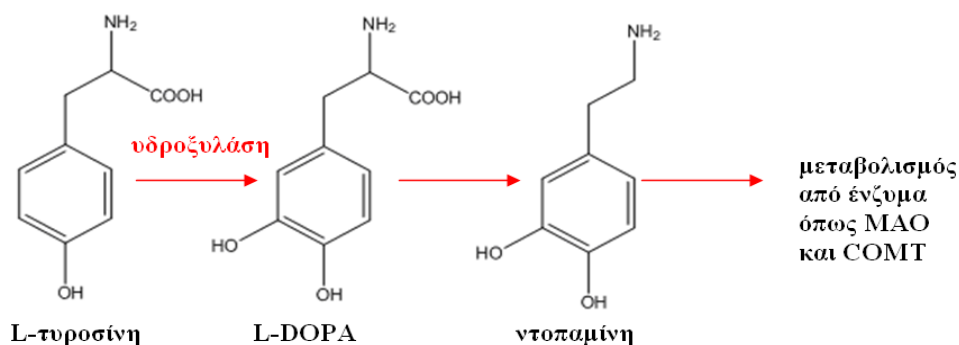


Σχήμα 29: Σε ασθενή με τη νόσο Parkinson (εικόνα δεξιά) παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα ντοπαμίνης σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου. Σύγκριση με μη πάσχοντα (εικόνα αριστερά)

Οι πιο πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι η πρόωπη αντιμετώπιση επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου και μειώνει τις θεραπευτικές παρενέργειες στα μετέπειτα στάδια. Επομένως, καθίσταται αναγκαία η έγκαιρη και ορθή διάγνωση. Στα μετέπειτα στάδια της νόσου που η φαρμακευτική ρύθμιση παύει να είναι αποτελεσματική, χρησιμοποιούνται πλέον επεμβατικές μέθοδοι. Τέτοιες αποτελούν η στο βάθος εγκεφαλική διέγερση και η γαστρική αντλία έγχυσης Duodopa, οι οποίες βελτιώνουν αισθητά, και σε πολλές περιπτώσεις σχεδόν εξαλείφουν τα κινητικά προβλήματα της νόσου.

Η θεραπευτική αγωγή με φάρμακα αν και δε λύνει το πρόβλημα της ασθένειας μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση ποιότητας της ζωής του ασθενούς και επιτυγχάνεται με χρήση θεραπευτικού αλγορίθμου σύμφωνα με την περίπτωση του ασθενούς. Γενικότερα, τα φάρμακα για τη νόσο Parkinson βοηθούν περισσότερο στις αργές κινήσεις και την ακαμψία των μυών και είναι λιγότερο αποτελεσματικά στα προβλήματα ομιλίας και απώλειας μνήμης. Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες φαρμάκων όπως είναι τα αντιχολινεργικά (π.χ. τριεξυφαινιδόλη-trihexyphenidyl), αναστολείς MAO (π.χ. σελεγιλλίνη-selegiline, αμανταδίνη-amantadine), L-DOPA και αγωνιστές υποδοχέων ντοπαμίνης (π.χ. ροπινιρόλη-ropinirole, καμπεργολίνη-campergoline, πραμιπεξόλη-pramipexole, βρωμοκρυπτίνη-bromocriptine) και αναστολείς της κατεχολ-Ο-μεθυλο-τρανσφεράσης (**Catechol-O-Methyl-Transferase-COMT**) (π.χ. εντακαπόνη-entacapone).²³

Όπως ήδη αναφέρθηκε στη νόσο Parkinson οι ντοπαμινεργικές απολήξεις εκφυλίζονται, με αποτέλεσμα να υπάρχει ελαττωμένη ντοπαμίνη. Η λεβοντόπα (L-dopa), ένα πρόδρομο αμινοξύ της ντοπαμίνης, διέρχεται τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (αντίθετα από τη ντοπαμίνη), εισέρχεται στις απολήξεις των επιζώντων ντοπαμινεργικών νευρώνων και μετατρέπεται σε ντοπαμίνη (Σχήμα 30).



Σχήμα 30: Μεταβολισμός της L-τυροσίνης

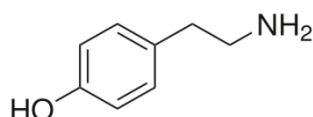
Από το παραπάνω σχήμα παρατηρείται ότι το ένζυμο μονοαμινοξειδάση μεταβολίζει τη ντοπαμίνη και συγκεκριμένα τη απαμινώνει στο 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ. Η μονοαμινοξειδάση είναι ένζυμο της εξωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων που υπάρχει σε μεγάλο αριθμό στους νευρώνες του συμπαθητικού. Υπάρχει σε άλλα σημεία του οργανισμού και κυρίως στο έντερο και στο συκώτι.

Μεταβολίζει *in vivo* ενδογενώς και τις βιογενείς αμίνες που προέρχονται από δίαιτα μέσω οξειδωτικής απαμίνωσης. Κύρια υποστρώματα εκτός από την ντοπαμίνη είναι η νορανδρεναλίνη, αδρεναλίνη, β-φαινυλαιθυλαμίνη και σεροτονίνη. Αυτά τα υποστρώματα εμπλέκονται στη βιοχημική παθολογία της κατάθλιψης και της ασθένειας Parkinson.

Υπάρχουν δύο ανοσολογικά διακριτά ισοένζυμα τα τύπου MAO-A και τύπου MAO-B, τα οποία περιγράφηκαν και διακρίνονται με βάση την εξειδίκευσή τους στο υπόστρωμα.

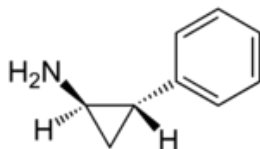
Το ισοένζυμο MAO-A παίζει κρίσιμο ρόλο στην απενεργοποίηση των κατεχολαμινών και των διαιτητικών αγγειοσυσταλτικών ουσιών (vasopressors)

όπως η τυραμίνη. Η τυραμίνη μεταβολίζεται εύκολα από τη MAO. Αυτή ευρίσκεται σε πολλά τρόφιμα (τυρί, γιαούρτι, κρασί κλπ). Όταν γίνεται ταυτόχρονη χορήγηση τέτοιων τροφίμων και αναστολέων της δράσης του ενζύμου, η τυραμίνη προκαλεί έντονη και παρατεταμένη δράση που μπορεί να καταλήξει σε υπερτασική κρίση (παρενέργεια τυριού-cheese effect) και σε εγκεφαλική αιμορραγία (Σχήμα 31).



Σχήμα 31: Δομή της τυραμίνης. Ενοχοποιείται για την υπερτασική κρίση και τις εγκεφαλικές αιμορραγίες που προκαλεί στους ασθενείς που λαμβάνουν αναστολείς MAO

Οι αναστολείς της MAO πρέπει να αναστέλλουν εκλεκτικά την MAO-A στον εγκέφαλο και όχι αυτήν στη γαστροεντερική οδό για να αποφευχθεί η «παρενέργεια τυριού». Ένα γνωστό μόριο το οποίο δεν είχε εκλεκτική δράση σε κάποια ισομορφή των MAO και που έδινε την παρενέργεια του τυριού είναι η τρανυλκυπρομίνη (tranylcypromine) (Σχήμα 32).

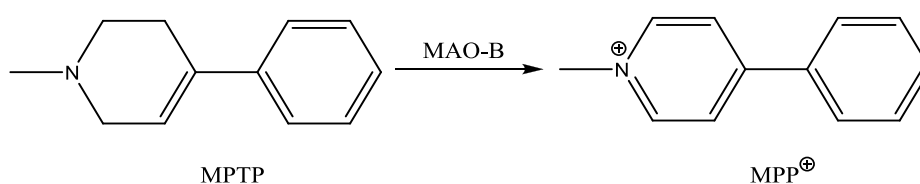


Σχήμα 32: Η τρανυλοκυπρομίνη είναι ένας μη εκλεκτικός MAO αναστολέας που προκαλεί την παρενέργεια του τυριού

Η MAO-A συνεισφέρει επίσης στην οξειδωτική απαμίνωση της ντοπαμίνης, νορεπινεφρίνης και σεροτονίνης. Η νορανδρεναλίνη και η σεροτονίνη είναι βιογενείς αμίνες που εμπλέκονται στην κατάθλιψη. Η MAO-B οφείλει περισσότερο από 80% της δράσης της στον ανθρώπινο εγκέφαλο και είναι η επικρατούσα ισομορφή που προκαλεί απαμίνωση της ντοπαμίνης. Επιπρόσθετα, η MAO-B είναι κυρίως υπεύθυνη για τη απαμίνωση της β-φαινυλαιθυλαμίνης, μίας ενδογενούς αμίνης που διεγείρει την απελευθέρωση και αναστέλλει την επαναπρόσληψη στους νευρώνες της ντοπαμίνης (neuronal reuptake of dopamine). Επομένως, εκλεκτική αναστολή της MAO-B

έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων συγκέντρωσης της συναπτοσωμιακής ντοπαμίνης. Η οξειδωτική απαμίνωση των βιογενών αμινών που καταλύεται από τη MAO-B παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Υπάρχει άμεση απόδειξη ότι οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται στην αιτιολογία της ασθένειας Parkinson γιατί αυξάνουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και τη δράση του υπεροξειδίου της δεσμουτάσης (Superoxide Dismutase, SOD) στη μέλαινα ουσία. Οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος όπως είναι η ασθένεια Alzheimer και η νόσος Parkinson συνοδεύονται με οξειδωτικό stress και αυξημένη MAO-B δράση. Σε αντίθεση, η δράση MAO-A δεν αυξάνει με την ηλικία γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση για ανεξάρτητη ρύθμιση και έκφραση των δύο ισοενζύμων.

Επιπρόσθετα, έχει δείχτει ότι η MAO-B είναι υπεύθυνη για το βιοσχηματισμό της 1-μεθυλο-4-φαινυλο-1,2,3,6 τετραϋδροπυριδίνης (MPTP) σε 1-μεθυλο-4-φαινυλοπυριδίνιο (MPP⁺), μία νευροτοξίνη που προάγει την ασθένεια Parkinson γιατί θανατώνει τους νευρώνες που παράγουν ντοπαμίνη στη μέλαινα ουσία. Για όλους τους παραπάνω λόγους εκλεκτικοί και αντιστρεπτοί αναστολείς των δύο MAO ισομορφών μπορεί να οδηγήσουν σε χρήσιμα θεραπευτικά προϊόντα (Σχήμα 33). Οι αναστολείς της MAO-B είναι χρήσιμοι ως συγχορηγούμενοι για την ασθένεια της Parkinson και ίσως της Alzheimer.^{23,24,25,26}

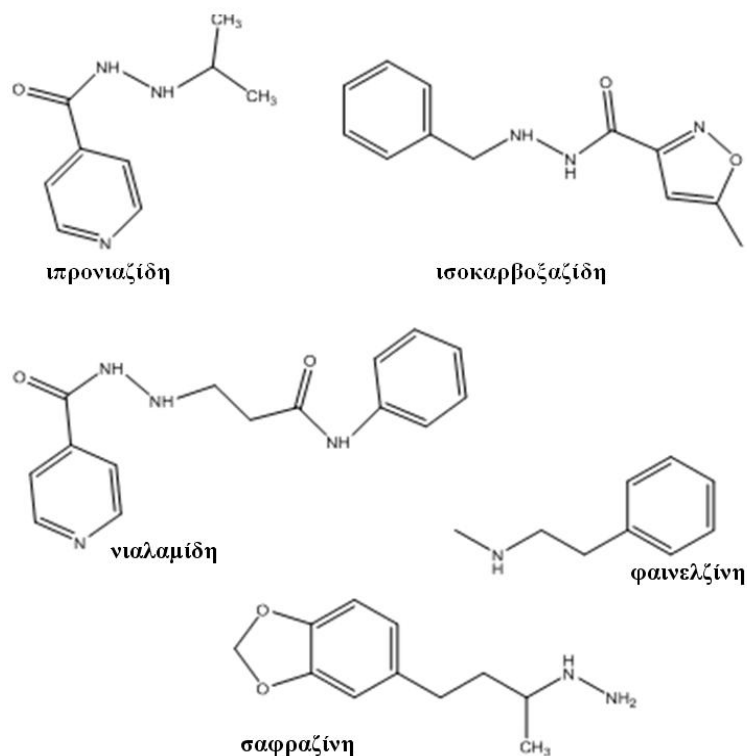


Σχήμα 33: Μετατροπή MPTP σε MPP⁺ από τη MAO-B

2.2 Ορθολογικός Σχεδιασμός αναστολέων MAO-B

2.2.1. Μη εκλεκτικοί και μη αντιστρεπτοί αναστολείς

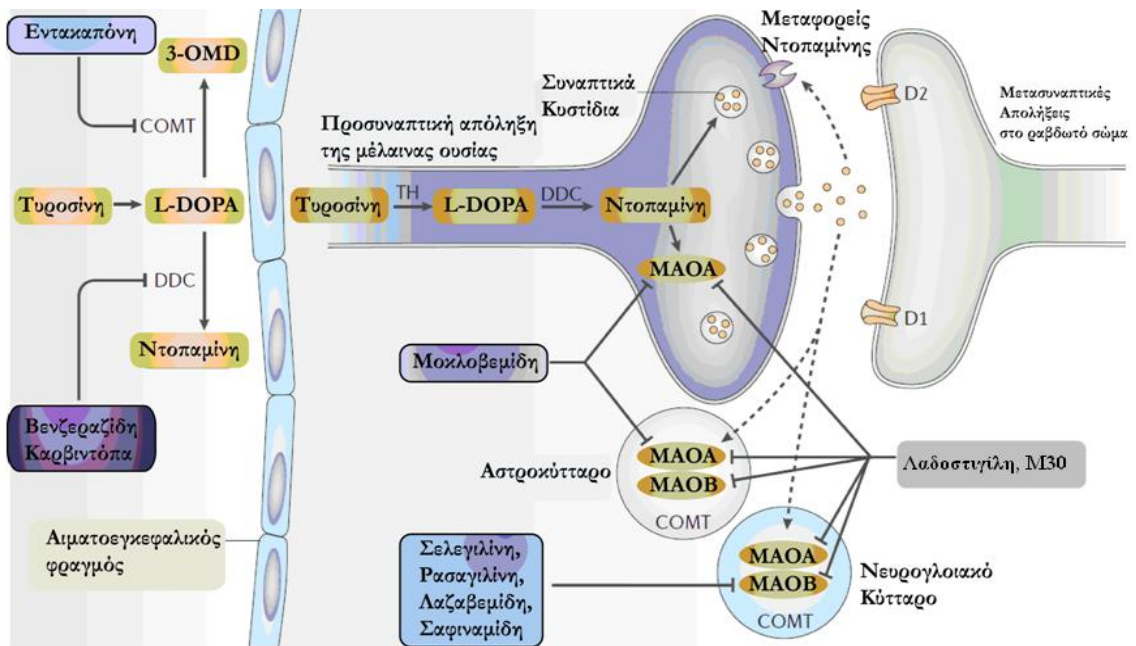
Αποτελούν τα πρώτα φάρμακα της σειράς. Παραδείγματα αποτελούν το ιπρονιαζίδιο (iproniazid), το ισοκαρβοξαζίδιο (isocarboxazid), το νιαλαμίδιο (nialamide), τη φαινελζίνη (phenelzine) και τη σαφραζίνη (safrazine) (Σχήμα 34).



Σχήμα 34: Μη εκλεκτικοί και μη αντιστρεπτοί αναστολείς MAO

2.2.2. Εκλεκτικοί αντιστρεπτοί και μη αντιστρεπτοί MAO-B αναστολείς

Παραδείγματα αποτελούν η παργυλίνη (pargyline), ρασαγιλίνη (rasagiline) και η σελεγιλίνη (selegiline) (Σχήμα 35).



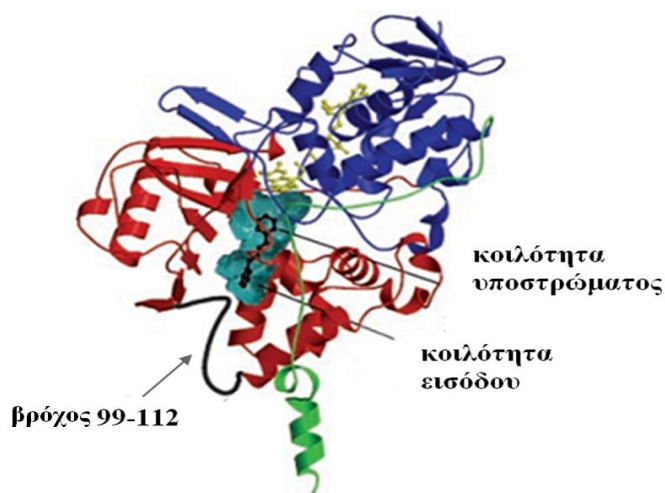
Σχήμα 37: Σύνθεση ντοπαμίνης και ο μεταβολισμός της από τις ισομορφές MAO-A και MAO-B. Στο σχεδιάγραμμα δείχνονται και σημεία που δρουν διάφορα φαρμακευτικά μόρια.

2.3 Προσέγγιση ανάπτυξης καινοτόμων αναστολέων με χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ

Η MAO είναι φλαβοπρωτεΐνη γιατί περιέχει ομοιοπολικά προσδεμένο αδενινικό δινουκλεοτίδιο της φλαβίνης (FAD) ως συνένζυμο το οποίο έχει ισχυρό φυσιολογικό και φαρμακολογικό ενδιαφέρον λόγω του κεντρικού ρόλου στο μεταβολισμό των νευρομεταβιβαστών.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της κρυσταλλογραφίας των ακτίνων-Χ δείχνουν ότι οι διαμορφώσεις των βρόχων που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα 100-118 και 200-216 της ανθρώπινης MAO-A διαφέρουν από αυτές των βρόχων της MAO-A που προέρχονται από τον αρουραίο και της ανθρώπινης MAO-B. Παρόλο που η ομολογία στις δύο MAO-A φτάνει μέχρι το 87% έχουν αυτές τις σημαντικές προαναφερθείσες διαφορές. Αυτές οι περιοχές είναι σημαντικές στη σύνθεση του ενεργού

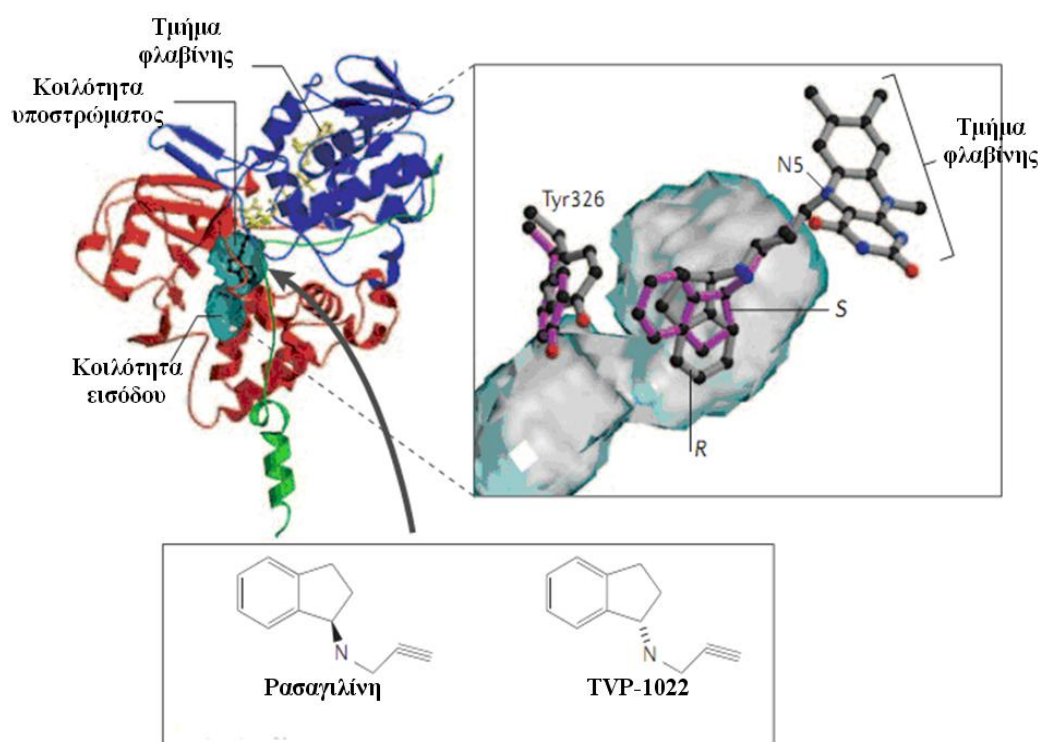
κέντρου. Οι κρυσταλλογραφημένες ανθρώπινες MAO είναι μονομερείς αντί διμερείς που εμφανίζονται στην περίπτωση της MAO-A που λαμβάνονται από αρουραίο (Σχήμα 38). Τα αμινοξέα Ile335 στη MAO-A και Tyr326 στη MAO-B παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα του υποστρώματος/αναστολέα. Η εκλεκτικότητα των αντιστρεπτών αναστολέων προκαλείται από το διαφορετικό μέγεθος και όγκο της κοιλότητας που υποδέχεται το υπόστρωμα στις δύο MAO ισομορφές. Η μεταλλαγμένη ανθρώπινη MAO-A είναι όμοια με τη MAO αρουραίων και ανθρώπινη MAO-B αλλά διαφορετική από την ανθρώπινη MAO-A. Η ευελιξία του βρόχου 99-112 διευκολύνεται από την αγκυροβόληση του ενζύμου στη μεμβράνη και είναι ουσιώδης για τον έλεγχο της εισόδου του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο. Προβλέπεται ότι οι C-τελικές περιοχές της ανθρώπινης MAO-B και αρουραίας MAO-A είναι διαμεμβρανικές α-έλικες που αγκυροβολούν τα ένζυμα στη μιτοχονδριακή εξωτερική μεμβράνη, με το υπόλοιπο της πρωτεΐνης να εκτείνεται στο κυτταρόπλασμα.^{27,28,29,30}



Σχήμα 38: Η μονομερική μονάδα της τρισδιάστατης δομής της ανθρώπινης MAO-B συμπλεγμένης με το 1,3-διφαινυλο-2-βουτένιο. Η περιοχή πρόσδεσης FAD (αμινοξέα 4-79, 211-285 και 391-453) είναι ζωγραφισμένη με μπλε χρώμα, η περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος (αμινοξέα 80-210, 286-390 και 454-488) είναι χρωματισμένη με κόκκινο και η C-τελική περιοχή της πρόσδεσης της μεμβράνης (αμινοξέα 489-500) με πράσινο.

Το συνένζυμο της FAD και ο αναστολέας παριστάνονται με κίτρινες και μαύρες σφαίρες και ράβδους μοντέλα αντίστοιχα. Ο αναστολέας δεσμεύεται στην κοιλότητα (δείχνεται με κυανή επιφάνεια) η οποία προκύπτει από τη συγχώνευση της εισόδου και τις κοιλότητες υποστρώματος.

Η κρυστάλλωση των ισομορφών της MAO βοήθησε ώστε να αναπτυχθεί ορθολογικός σχεδιασμός καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων. Η συγκρυστάλλωση των δύο εναντιομερών ρασαγιλίνη και TVP-1022 αποτελεί ένα παράδειγμα όπου το αποτέλεσμα μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση του μοριακού μηχανισμού δράσης των μορίων αυτών. Στο Σχήμα 39 παριστάνονται οι τρόποι δράσης των δύο μορίων. Φαρμακευτική δράση έχει μόνο αυτό με την *R* απόλυτη απεικόνιση στο χειρόμορφο κέντρο. Τα δύο μόρια δεσμεύονται ομοιοπολικά με τη N(5) θέση του τμήματος της φλαβίνης για να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα φλαβοκυανίνης στο ενεργό κέντρο. Αυτή η πρόσδεση επιδρά στη διαμόρφωση του αμινοξέος της Tyr326, το οποίο βρίσκεται στη συμβολή μεταξύ της κοιλότητας του υποστρώματος και της κοιλότητας εισόδου. Τα αποτελέσματα πρόσδεσης του ισομερούς με *S* απόλυτη απεικόνιση δείχνουν ότι προκαλούνται μικρότερες διαμορφωτικές μεταβολές που ίσως εξηγούν και τη μικρότερη βιολογική του δράση.²³

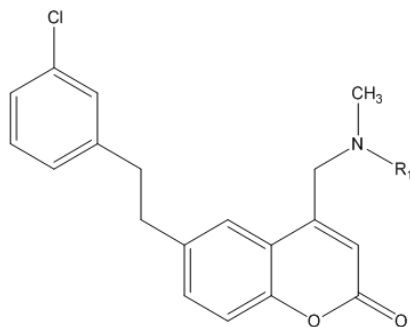


Σχήμα 39: Τα δύο μόρια ρασαγιλίνη και TVP-1022 στο ενεργό κέντρο

Ο Pisanì και οι συνεργάτες του³¹ πρόσφατα συνέθεσαν παράγωγα κουμαρινών τα οποία είχαν ανασταλτική δράση σε επίπεδο νανομοριακό και

εξαιρετική εκλεκτικότητα στη MAO-B ισομορφή. Ένα από αυτά, η ένωση **22b** (Σχήμα 40) βρέθηκε να παρουσιάζει ισχυρή *in vitro* και *in vivo* εκλεκτική δράση στη MAO-B ισομορφή, να διαπερνά ταχέως τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, να είναι βραχείας δράσης και με αντιστρεπτή ανασταλτική δράση, μικρή ανασταλτική ικανότητα κατά του κυτοχρώματος P450 και χαμηλή *in vitro* τοξικότητα. Τα προκλινικά αυτά χαρακτηριστικά την καθιστούν υποσχόμενη ένωση για κλινικές δοκιμές όσο αφορά τη θεραπεία νευροεκφυλιστικών ασθενειών.

Η μοριακή πρόσδεση της ένωσης **22b** και της 615 φορές λιγότερο δραστηκής ένωσης **22k** παριστάνονται στο Σχήμα 40. Η ένωση **22k** δεν είναι επίσης δραστηκή στην ισομορφή MAO-A και έχει δείκτη εκλεκτικότητας (τιμές SI) κατά 35 φορές μικρότερο από αυτό της **22b**.³¹



Ένωση	R ₁	IC ₅₀ (MAO-A)	IC ₅₀ (MAO-B)	SI ^a
22b	H	5,94	0,013	457
22k	Bn	>100	8,0	>13

$$SI = IC_{50}(MAO-A) / IC_{50}(MAO-B)$$

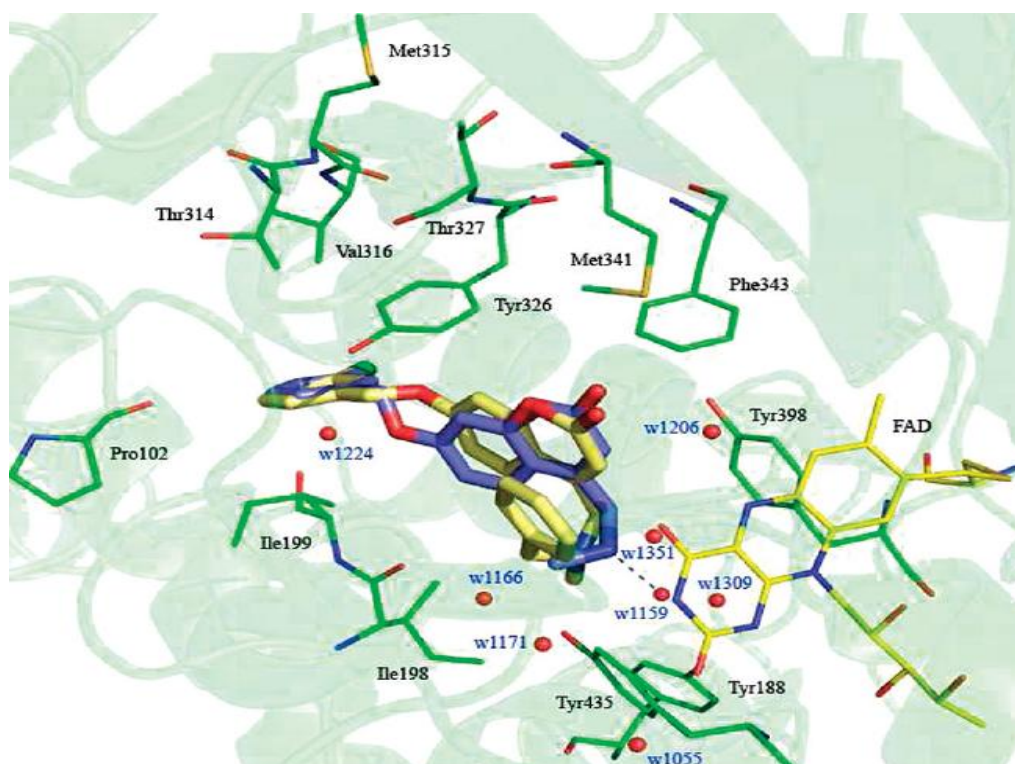
Σχήμα 40: Κουμαρινικά παράγωγα και η δράση τους ως MAO αναστολείς

Η αλληλεπίδραση των κουμαρινικών παραγώγων στη rMAO-B παριστάνεται στο Σχήμα 41. Η ένωση **22k** έχει λιγότερο ισχυρές αλληλεπιδράσεις με εξειδικευμένες πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων και των μορίων του νερού που συμμετέχουν στην πρόσδεση με αποτέλεσμα να μην έχει τόσο ισχυρή δέσμευση. Οι van der Waals αλληλεπιδράσεις των δύο μορίων δε διαφέρουν

σημαντικά. Το μόριο **22b** σχηματίζει επίσης ισχυρότερους υδρογονικούς δεσμούς συγκριτικά με την ένωση **22k**.

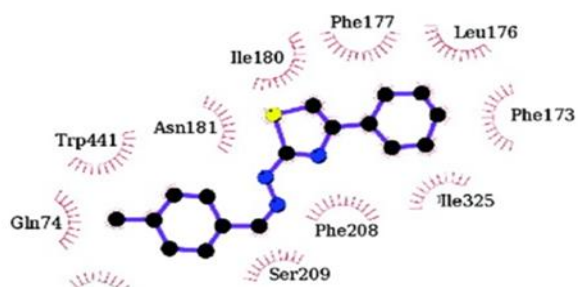
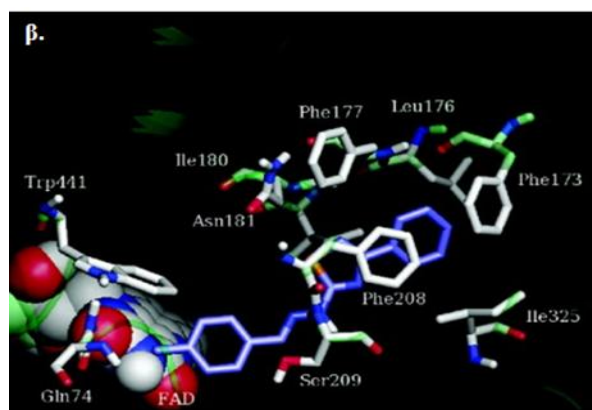
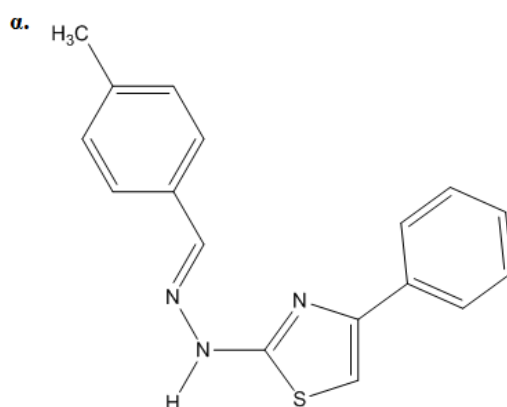
Ο Chimenti και οι συνεργάτες του παρασκεύασαν παράγωγα της 2-θειαζολυδραζόνης ως εκλεκτικούς αναστολείς της MAO³². Ο πιο δραστήσιος και εκλεκτικός αναστολέας ήταν η ακόλουθη ένωση (Σχήμα 42).

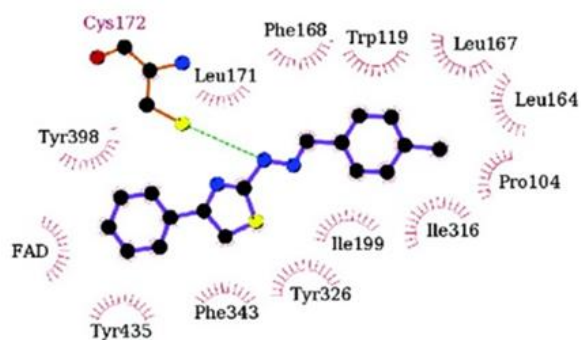
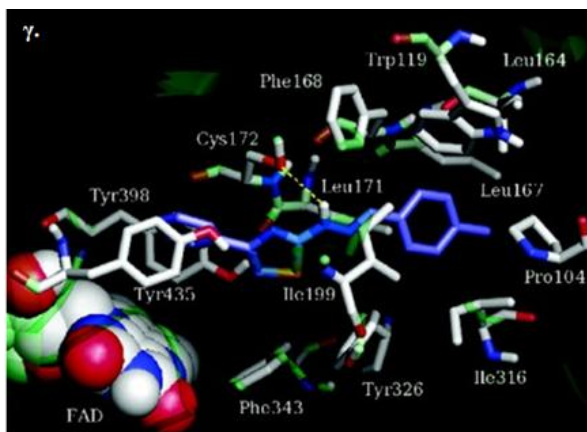
Με χρήση μοριακής μοντελοποίησης, οι ίδιοι ερευνητές προσπάθησαν να εξηγήσουν την εκλεκτική δράση του πιο κάτω μορίου. Στο Σχήμα 42 (α,β) παρουσιάζεται η μοριακή πρόσδεση του μορίου στις MAO-A και MAO-B ισομορφές. Το μόριο όταν προσδένεται στην ισομορφή MAO-A είναι σε χωρική εγγύτητα στο FAD και το φαινύλιο του αλληλεπιδρά με τα υδροφοβικά αμινοξέα Phe177, Leu176, Phe173 και Ile325. Η ισχυρότερη αλληλεπίδρασή του ήταν με το υδρόφοβο αμινοξύ Phe208.



Σχήμα 41: Πόζες πρόσδεσης των ενώσεων 22b και 22k (δείχνονται με κίτρινο και κυανό χρώμα αντίστοιχα και με μοντέλα ράβδων). Τα αμινοξέα και ο συμπαραάγοντας βρίσκονται γύρω από τα δύο κουμαρινικά παράγωγα. Τα άτομα του άνθρακα παριστάνονται με πράσινο στα αμινοξέα και με κίτρινο στο FAD συμπαραάγοντα. Τα μόρια του νερού παριστάνονται με κόκκινες σφαίρες και οι υδρογονικοί δεσμοί με μαυρισμένες μπλε διακεκομμένες γραμμές

Η αναγνώριση του μορίου στην κοιλότητα της MAO-B είναι αυξημένη. Στην περίπτωση της MAO-B εμπλέκονται δύο υδρόφοβα τμήματα του ενζύμου στον πιο σταθερό τρόπο πρόσδεσης. Ο ένας τρόπος βασίζεται στα υδρόφοβα αμινοξέα Phe168, Trp119, Leu164, Pro104, Ile316 και Ile199 (Σχήμα 42β). Ο άλλος τρόπος βασίζεται στους FAD συμπαραγόντες Tyr398 και Tyr345 (Σχήμα 42γ). Με τα δύο αυτά αρωματικά αμινοξέα εγκαθιδρύεται μία αλληλεπίδραση π-π στίβαξης με το φαινύλιο. Αυτού του τύπου αλληλεπίδραση είναι ασυνήθης σε πολλούς MAO αναστολείς. Επιπρόσθετα, ένας ενδομοριακός υδρογονικός δεσμός αλληλεπίδρασης μεταξύ του ιμινικού υδρογόνου και της πλευρικής αλυσίδας του Cys172 σταθεροποιεί τη διαμόρφωσή της.



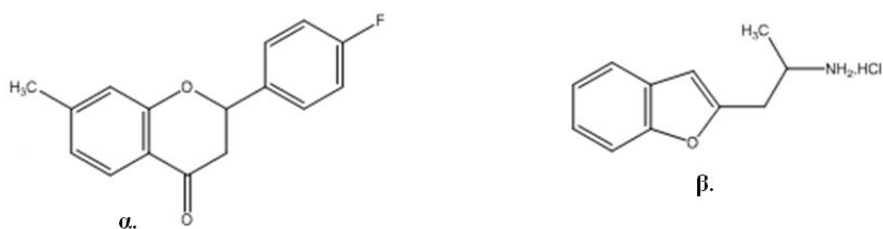


Σχήμα 42: α. Δομή του ισχυρότερου και εκλεκτικότερου αναστολέα 2-θειαζολυδραζονικού παραγώγου. Σταθερότερα σύμπλοκα του ίδιου μορίου στις β. MAO-A και γ. MAO- B. Ο αναστολέας δείχνεται με μπλε χρώμα και σε CPK μοντέλο το FAD. Αναγράφονται τα αμινοξέα που βρίσκονται στη χωρική γειτονία του αναστολέα.

2.4 Συμπεράσματα

Από τα προαναφερθέντα είναι εμφανές ότι είναι σε εξέλιξη έντονη ερευνητική προσπάθεια για να συντεθούν εκλεκτικοί αναστολείς της MAO. Υπάρχουν στη βιβλιογραφία πληθώρα παραδειγμάτων όπου συντίθενται μόρια που έχουν τέτοια εκλεκτικότητα. Συνοπτικά αναφέρονται τα παράγωγα των φλαβονοειδών, μία μεγάλη ομάδα πολυφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στα φυτά και καταναλώνονται ως τρόφιμα (π.χ. λαχανικά και φρούτα), ελαιόλαδο, ποτά όπως το κρασί και ροφήματα όπως το τσάι. Αντιπροσωπευτική δομή φλαβόνης³³ με ισχυρή εκλεκτική ανασταλτική δράση κατά της μορφής MAO-B δείχνεται στο Σχήμα 43α.

Οι ετεροαρυλισοπροτυλαμίνες είναι μία άλλη τάξη ενώσεων που δρουν ως MAO αναστολείς. Αντιπροσωπευτική δομή³⁴ αυτής της σειράς ενώσεων παριστάνεται στο Σχήμα 43β.



Σχήμα 43: Χημικές δομές παραγώγων: α. φλαβονόνης, β. ετεροαρυλισοπροτυλαμίνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΝΕΑ ΠΟΛΥΣΤΟΧΕΥΜΕΝΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ



3.1 Εισαγωγή

Ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας στη Φαρμακευτική Χημεία είναι η σύνθεση μορίων τα οποία δρουν σε πολλαπλούς στόχους. Αρκετές ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος, οι ψυχοτρόπες, οι νευροεκφυλιστικές και οι καρδιαγγειακές είναι πολυπαραγοντικές. Επομένως, η στόχευση στα υπεύθυνα τμήματα της βιοχημικής οδού για την πρόκληση της ασθένειας θα έχει περισσότερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με την εκλεκτική στόχευση ενός μόνο σημείου της βιοχημικής οδού.

Μία σύγχρονη τάση στο σχεδιασμό και ανακάλυψη φαρμάκων είναι ο ορθολογικός σχεδιασμός καινοτόμων μορίων που δρουν σε πολλούς φαρμακευτικούς στόχους (Σχήμα 44).



Σχήμα 44: Στη σύγχρονη προσέγγιση για την ανάπτυξη καινοτόμων μορίων σε πολυπαραγοντικές ασθένειες στοχεύονται πολλαπλοί στόχοι σε βιοχημικές οδούς υπεύθυνες για την ασθένεια

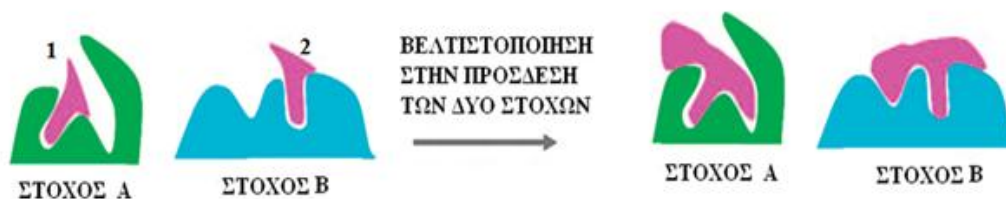
Το 2004 ο Morphy και Rankovic ταυτοποίησαν πάνω από 300 δημοσιευμένα άρθρα σε περιοδικά που σχετίζονταν με τη Φαρμακευτική Χημεία στα οποία οι δομές που συντέθηκαν αφορούσαν φάρμακα που δρούσαν σε πολλαπλούς στόχους.³⁵

Η ονοματολογία τέτοιων μορίων ποικίλει στη βιβλιογραφία και διαφορετικά ονόματα εκφράζουν την ίδια λειτουργικότητα. Για παράδειγμα μόρια που δρουν σε δύο στόχους αναφέρονται στη βιβλιογραφία με ονόματα όπως dual

ligands (προσδέτες σε δύο στόχους), dual mechanism (μόρια που δρουν μηχανιστικά με δύο τρόπους), bifunctional (δυλειτουργικά μόρια). Το ίδιο ισχύει και για μόρια που δρουν σε πολλαπλούς στόχους. Αυτά ονομάζονται αντίστοιχα multifunctional ligands (πολυλειτουργικά μόρια), multimechanistic (μόρια που δρουν με πολλούς μηχανισμούς), multitarget (μόρια που δρουν σε πολλούς στόχους). Λόγω της πολυνοματολογίας για τα φάρμακα αυτά οι Morphy & Rankovic πρότειναν τη χρήση του όρου «Designed Multiple LigandS (DMLS)». Ενώσεις δηλαδή που σχεδιάζονται ορθολογικά ειδικά να στοχεύσουν τους πολλαπλούς μηχανισμούς που αιτιολογούν μία εξειδικευμένη ασθένεια.³⁵

Φάρμακα που δρουν σε πολλούς στόχους έχουν θεραπευτικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με αυτά που δρουν σε ένα στόχο γιατί μπορούν να παρουσιάσουν προσθετικές ή συνεργιστικές δράσεις. Το προσθετικό αποτέλεσμα παρατηρείται όταν γίνεται ταυτόχρονη τροποποίηση στους δύο στόχους από το ίδιο μόριο η οποία ισούται με το άθροισμα των εκλεκτικών ενώσεων αναφοράς. Συνέργεια παρατηρείται όταν το ολικό αποτέλεσμα υπερέχει αυτό του αθροίσματος των εκλεκτικών ενώσεων αναφοράς. Προσθετικά αποτελέσματα παρατηρούνται όταν οι στόχοι βρίσκονται στην ίδια βιοχημική οδό ενώ συνεργιστικά όταν οι στόχοι εντοπίζονται σε λειτουργικές συμπληρωματικές βιοχημικές οδούς.

Ο σχεδιασμός με τη μέθοδο FBDD (Fragment Based Drug Design) έχει χρησιμοποιηθεί στην εύρεση μορίων που δρουν σε πολλούς στόχους. Στην FBDD γίνεται χρήση πολλών βιοφυσικών μεθόδων όπως NMR, ακτίνες-X, ισόθερμη θερμιδομετρία ογκομέτρησης (Isothermal Titration Calorimetry-ITC), επιφανειακός συντονισμός πλάσματος (Surface Plasmon Resonance-SPR). Η αρχή της FBDD δείχνεται στο ακόλουθο Σχήμα 45.



Σχήμα 45: Στη μέθοδο FBDD χρησιμοποιούνται αρχικά μικρά δομικά τμήματα A και B τα οποία προσδένονται στους στόχους A και B. Τα τμήματα αυτά βελτιώνονται ώστε να λάβουν συμπληρωματικά σχήματα με τις θήκες πρόσδεσης (rocketing).

Αφού επιτευχθεί αυτός ο στόχος, τα ολικά ή μερικά τμήματα των A και B συζευγνύονται ώστε να επιτευχθεί μία ένωση η οποία να περιέχει ολοκληρωτικά ή μερικά τα τμήματα A και B

Στη μέθοδο FBDD βασικά γίνεται βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων στις κοιλότητες ή θήκες των υποδοχέων στα ενεργά ή αλλοστερικά κέντρα. Ο νέος αυτός κλάδος ορθολογικού σχεδιασμού ονομάζεται «rocketomics». Γενικά, οι αλληλεπιδράσεις χημικών ουσιών με πρωτεΐνες ονομάζονται «interatomics».

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η χρήση μόνο ενός φαρμάκου που δρα σε πολλαπλούς στόχους είναι υπέρτερη από τη χρήση των φαρμάκων κοκταϊήλ που επιτυγχάνουν το ίδιο στόχο αλλά που η χρήση τους είναι μη φιλική με ενδεχόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες και επικίνδυνη.

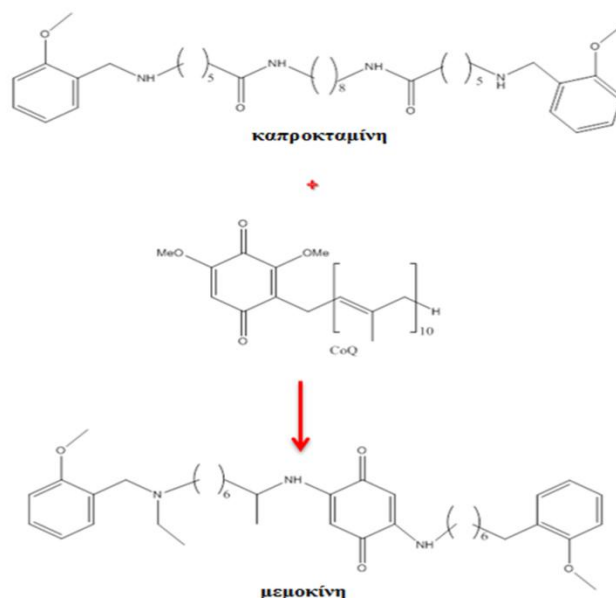
Ο Hellerstein ισχυρίσθηκε ότι οι πραγματικοί στόχοι των φαρμάκων δεν είναι οι αυτές καθ' εαυτές πρωτεΐνες αλλά οι λειτουργικές σημαντικές βιοχημικές οδοί που είναι συσσωματωμένες σε μεγαλύτερα βιολογικά δίκτυα. Γι' αυτό η στοχοποίηση από φαρμακευτικά μόρια κομβικών πλειοτρόπων πρωτεϊνών, η αύξηση της διαταραχής του δικτύου της ασθένειας (disease network) και η δράση στο φαινότυπο είναι απαραίτητη εάν επιθυμούμε να αποδείξουμε την αποτελεσματικότητα και να κατανοήσουμε την τοξικότητα των φαρμάκων.³⁵

Πρέπει να σημειωθεί ότι για την ανάπτυξη πολυστοχευμένων φαρμάκων έχουν χρησιμοποιηθεί όλες οι μεθοδολογίες ορθολογικού σχεδιασμού που έχει στη φαρέτρα του ο θεωρητικός φαρμακοχημικός. Μοριακή πρόσδεση, μοριακή δυναμική, ανάπτυξη φαρμακοφόρου μοντέλου, σχέσεις δομής δράσης είναι οι συνήθεις προσεγγίσεις για την ανάπτυξη καινοτόμων

φαρμάκων με πολυστοχευμένη δράση. Γενικά, για κάθε σύστημα χρησιμοποιείται συγκεκριμένη μεθοδολογία που οι ερευνητές γνωρίζουν περισσότερο και που θεωρούν ότι θα αποδώσει το συντομότερο σημαντικά αποτελέσματα.

3.2 Πολυπαραγοντικά Μόρια κατά των νευροεκφυλιστικών ασθενειών της Alzheimer και Parkinson

Μόρια που δρουν κατά της ακετυλοχολινεστεράσης έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα και κατά της ασθένειας Alzheimer. Οι αλκυλαμίνες είναι από τα πρώτα χρησιμοποιούμενα υποστρώματα. Λόγω της ευελιξίας τους και του φορτίου τους μπορούν να λάβουν διάφορες διαμορφώσεις και να αλληλεπιδράσουν με ανιοντικά τμήματα νουκλεϊνικών οξέων, πρωτεΐνες ή ένζυμα. Η μεμοκίνη (memoquin) ένα χρησιμοποιούμενο φάρμακο κατά της ασθένειας Alzheimer αποτελεί υβρίδιο της καπροκταμίνης που αποτελεί AChE ανταγωνιστή και του βενζοκινονικού τμήματος του μιτοχονδριακού αντιοξειδωτικού συνενζύμου Q (CoQ) (Σχήμα 46).

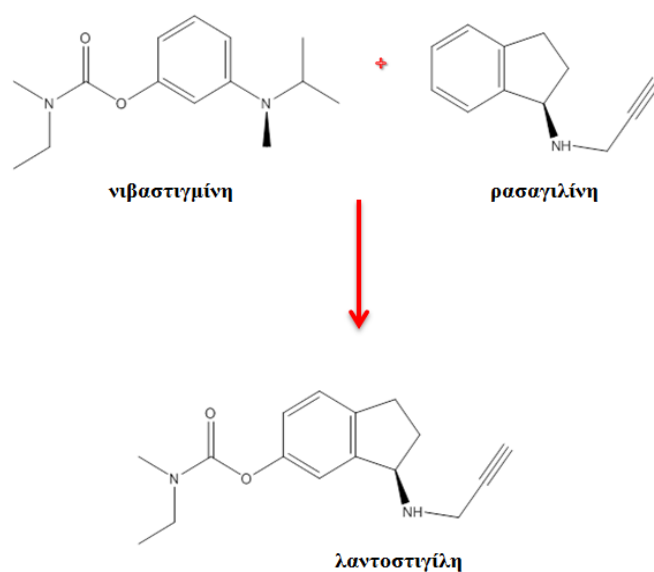


Σχήμα 46: Η ένωση μεμοκίνη όπως προκύπτει από το σχήμα αποτελεί ένα υβρίδιο της καπροκταμίνης (caproctamine) και του βενζοκινονικού τμήματος του μιτοχονδριακού αντιοξειδωτικού συνενζύμου Q (CoQ)

Επίσης, συντέθηκαν ενώσεις που δρουν κατά της ακετυλοχολινεστεράσης και βουτυροχολινεστεράσης και αναστέλλουν τις MAO-A και MAO-B ισομορφές. Τέτοιες ενώσεις είναι χρήσιμες για τη νόσο Alzheimer.

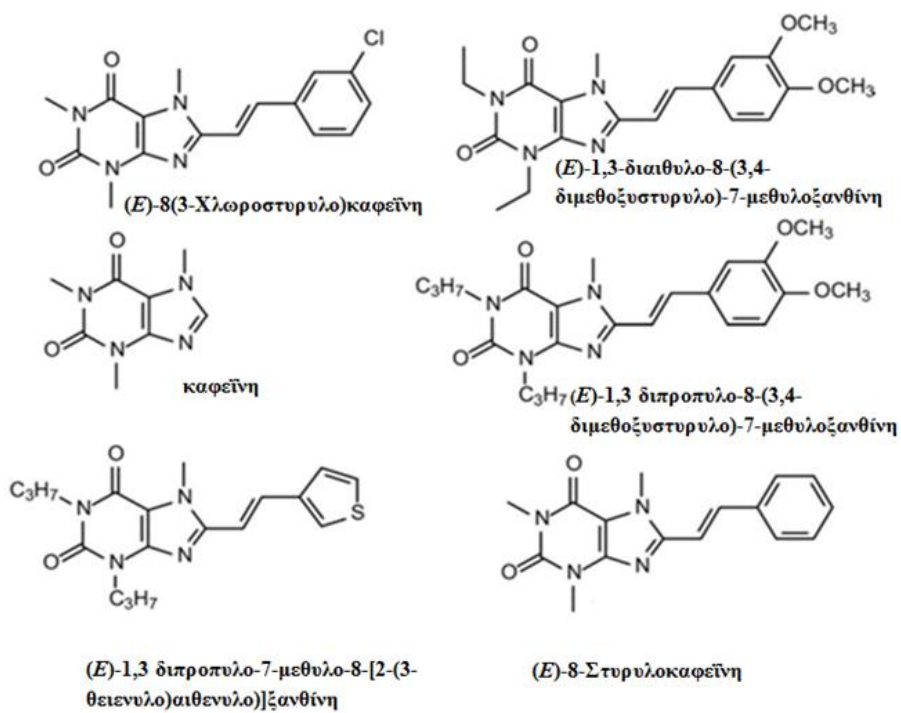
Για την ασθένεια της Parkinson, μόρια που δρουν κατά της ακετυλοχολινεστεράσης και των ισομορφών MAO-A και MAO-B έχουν χρησιμοποιηθεί ως φάρμακα. Η λαντοστιγίλη (ladostigile) είναι ένα μόριο το οποίο δρα κατά της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) και βουτυροχολινεστεράσης (BuChE) και αναστέλλει τις MAO-A και MAO-B ισομορφές (Σχήμα 37).

Περιέχει δομικά χαρακτηριστικά της ρασαγιλίνης (rasagiline) που είναι εκλεκτικός ανταγωνιστής της MAO-B ισομορφής και της νιβαστιγμίνης (nivastigmine) η οποία είναι AChE αναστολέας (Σχήμα 47).



Σχήμα 47: Ένωση χρήσιμη για την ασθένεια της Parkinson η οποία περιλαμβάνει δομικά στοιχεία από τα μόρια της ρασαγιλίνης και της νιβαστιγμίνης

Επίσης, παρασκευάστηκαν μόρια που αναστέλλουν τη MAO-B και τους υποδοχείς της αδενοσίνης A2A ως μόρια δυνάμει με θεραπευτικές ιδιότητες κατά της ασθένειας Parkinson³⁶ (Σχήμα 48).



Σχήμα 48: Καφεΐνη και παράγωγα καφεΐνης ως αναστολείς της A2A και MAO-B

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΥΝΑΜΙΚΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ AMBER

(Assisted Model Building with Energy Refinement)



*Φωτογραφία κεχριμπαριού (**AMBER**) που βρίσκεται στο Μουσείο Φυσικής Ιστορίας, Φραγκφούρτη, Γερμανίας. Μέσα στο κεχριμπάρι που εμφανίζεται στη φωτογραφία υπάρχουν 32 νεκρά είδη εντόμων.*

4.1 Εισαγωγή στο υπολογιστικό πακέτο AMBER

Το υπολογιστικό πακέτο **AMBER**³⁷ (**A**ssisted **M**odel **B**uilding **E**nergy **R**efinement) περιλαμβάνει χρήσιμα εργαλεία της σύγχρονης Υπολογιστικής Χημείας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρόγραμμα Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics) μέσω του οποίου υπολογίζεται η Ελεύθερη Ενέργεια (free energy calculations) πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και υδατανθράκων. Στο Σχήμα 49 φαίνεται το σχεδιάγραμμα της πορείας υπολογισμών με το πακέτο Amber.

Διακρίνονται τρία κύρια προγράμματα:

1. Προγράμματα Προετοιμασίας (*Preparation Programs*)

Τα κύρια προγράμματα προετοιμασίας είναι: **antechamber** και **LEaP** (**L**ink, **E**dit, and **P**arm).

antechamber

- Σύνολο εργαλείων για τη δημιουργία αρχείων οργανικών μορίων τα οποία στη συνέχεια μπορούν να διαβαστούν από το πρόγραμμα **LEaP**.
- Δυνατότητα μετατροπής αρχείων (π.χ από pdb αρχεία σε mol2 αρχεία) και καθορισμός ατομικών φορτίων και τύπων ατόμων (atom types)

LEaP

- Δυνατότητα ανάγνωσης και γραφής πολλών τύπων αρχείων (formats: pdb, mol2, Amber Prep, Amber Parm, Object file format)
- Δημιουργία νέων αμινοξέων και μορίων χρησιμοποιώντας απλές εντολές
- Ένωση αμινοξέων και δημιουργία με τους χωρίς δεσμούς συμπλόκων μορίων (nonbonded complexes of molecules)
- Τοποθέτηση αντισταθμιστικών ιόντων (counterions) γύρω από το μόριο
- Διαλυτοποίηση μορίων σε διάφορους διαλύτες

- Μετατροπή εσωτερικών συντεταγμένων στο μόριο
- Δημιουργία αρχείων που περιέχουν την τοπολογία (**prmcrd**) και τις παραμέτρους του συστήματος (**prmtop**)

2. Προγράμματα Προσομοίωσης (Simulation Programs)

Το κύριο πρόγραμμα προσομοίωσης ονομάζεται **Sander** (**S**imulated **A**nnealing with **N**M**R**-**D**erived **E**nergy **R**estraints) με το οποίο εκτελούνται υπολογισμοί ελαχιστοποίησης ενέργειας, μοριακής δυναμικής και βελτιστοποίησης της διαμόρφωσης μορίων μέσω φασματοσκοπίας NMR (Nuclear Magnetic Resonance)

3. Προγράμματα Ανάλυσης (Analysis Programs)

- **Ptraj**

Πρόγραμμα στο οποίο επεξεργάζονται/αναλύονται 3D-συντεταγμένες/αρχεία τροχειών

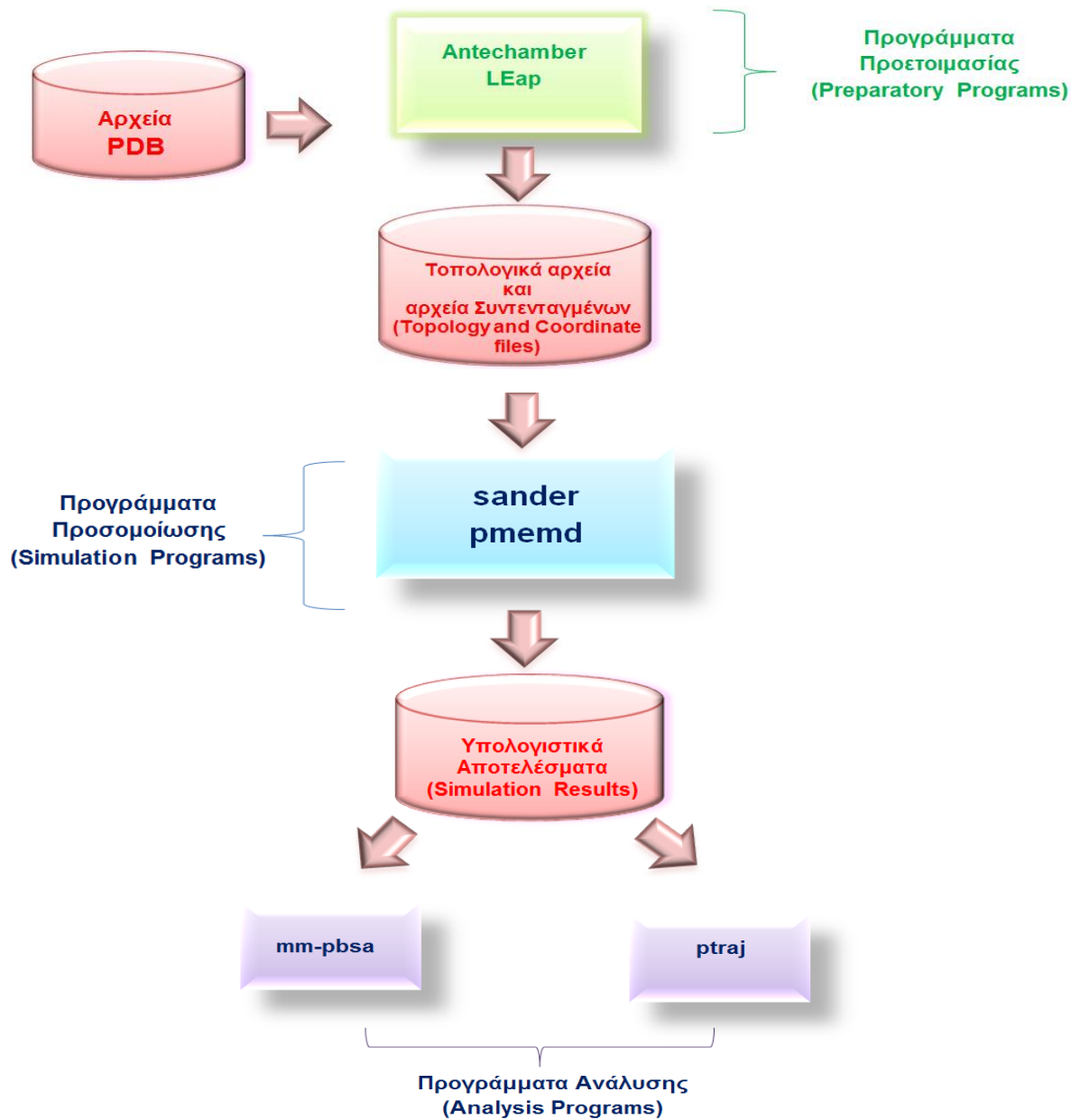
- Υπολογίζονται οι γωνίες μεταξύ των ατόμων
- Υπολογίζεται η μέση διαμορφωτική δομή
- Υπολογίζονται οι αποστάσεις μεταξύ επιλεγμένων ατόμων
- Αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου
- Υπολογίζονται οι συναρτήσεις συσχετισμού

- **MM-PBSA**

Μέθοδος για τον υπολογισμό των ελεύθερων ενεργειών της πρόσδεσης των μορίων σε διάλυμα

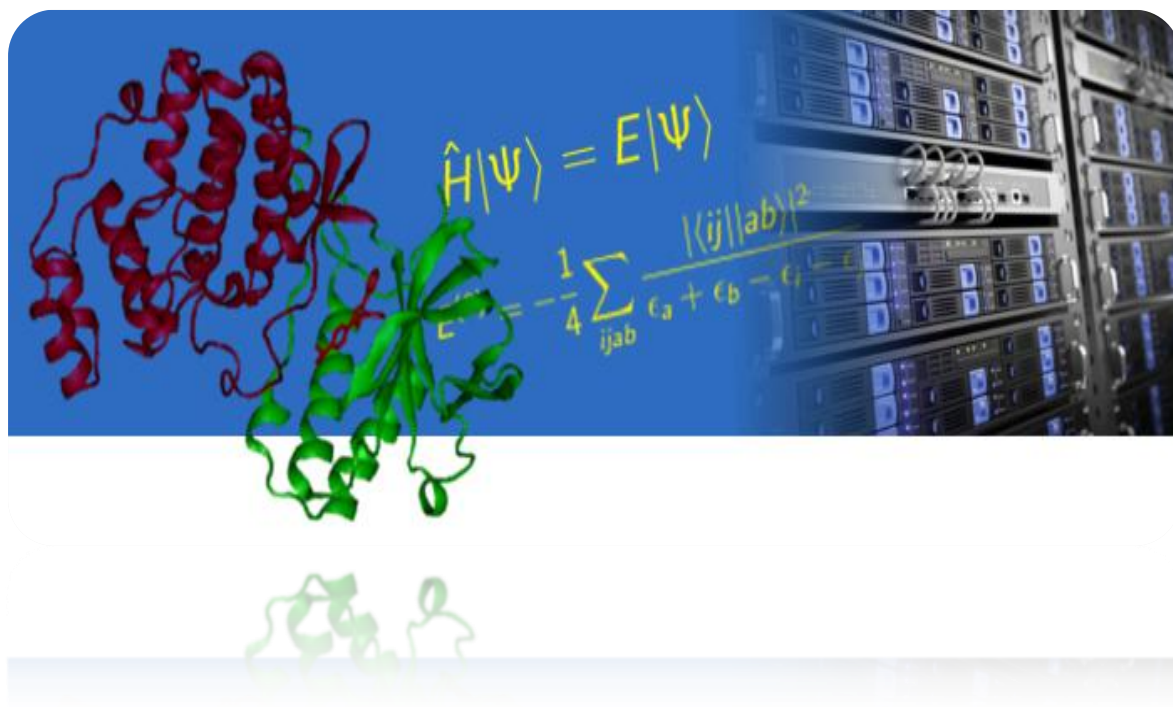
- **PME** (**P**article **M**esh **E**wald **M**olecular **D**ynamics)

Βελτιστοποιημένη έκδοση του προγράμματος Sander για περιοδικές, Particle mesh Ewald (PME) και Generalized Born (GB) προσομοιώσεις.



Σχήμα 49: Σχεδιάγραμμα πορείας υπολογισμών με το πακέτο Amber

ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



(Εικόνα από την ιστοσελίδα:

http://chem.ucr.edu/research/computational_chemistry.html)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε ένα από τα παθολογικά χαρακτηριστικά της νόσου Alzheimer είναι οι αμυλοειδείς πλάκες, οι οποίες αποτελούνται από το β-αμυλοειδές (Αβ), ένα πρωτεϊνικό τμήμα της πρόδρομης πρωτεΐνης του αμυλοειδούς (Amyloid Precursor Protein, APP). Το ένζυμο που ευθύνεται για το σχηματισμό του β-αμυλοειδούς είναι η ασπαρτική πρωτεάση BACE-1. Για το λόγο αυτό η BACE-1 αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο και οι ερευνητικές προσπάθειες τα τελευταία χρόνια εντείνονται στην εύρεση αναστολέων του συγκεκριμένου ενζύμου.

Βιβλιογραφικές μελέτες αναφέρουν ότι οι οξειδωτικές βλάβες όπως η οξείδωση των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, του DNA, η γλυκοξείδωση καθώς και η φλεγμονή, είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την ανάπτυξη της νόσου Alzheimer. Με βάση τα δεδομένα αυτά μελετήθηκαν δύο ομάδες αντιοξειδωτικών ενώσεων με υπολογιστικές μεθόδους με σκοπό την εύρεση πιθανών αναστολέων της BACE-1. Συγκεκριμένα, οι ομάδες αυτές περιλάμβαναν συνθετικά παράγωγα της ρεσβερατρόλης και γλυοξυλοϋλο-αροϋλο παραγώγων της υδραζόνης. Στόχος μας, ήταν η εφαρμογή των υπολογιστικών προγραμμάτων με σκοπό την πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των μορίων και των αλληλεπιδράσεων τους με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου και κατόπιν η μελέτη *in vitro* της ανασταλτικής τους δράσης έναντι της BACE-1.

Για τα παράγωγα της ρεσβερατρόλης εφαρμόστηκαν μελέτες Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης καθώς και Μοριακή Δυναμική για να κατανοηθεί εάν ο τοπογραφικός τους εντοπισμός και προσανατολισμός στις λιπιδικές διπλοστιβάδες σχετίζεται με την αντιοξειδωτική τους δράση.

Στην ασθένεια Parkinson, τα κύτταρα της μέλαινας ουσίας προοδευτικά νεκρώνονται και παύουν να παράγουν τον νευροδιαβιβαστή ντοπαμίνη που βοηθά τη δημιουργία και τον έλεγχο της κίνησης του σώματός μας. Το ένζυμο

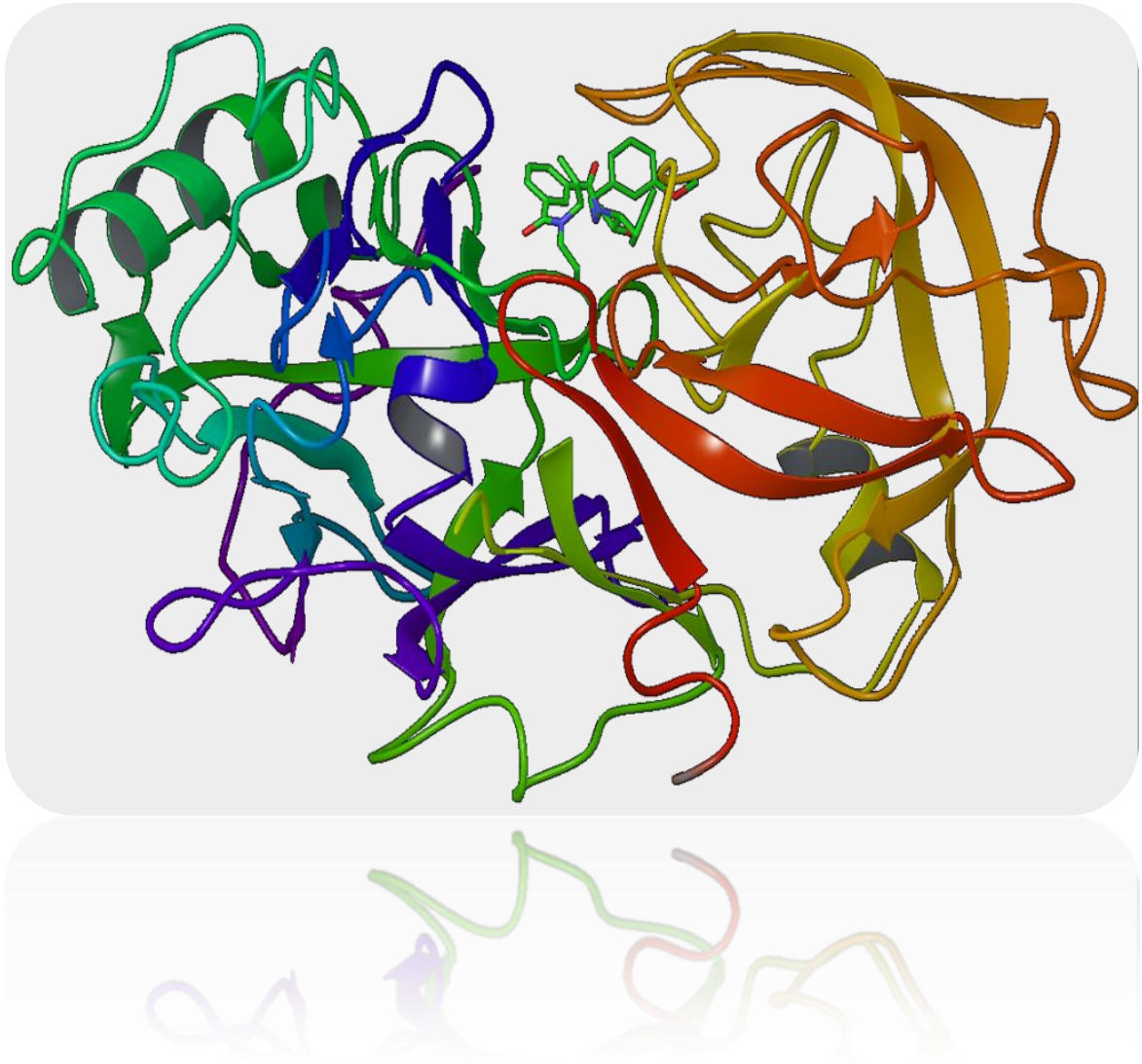
μονοαμινοξειδάση (MAO) μεταβολίζει τη ντοπαμίνη, γι αυτό το λόγο το ένζυμο αυτό αποτελεί θεραπευτικό στόχο για τη νόσο Parkinson.

Μελέτες υποστηρίζουν την ανασταλτική δράση των κουμαρινών έναντι της MAO-B. Γι αυτό το λόγο επιλέχθηκε μία σειρά νέων συνθετικών κουμαρινικών παραγώγων με σκοπό την εφαρμογή υπολογιστικών προγραμμάτων και την *in vitro* μελέτη της ανασταλτικής τους δράσης έναντι της MAO-B.

Ένα πεδίο έντονης ερευνητικής δραστηριότητας στη Φαρμακευτική Χημεία είναι η σύνθεση μορίων τα οποία δρουν σε πολλαπλούς στόχους. Σκοπός ήταν η διερεύνηση της πιθανής ανασταλτικής δράσης του BV6, ανταγωνιστή του AT1, κατά του ενζύμου BACE-1 με μεθόδους μοριακής πρόσδεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER

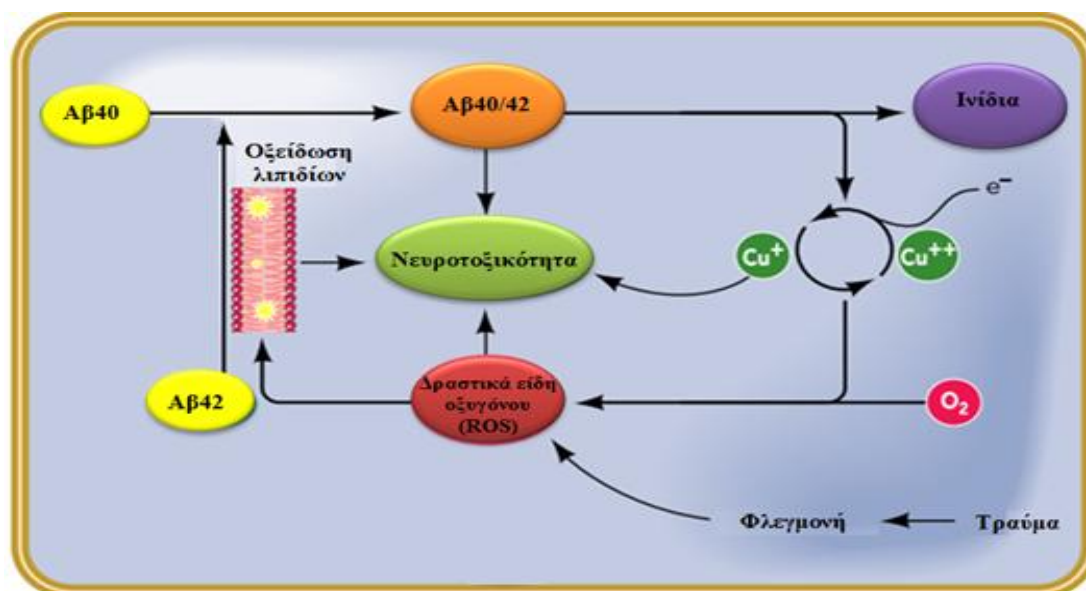


6.1 Εισαγωγή

Σχέση νόσου Alzheimer και οξειδωτικού στρες

Ερευνητικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι οξειδωτικές βλάβες όπως η οξείδωση των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, του DNA, η γλυκοξείδωση καθώς και η φλεγμονή, είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την ανάπτυξη της νόσου Alzheimer.³⁸

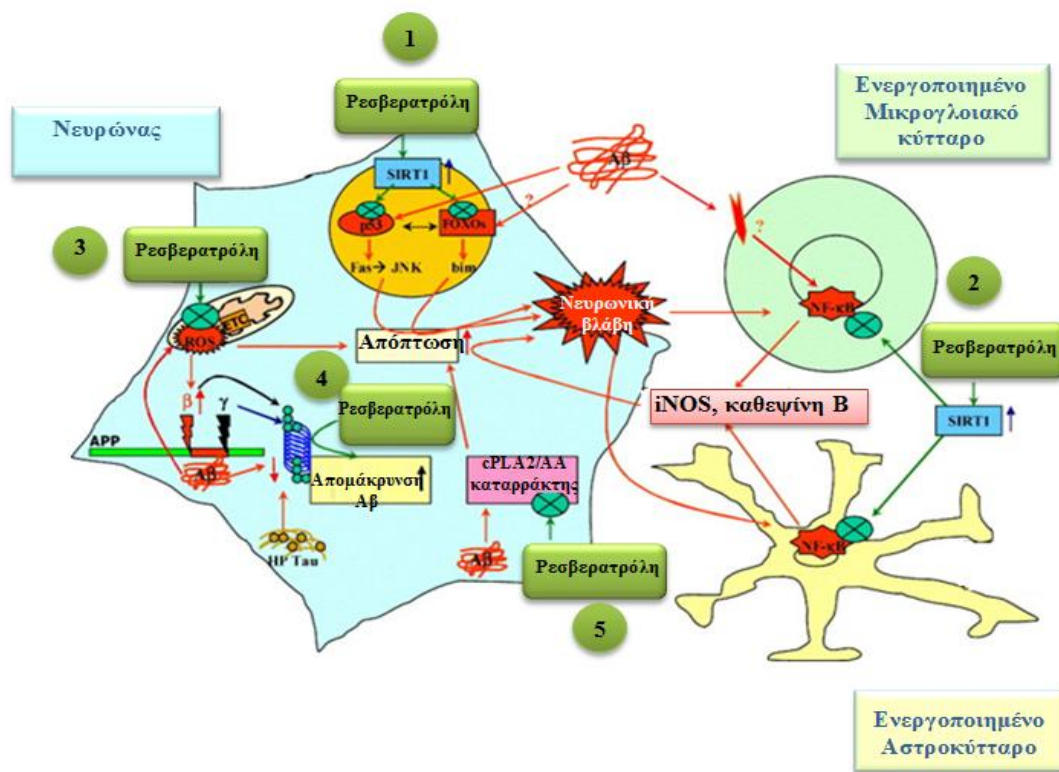
Στο Σχήμα 50 παριστάνονται οι μηχανισμοί της οξείδωσης των λιπιδίων και της φλεγμονής που εμπλέκονται στην παθογένεια της νόσου. Τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων τροποποιούν τρεις ιστιδίνες του πεπτιδίου Αβ42, αυξάνοντας τη συγγένειά του με τη μεμβράνη και επιταχύνουν τη μετατροπή του Αβ40 σε ολιγομερή και ινίδια. Οι ολιγομερείς αυτές πρωτεΐνες Αβ ανάγουν δισθενή ιόντα χαλκού και απελευθερώνουν ηλεκτρόνια. Ιδιαίτερα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) μπορούν να παραχθούν από τα ηλεκτρόνια αυτά του χαλκού σε αντίδραση τους με το οξυγόνο ή με υποπροϊόντα φλεγμονής. Άλλα μεταλλοϊόντα που εμπλέκονται στο μηχανισμό είναι ο ψευδάργυρος και ο σίδηρος.³⁹



Σχήμα 50: Σχηματική παράσταση των μηχανισμών της οξείδωσης των λιπιδίων και της φλεγμονής στην παθογένεια της νόσου Alzheimer

Ο κεντρικός ρόλος των ελευθέρων ριζών στην εμφάνιση της ΝΑ ώθησε τους επιστήμονες στην ανακάλυψη αντιοξειδωτικών φαρμάκων μελετώντας φυσικά αντιοξειδωτικά μέσω διατροφής όπως: βατόμουρα (*Vaccinium angustifolium*), μούρα (genus: *Artocarpus*), φράουλες (*Arbutus unedo*), ρόδια (*Punica granatum*), σταφύλια (Grape seed extract) κ.α.^{21,40,41}

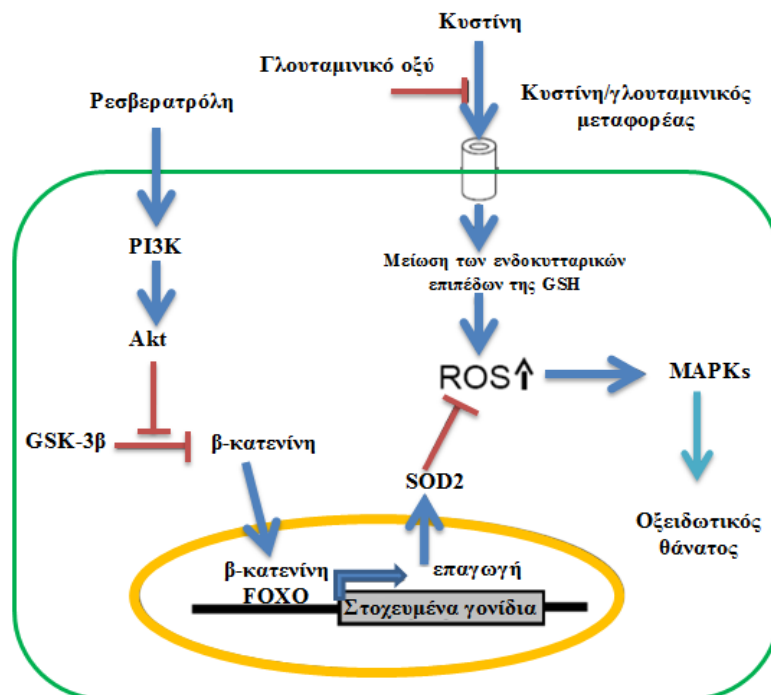
Οι μελέτες αποκάλυψαν ότι η ρεσβερατρόλη (3,5,4'-*trans*-τριυδροξυστιλβένιο), μία πολυφαινόλη που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, κυρίως στη φλούδα των σταφυλιών και ιδιαίτερα των κόκκινων, στα φύλλα ευκαλύπτου και ελάτου, στους ξηρούς καρπούς, στα μούρα και σε μικρότερες ποσότητες σε 70 ακόμη φυτικά προϊόντα, έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Στο Σχήμα 51 παριστάνεται ο μοριακός μηχανισμός της νευροπροστατευτικής δράσης της ρεσβερατρόλης στη ΝΑ.



Σχήμα 51: Μοριακός μηχανισμός της νευροπροστατευτικής δράσης της ρεσβερατρόλης στη νόσο του Alzheimer

(1) Η ρεσβερατρόλη ενεργοποιεί τη σιρτουΐνη (SIRT1), απαकुλιώνει και καταστέλλει τη δραστηριότητα του p53 που προωθείται από το πεπτιδίιο Αβ στους νευρώνες και προλαμβάνει τον αποπτωτικό θάνατο των νευρώνων.

Επιπλέον, η SIRT1 καταστέλλει αποπτωτικά δραστηριότητες των FOXO (Forkhead box O) πρωτεϊνών. **(2)** Η ρεσβερατρόλη αναστέλλει τον μεταγραφικό παράγοντα NFκB και στη συνέχεια καταστέλλει τη συνθάση του οξειδίου του αζώτου (iNOS) και την καθεψίνη Β, τους δύο τοξικούς παράγοντες που μεσολαβούν στο νευροεκφυλισμό σε μικρογλοιακά κύτταρα και αστροκύτταρα. **(3)** Η ρεσβερατρόλη λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό και εμποδίζει τα δραστικά είδη οξυγόνου που επάγονται από την παραγωγή του Αβ και την ακόλουθη απόπτωση των κυττάρων. **(4)** Η ρεσβερατρόλη ρυθμίζει το σύστημα ουβικιτίνης του πρωτεασώματος μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού και επιταχύνει την αποικοδόμηση του Αβ. **(5)** Η ρεσβερατρόλη εμποδίζει το σχηματισμό του οξειδίου του αζώτου που προκαλεί τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος και της φωσφολιπάσης A2 στο κυτταρόπλασμα και αποτρέπει τον αποπτωτικό θάνατο των νευρώνων.⁴² Ένας ακόμη μηχανισμός της ρεσβερατρόλης ενάντια στον οξειδωτικό θάνατο των νευρικών κυττάρων παριστάνεται στο Σχήμα 52.

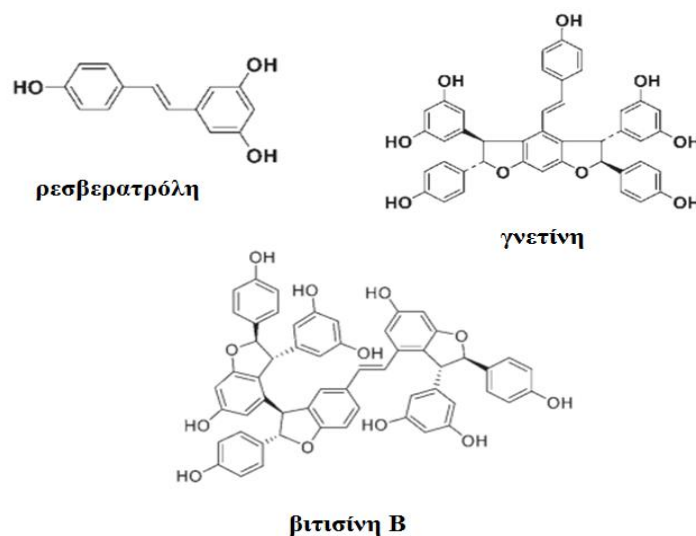


Σχήμα 52: Μηχανισμός της νευροπροστατευτικής δράσης της ρεσβερατρόλης ενάντια στον οξειδωτικό θάνατο των κυττάρων HT22 που επάγεται από το γλουταμινικό οξύ

Σε κύτταρα HT22 του ιππόκαμπου έχει αποδειχθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις του εξωκυτταρικού γλουταμινικού οξέος επάγουν οξειδωτικό στρες ως αποτέλεσμα της αναστολής εισόδου της κυστίνης στα κύτταρα HT22 και κατά συνέπεια της μείωσης των επιπέδων της αντιοξειδωτικής ένωσης γλουταθειόνης με επακόλουθη την αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου. Η ρεσβερατρόλη ενεργοποιεί το σηματοδότη PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) /Akt και ο ενεργοποιημένος Akt (γνωστός ως PKB: protein kinase B) στη συνέχεια αδρανοποιεί την GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase-3) και σταθεροποιεί τη β-κατενίνη. Η σταθεροποιημένη β-κατενίνη μετακινείται στον πυρήνα, προσδένεται στο μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας TCF (Transcriptor Factor) ή FOXO και επάγει στοχευμένα γονίδια όπως την υπεροξειδική δισμουτάση SOD2 (superoxide dismutase 2) που αναστέλλει τη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).⁴³

Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα η ρεσβερατρόλη βρίσκεται στην κλινική Φάση III της ανάπτυξης φαρμάκων κατά της ΝΑ ως ενεργοποιητής της σιρτουίνης.⁴⁴

Η ρεσβερατρόλη και ανάλογά της, που απομονώθηκαν από τα φυτά *Vitis vinifera*⁴⁵ και *Paeonia lactiflora*,⁴⁶ δοκιμάστηκαν ως αναστολείς της *in vitro* BACE-1 από τον Choi και τους συνεργάτες του. Η ρεσβερατρόλη εμφάνισε ανασταλτική δράση: $IC_{50}=11,90 \mu M$, ενώ τα πιο δραστικά γνετίνη και βιτισίνη Β εμφάνισαν $IC_{50}=0,34 \mu M$ και $IC_{50}=0,4 \mu M$, αντίστοιχα (Σχήμα 53).



Σχήμα 53: Χημικές δομές της ρεσβερατρόλης, γνετίνης και βιτισίνης Β

Με βάση τα δεδομένα αυτά της βιβλιογραφίας μελετήθηκε μία σειρά συνθετικών παραγώγων της ρεσβερατρόλης. Αρχικά μελετήθηκαν οι μεταβολές που προκαλούν οι ενώσεις αυτές στις διπλοστιβάδες διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης με τη βοήθεια της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης και της Μοριακής Δυναμικής. Ακολούθησαν μελέτες πρόβλεψης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των μορίων και της πρόσδεσής τους στη BACE-1 καθώς και βιολογικά πειράματα *in vitro* για την αποτίμηση της βιολογικής τους δράσης. Επίσης, αντικείμενο ίδιων μελετών αποτέλεσε και μία σειρά αντιοξειδωτικών παραγώγων της υδραζόνης.

6.2 Μελέτες Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης αναλόγων της ρεσβερατρόλης και αλληλεπίδρασή τους με τις διπλοστιβάδες διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης

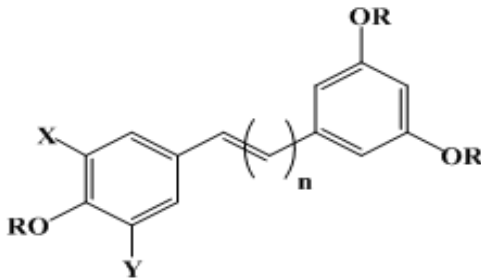
Το ερευνητικό ενδιαφέρον εστιάστηκε σε μία σειρά 14 νέων παραγώγων της ρεσβερατρόλης (Πίνακας 1), που συντέθηκαν στο Τμήμα Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.^{47,48} Για τις ανάγκες της μελέτης αξιοποιήθηκαν και αξιολογήθηκαν αποτελέσματα της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (**Differential Scanning Calorimetry**) με σκοπό να μελετηθούν οι θερμικές μεταβολές που προκαλούν οι ενώσεις αυτές στις διπλοστιβάδες διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης (DPPC).

Για την τεχνική DSC είχε χρησιμοποιηθεί θερμιδόμετρο DSC-7 της εταιρίας Perkin Elmer και τα θερμογραφήματα μελετήθηκαν σε τέσσερις συγκεντρώσεις για κάθε δείγμα.⁴⁹

Στο Σχήμα 54 παρατίθενται τα θερμογραφήματα των υπό μελέτη ενώσεων. Τα αποτελέσματα μερικών από αυτά συμφωνούν με αυτά που πραγματοποιήθηκαν σε διπλοστιβάδες διμυριστικής φωσφατιδυλοχολίνης (DMPC) σε προηγούμενες μελέτες.⁵⁰ Από τα θερμογραφήματα της ρεσβερατρόλης και της μεθοξυρεσβερατρόλης διαφαίνεται ότι: η παρουσία της ρεσβερατρόλης (1) σε μικρή συγκέντρωση ($\chi=0,01$) εξαλείφει την καμπύλη

προμετάβασης φάσης, ενώ η μεθοξυρεσβερατρόλη (**2**) προκαλεί ελάττωση της έντασης σε μικρότερο βαθμό.

Πίνακας 1: Χημικές δομές των υπό μελέτη παραγώγων της ρεσβερατρόλης



Ένωση	R	X	Y	n
1	H	H	H	1
2	CH ₃	H	H	1
3	H	t-Bu	H	1
4	CH ₃	t-Bu	H	1
5	H	CH(Et) ₂	H	1
6	CH ₃	CH(Et) ₂	H	1
7	H	H	H	2
8	CH ₃	H	H	2
9	H	t-Bu	H	2
10	CH ₃	t-Bu	H	2
11	H	CH(Et) ₂	H	2
12	CH ₃	CH(Et) ₂	H	2
13	H	CH(Et) ₂	CH(Et) ₂	1
14	H	CH(Et) ₂	CH(Et) ₂	2

Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και οι δύο ενώσεις προκαλούν ελάττωση της θερμοκρασίας προσχηματισμού, ελάττωση της θερμοκρασίας μετασχηματισμού και σημαντική διαπλάτυση της κύριας φάσης μετασχηματισμού.

Το επόμενο ζεύγος των αναλόγων **3** και **4** αποτελούνται από μια t-Bu ομάδα σε ορθο-θέση με την υδροξυλομάδα και την μεθοξυλομάδα των ενώσεων. Σε

συγκέντρωση $\chi=0,01$ το υδροξυλιωμένο ανάλογο εξαλείφει την καμπύλη προμετάβασης φάσης, ενώ το μεθυλιωμένο ανάλογο επιδρά σε αυτή σε σημαντικότερο βαθμό διευρύνοντάς την. Στην ίδια συγκέντρωση και οι δύο ενώσεις επιδρούν στο εύρος της φάσης προσχηματισμού σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις ενώσεις **1** και **2**. Σε συγκέντρωση $\chi \geq 0,10$ (μερική αναλογία 1:99 βιοδραστική ουσία: διπαλμιτική φωσφατιδυλοχολίνη) το υδροξυλιωμένο παράγωγο παρουσιάζει διαχωρισμό φάσεων καθώς παρατηρούνται δύο κορυφές. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση το υδροξυλιωμένο ανάλογο προκαλεί μεγαλύτερη ελάττωση της φάσης μετασχηματισμού και σε συγκεντρώσεις $\chi \geq 0,10$ μικρότερη διαπλάτυνση σε σχέση με τα μεθυλιωμένα παράγωγα. Το φαινόμενο αυτό είναι εντονότερο σε σχέση με τις ενώσεις **1** και **2**. Αυτό οφείλεται στις ογκώδεις ομάδες t-Bu που υπάρχουν στον αρωματικό δακτύλιο A. Ο ογκώδης αυτός υποκαταστάτης είναι δυνατόν να εξαναγκάζει το δακτύλιο που φέρει τη μία φαινολική υδροξυλομάδα να απομακρυνθεί από την πολική περιοχή, ενώ η ομάδα t-Bu παρουσιάζει περισσότερη συγγένεια στο υδρόφοβο τμήμα της λιπιδικής διπλοστιβάδας και αυτό προκαλεί το διαχωρισμό των φάσεων.

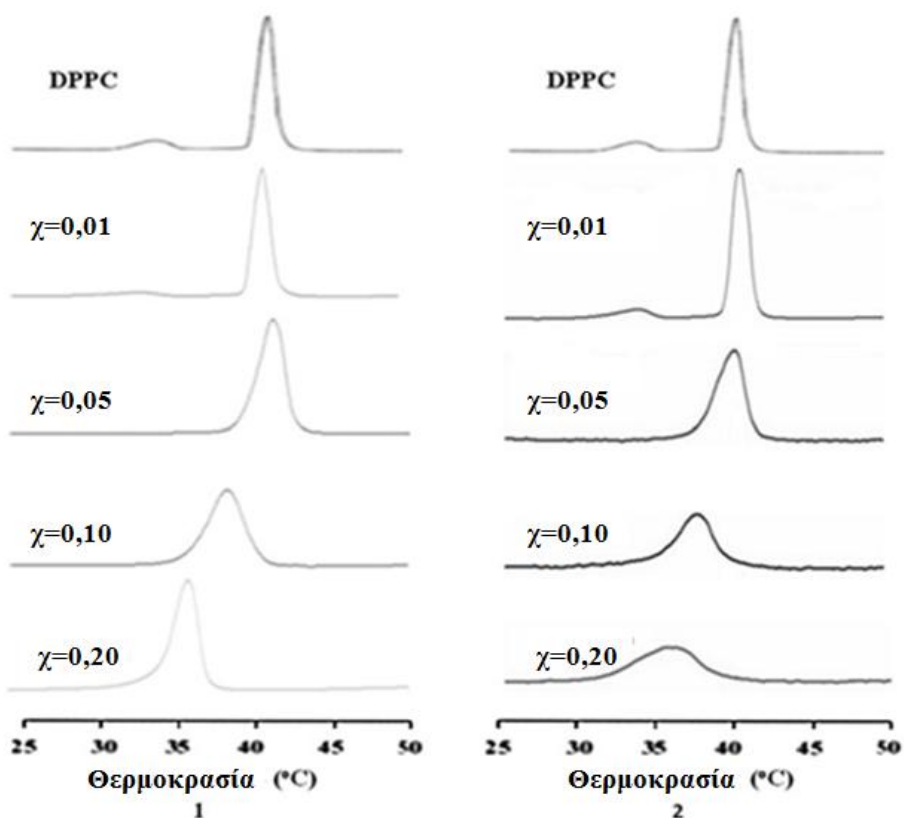
Στο τρίτο ζεύγος αναλόγων **5** και **6** η ομάδα t-Bu αντικαθίσταται από την 1-αιθυλο-πρόπυλο ομάδα. Τα θερμογράμματά τους είναι ανάλογα με αυτά των ενώσεων **3** και **4**. Παρόλο αυτά, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση $\chi=0,20$.

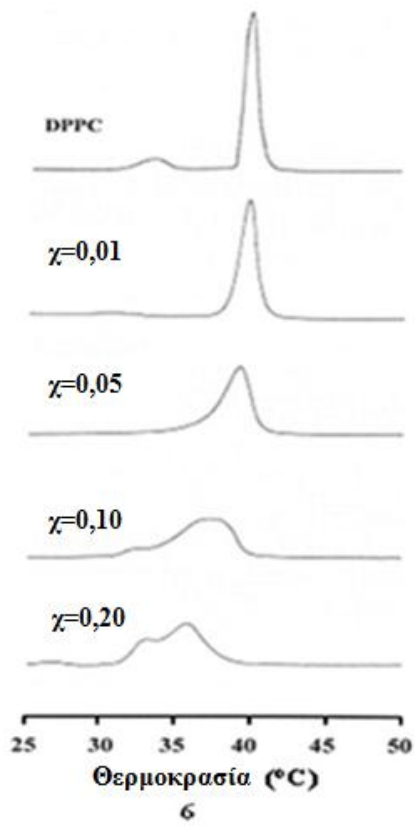
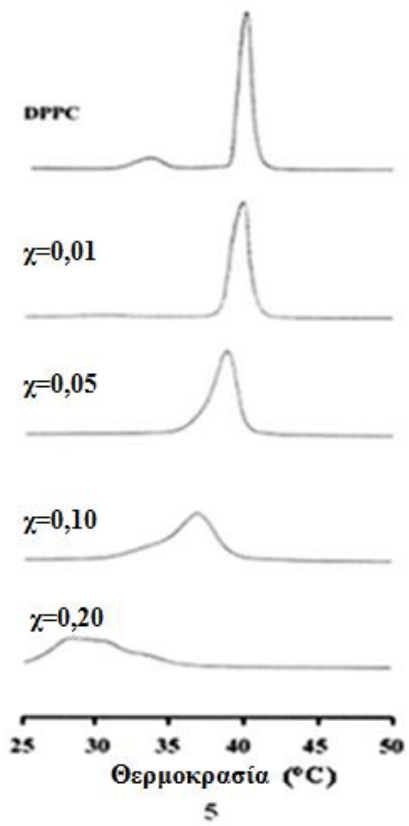
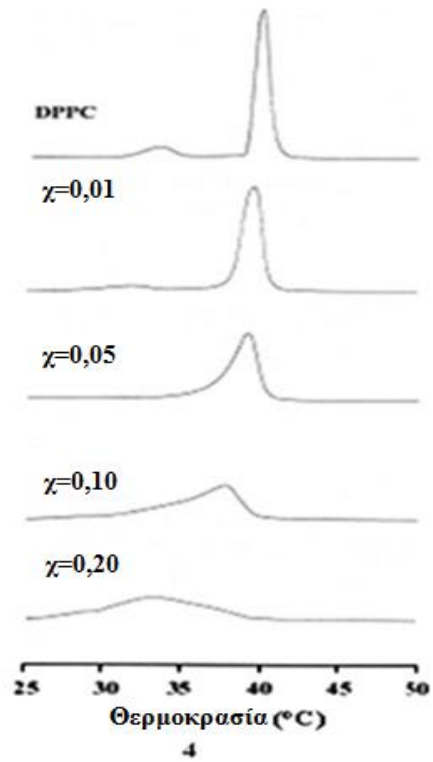
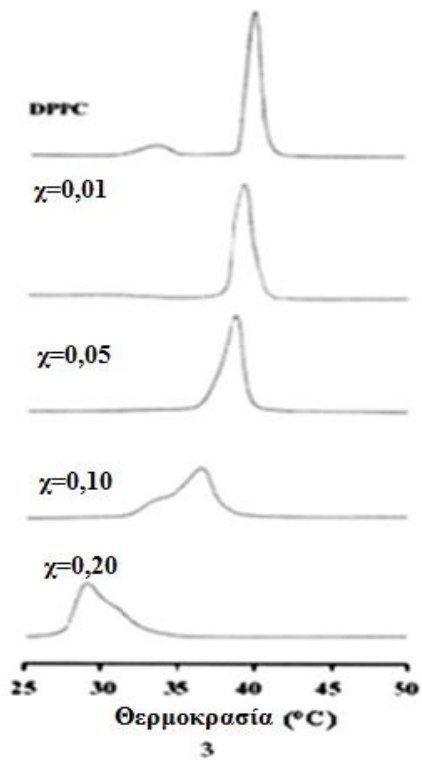
Οι δομές των ενώσεων **7** και **8** είναι παρόμοιες με αυτές των ενώσεων **1** και **2** με τη διαφορά ότι φέρουν έναν επιπλέον ολεφινικό δεσμό μεταξύ των φαινολικών δακτυλίων. Τα θερμογραφήματά τους δείχνουν ότι η παρουσία του δεν επηρεάζει σημαντικά τις καμπύλες.

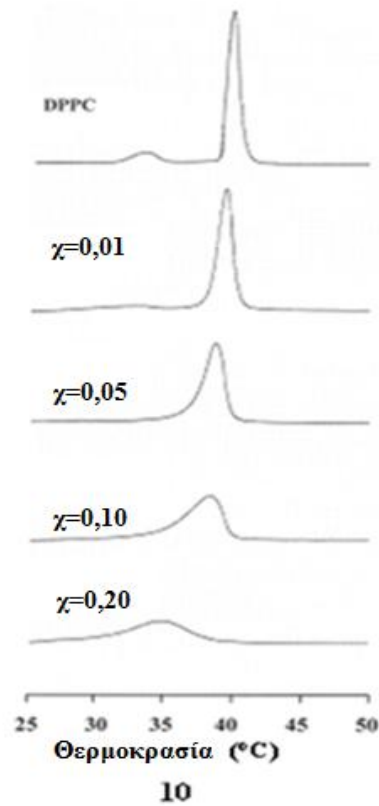
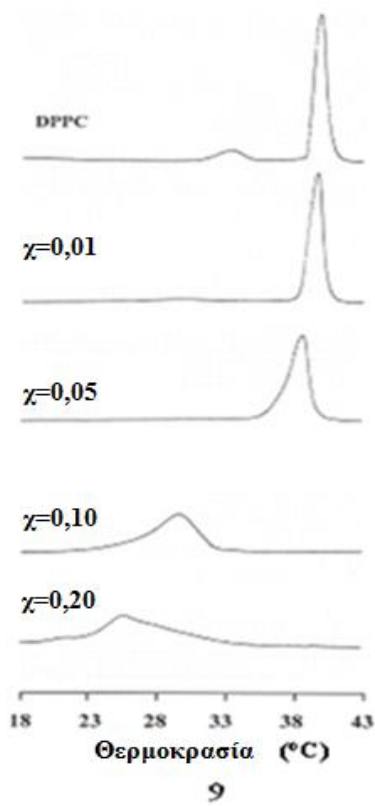
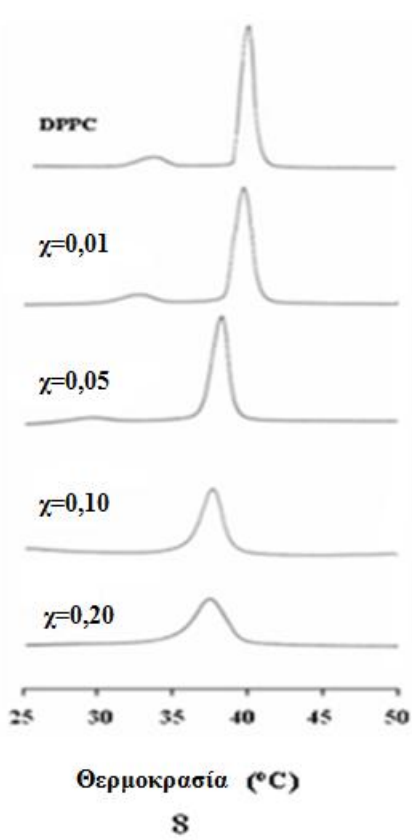
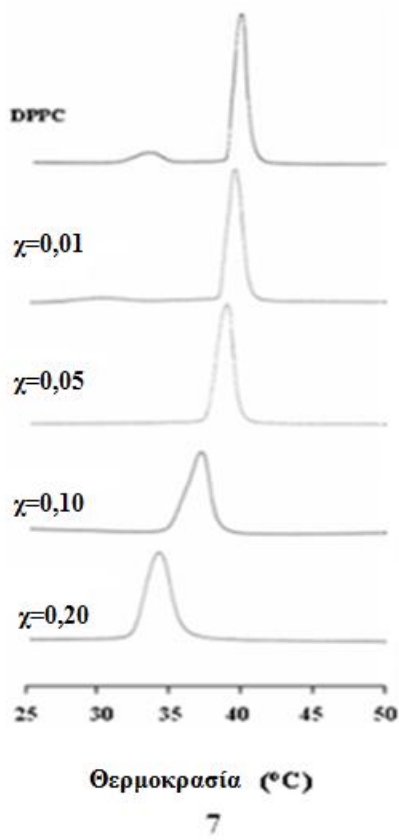
Οι ενώσεις **9** και **10** φέρουν δύο ολεφινικούς δεσμούς μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων. Τα θερμογραφήματα και πάλι δείχνουν την ίδια εικόνα υποδηλώνοντας για άλλη μια φορά την μη επίδραση των επιπλέον διπλών δεσμών.

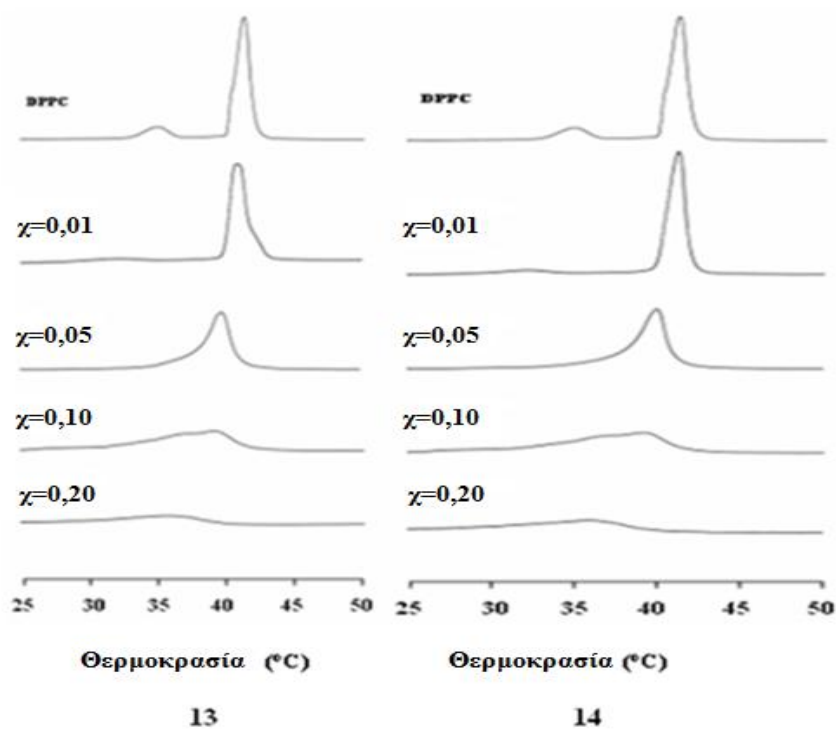
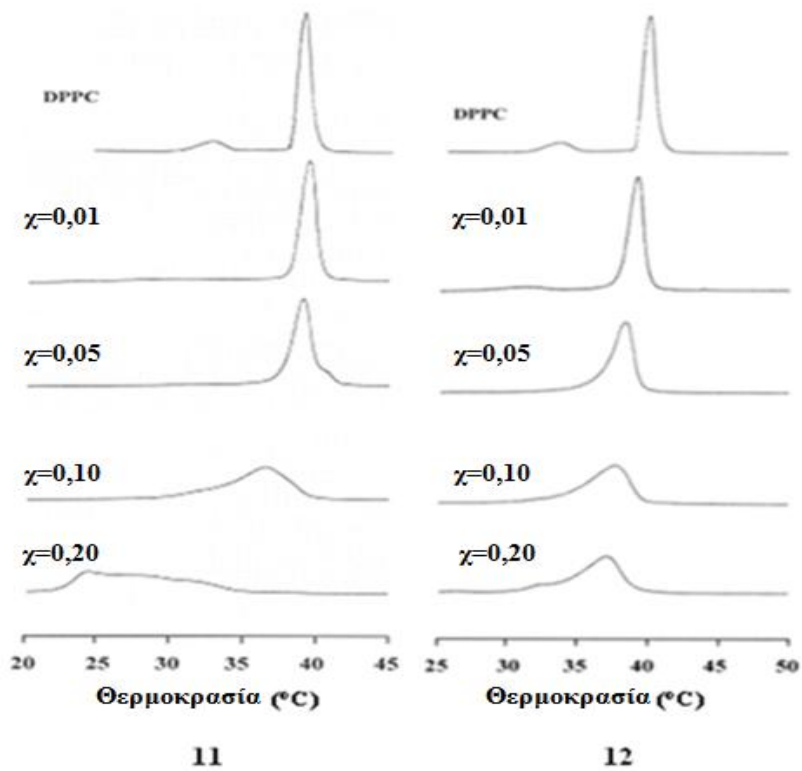
Στα ίδια συμπεράσματα καταλήγουμε και για τις ενώσεις **11** και **12**, οι οποίες διαφέρουν από τις ενώσεις **5** και **6** στον αριθμό των διπλών δεσμών. Οι ομοιότητες με το ζεύγος **9** και **10** είναι έκδηλες. Αυτό σημαίνει ότι αυξάνοντας

τον αριθμό των διπλών δεσμών και αντικαθιστώντας την $-CHEt_2$ με την $t-Bu$ δεν επηρεάζονται σημαντικά οι θερμικές ιδιότητες των λιπιδικών μεμβρανών. Το ζεύγος **13** και **14** διαφέρει από τις ενώσεις **5** και **12** στην ύπαρξη μίας ακόμη 1- αιθυλο-πρότυλο ομάδας στην -ορθο θέση σε σχέση με την υδροξυλομάδα. Η παρουσία ενός επιπλέον ογκώδη υποκατάστατη προκαλεί μία ακόμη πιο σημαντική διαπλάτυση της φάσης μετασχηματισμού. Αυτή η διαπλάτυση είναι πιο έντονη σε συγκεντρώσεις $\chi \geq 0,10$.





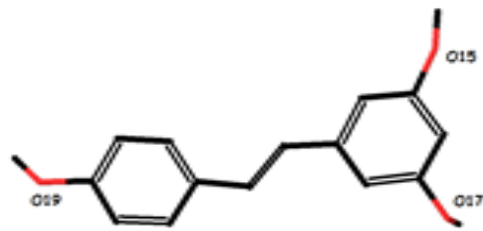




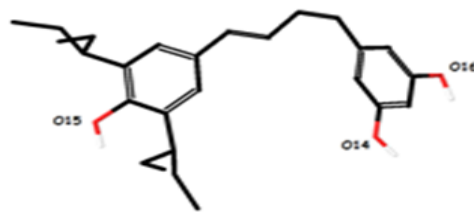
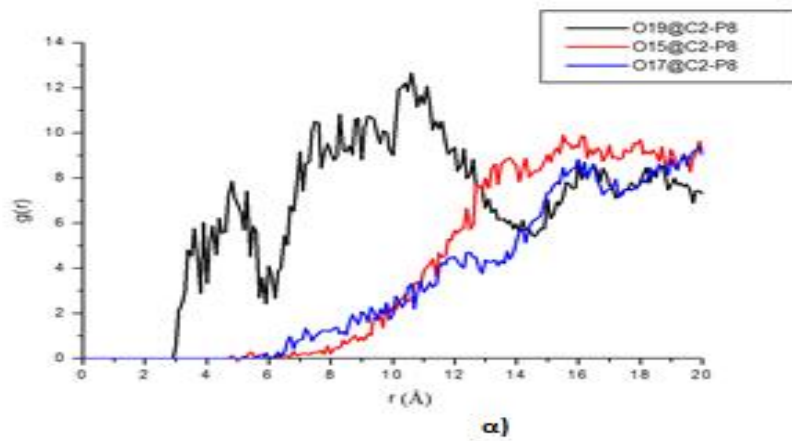
Σχήμα 54: Θερμογραφήματα στα οποία εμφάνονται οι θερμικές μεταβολές που προκαλούν στις διπλοστιβάδες του DPPC η παρουσία στυλβενοειδών παραγώγων 1-

Μελέτες της βιβλιογραφίας^{51,52,53} έχουν δείξει ότι η αλλαγή στις φάσεις μετασχηματισμών μίας μεμβράνης είναι αποτέλεσμα της διαμόρφωσης που λαμβάνει το μόριο εντός των λιπιδικών διπλοστιβάδων, του προσανατολισμού των πολικών και υδροφοβών τμημάτων του και της τοπογραφίας του μορίου. Για την ανίχνευση του προσανατολισμού των ενώσεων στις διπλοστιβάδες DPPC χρησιμοποιήθηκε η Μοριακή Δυναμική. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν δύο ενώσεις: η μεθυλιωμένη ρεσβερατρόλη (**2**) και η ένωση **14** που φέρει δύο διπλούς δεσμούς και την ομάδα $-CHEt_2$ στις θέσεις X και Y. Τα μόρια τοποθετήθηκαν αρχικά στην ίδια θέση και με τον ίδιο προσανατολισμό στη μεμβράνη DPPC. Στο Σχήμα 55 φαίνεται η κατανομή κατά τον άξονα z της μεμβράνης (Radial Distribution Function, RDF) μεταξύ των οξυγόνων των μορίων και των ατόμων της φωσφοχολίνης. Η ένωση **14** εντοπίζεται στη γειτνίαση των πολικών κεφαλών των λιπιδίων (~ 5 Å), ενώ η ένωση **2** είναι απομακρυσμένη από αυτή την περιοχή. Οι δύο υδροξυλομάδες (O14 και O16) της ένωσης **14** δεν εμποδίζονται από τις αλκυλομάδες της ένωσης και επομένως αυτό το τμήμα του μορίου πλησιάζει τις πολικές κεφαλές των λιπιδίων. Στο γράφημα της ένωσης **2** δεν παρατηρούνται οξείες κορυφές. Το O19 βρίσκεται πλησιέστερα στις πολικές κεφαλές σε σχέση με το O15 και O17.

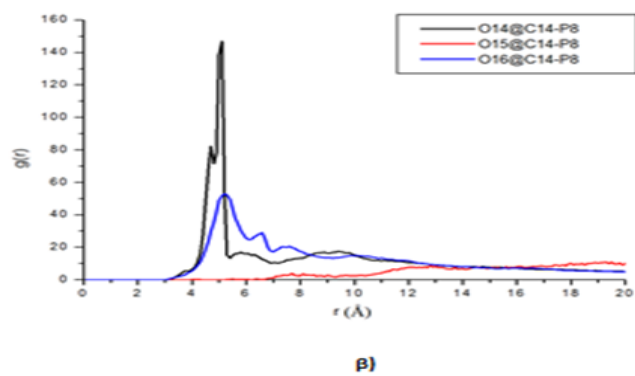
Τα αποτελέσματα της Μοριακής Δυναμικής υποδηλώνουν ότι ενώσεις που έχουν φαινολικές υδροξυλομάδες προσανατολίζονται στις λιπιδικές μεμβράνες με τον άξονα τους παράλληλα στο επίπεδο της μεμβράνης και με τέτοιο τρόπο ώστε οι περισσότερες υδροξυλομάδες να βρίσκονται στην πολική περιοχή. Αντίθετα, τα ανάλογα με τις μεθύξυ ομάδες προσανατολίζονται με τον άξονα τους κάθετα στο επίπεδο των λιπιδικών μεμβρανών. Ο ίδιος προσανατολισμός έχει παρατηρηθεί και σε ανάλογα κανναβινοειδών.



2



14



Σχήμα 55: Κατανομή κατά τον z άξονα της μεμβράνης α) των οξυγόνων (O15, O17 και O19) της ένωσης 2, β) των οξυγόνων (O14, O15 και O16) της ένωσης 14 και των φωσφόρων (P8) των λιπιδίων

Τα αποτελέσματα της Μοριακής Δυναμικής εξηγούν το γεγονός ότι τα υδροξυλιωμένα παράγωγα παρουσιάζουν μεγαλύτερες αλληλεπιδράσεις στην φάση προ-μετασχηματισμού σε σύγκριση με τα μεθυλιωμένα γιατί τοποθετούνται στην πολική περιοχή. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε μεγαλύτερο βαθμό σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτός ο διαφορετικός τοπογραφικός εντοπισμός τους μπορεί να σχετίζεται και με τη διαφορετική αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Ένα μόριο θα πρέπει να εντοπίζεται και προσανατολίζεται κατάλληλα στις λιπιδικές διπλοστιβάδες ώστε να παρεμποδίζει την οξειδωση λιπαρών εστέρων που φέρουν διπλούς δεσμούς. Συμπερασματικά, η τεχνική της Διαφορικής Θερμιδομετρίας και της Μοριακής Δυναμικής **α)** επεξηγούν τις διαφορές μεταξύ των μορίων που περιέχουν φαινορικά υδροξύλια συγκριτικά με τις αντίστοιχες που είναι μεθυλιωμένα και **β)** υποδεικνύουν ότι κάθε ένωση έχει το δακτυλικό της αποτύπωμα όταν επιδρά στις λιπιδικές διπλοστιβάδες Αυτό μπορεί να καθορίζει και το ιδιαίτερο φαρμακολογικό προφίλ κάθε ένωσης.

6.3 Υπολογιστικές μελέτες στη BACE-1

Οι ενώσεις που μελετήθηκαν ως προς την πρόσδεσή τους στην BACE-1 και *in silico* φαρμακοκινητική ικανότητα περιλαμβάνει 11 παράγωγα της ρεσβερατρόλης που παρατέθηκαν στον Πίνακα 1 και συγκεκριμένα οι ενώσεις **1-6, 8,10,** και **12-14** καθώς και 11 γλυοξυλοϋλο-αροϋλο παράγωγα της υδραζόνης (Πίνακας 2) που συντέθηκαν στο Τμήμα Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.^{54, 55}

Πίνακας 2: Χημικές δομές των γλυοξυλο-αροϋλο παραγώγων της υδραζόνης

	Ένωση		Ένωση
1		7	
2		8	
3		9	
4		10	
5			
6		11	

6.3.1 *In silico* φαρμακοκινητικές μελέτες

A. Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού

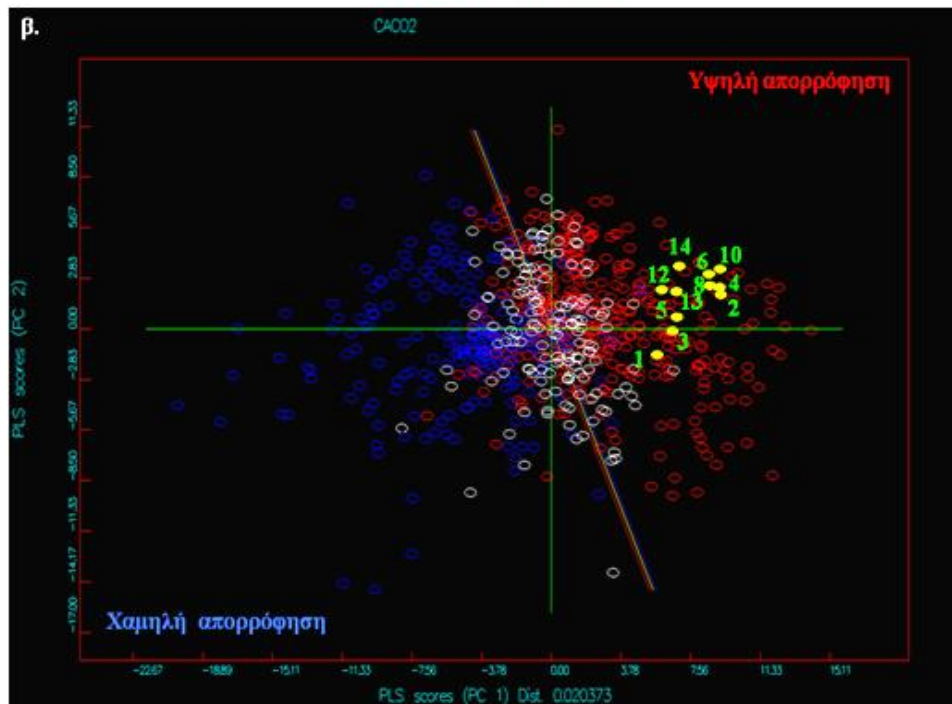
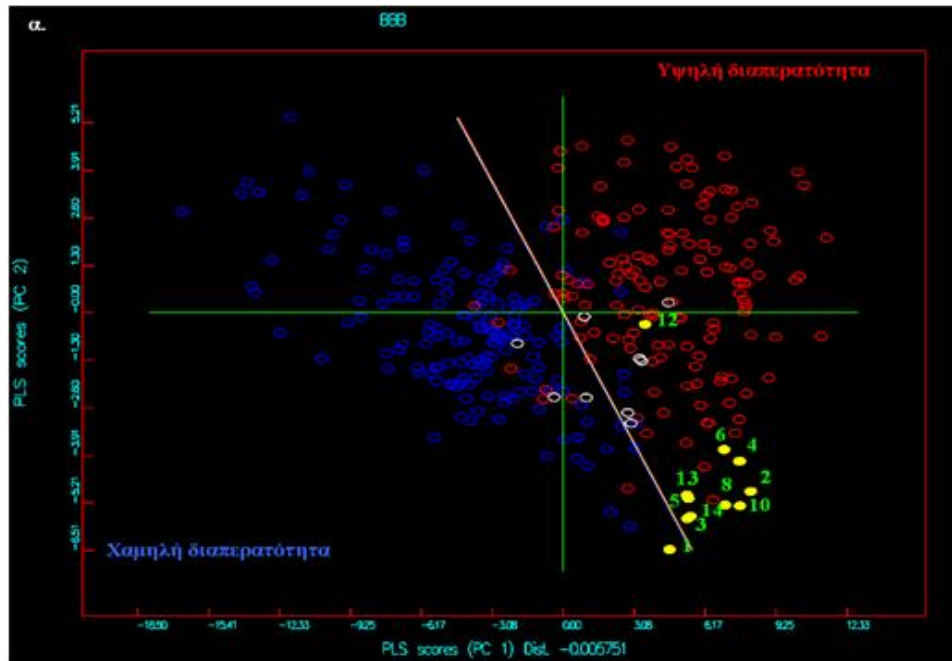
Διερευνήθηκε αρχικά η διαπερατότητά των ενώσεων αυτών από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB, Blood Brain Barrier) μέσω του λογισμικού VolSurf^{56,57} το οποίο κάνει χρήση στατιστικού μοντέλου BBB.

Το μοντέλο αυτό προέκυψε από την ανάλυση PLS (Partial Least Squares) σε 313 ενώσεις (δεδομένα βιβλιογραφίας ή ομάδων συνεργασίας) και 94 παραμέτρους (ιχνηθέτες: OH2, DRY, O). Η βασική υπόθεση αυτού του μοντέλου είναι η παθητική διάχυση. Τα κόκκινα σημεία αναφέρονται στις διαπερατές ενώσεις (BB score + 1), τα μπλε σημεία στις μη διαπερατές ενώσεις (BB± score 0) και τα λευκά σημεία αντιπροσωπεύουν ενώσεις με μέτρια διείσδυση (BB- score -1).

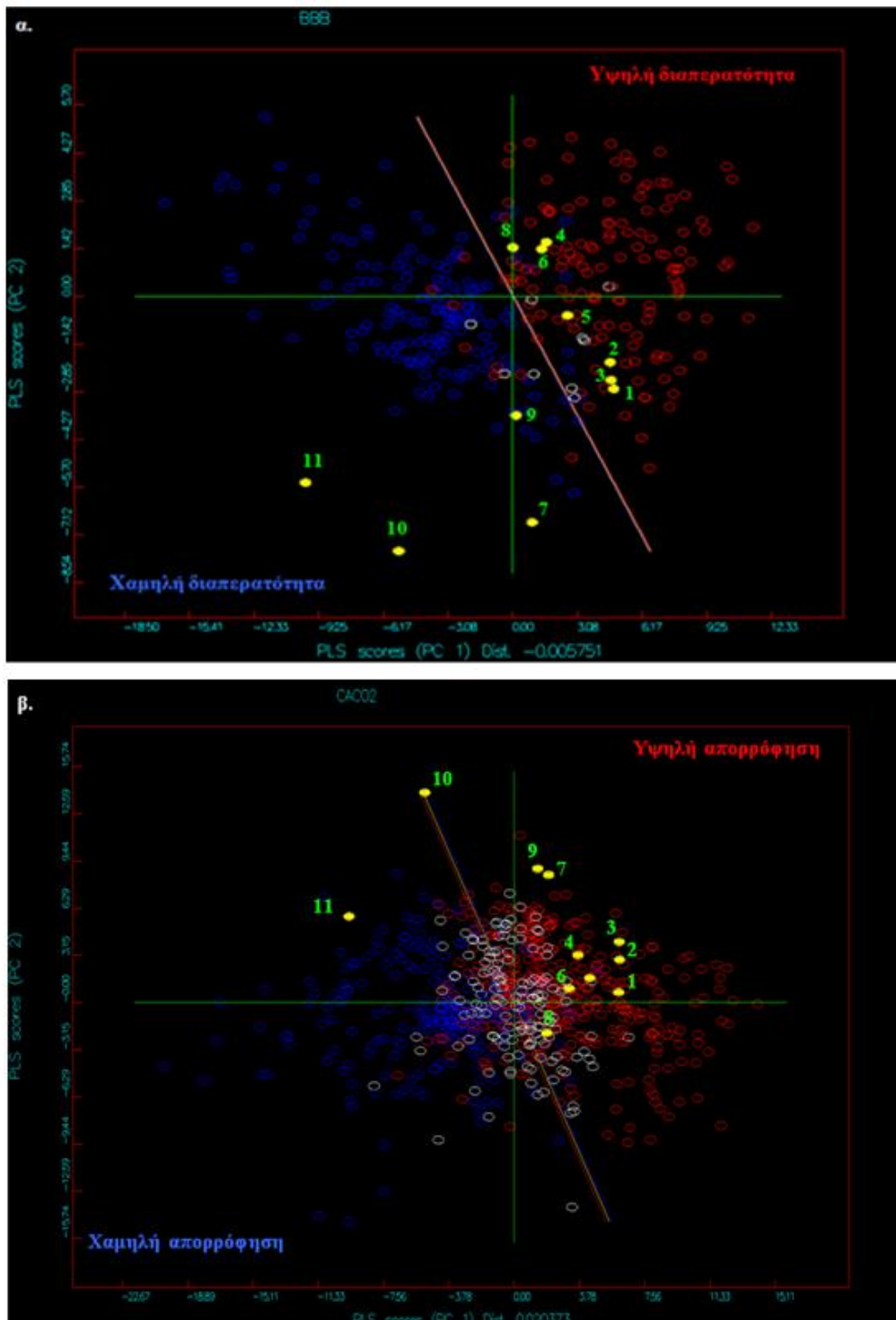
Από την προβολή των παραγώγων της ρεσβερατρόλης (Σχήμα 56) στο μοντέλο BBB προκύπτει ότι όλες οι ενώσεις, εκτός από μία, ανήκουν στην κόκκινη περιοχή, που σημαίνει ότι διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό του αιματοεγκεφάλου. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στην προβολή των γλυοξυλοϋλο-αροϋλο παραγώγων (Σχήμα 57). Εκτός από τέσσερις ενώσεις οι υπόλοιπες βρίσκονται στην περιοχή της υψηλής διαπερατότητας

B. Απορρόφηση από τα επιθηλιακά κύτταρα Caco2

Διερευνήθηκε επίσης η απορρόφηση των ενώσεων από τα κύτταρα του επιθηλίου του εντέρου Caco2 που αποτελούν πρότυπο για την *in vitro* μελέτη της απορρόφησης φαρμάκων από τον άνθρωπο. Στο μοντέλο τα κόκκινα σημεία αναφέρονται στην υψηλή διαπερατότητα ($P_{app} > 8 \cdot 10^{-6}$ cm/s, score +1) και τα μπλε σημεία στη χαμηλή διαπερατότητα ($P_{app} < 4 \cdot 10^{-6}$ cm/s, score -1). Υπάρχει μια περιοχή στη κεντρική περιοχή του μοντέλου, όπου υπάρχουν κόκκινα και μπλε σημεία ($4 \cdot 10^{-6} < P_{app} < 8 \cdot 10^{-6}$ cm/s, score 0). Σε αυτήν την περιοχή η πρόβλεψη της διαπερατότητας θεωρητικά είναι λιγότερο αξιόπιστη. Από την προβολή των ενώσεων στο μοντέλο Caco2 παρατηρείται ότι όλες οι ενώσεις βρίσκονται στην περιοχή της υψηλής απορρόφησης (Σχήμα 56 και Σχήμα 57). Οι δύο αυτές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι εξεταζόμενες ενώσεις ικανοποιούν τα φαρμακοκινητικά κριτήρια για να οδηγηθούν σε περαιτέρω μελέτες εξέτασης της ικανότητας αναστολής της BACE-1.



Σχήμα 56: Προβολή των παραγώγων της ρεσβερατρόλης (κίτρινο) στα μοντέλα του λογισμικού VoISurf: α. αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB) και β. CaCo2

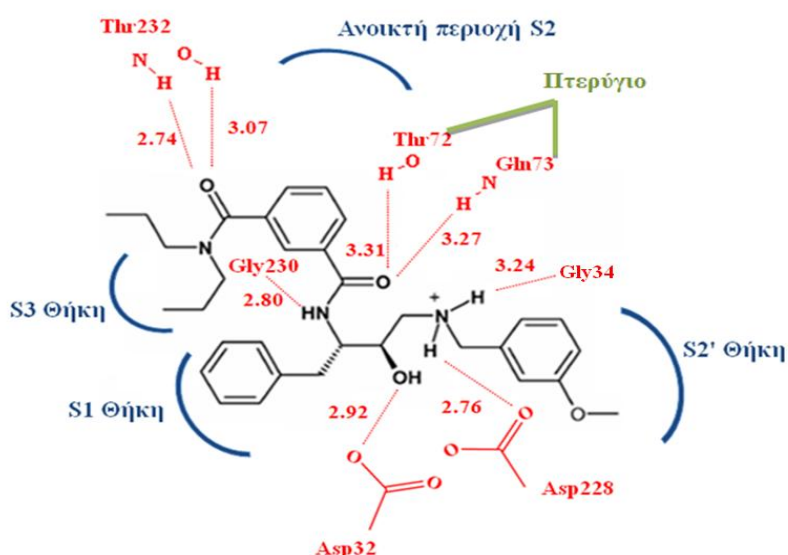


Σχήμα 57: Προβολή των γλυοξυλοϋλο-αρούλο παραγώγων (κίτρινο) στα μοντέλα του λογισμικού VolSurf : α. αιματοεγκεφαλικού φραγμού και β. Caco2

6.3.2 Μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης

Στη συνέχεια ακολούθησαν υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης των δύο ομάδων στο ενεργό κέντρο της BACE-1 με το πρόγραμμα Glue (Molecular Discovery)⁵⁸.

Για τη μελέτη επιλέχθηκε η ανθρώπινη BACE-1 συγκρυσταλλωμένη με το μη πεπτιδικό αναστολέα LO1 (κωδικός πρόσβασης 1W51⁵⁹ στη βάση κρυσταλλογραφικών δεδομένων των πρωτεϊνών RCSB⁶⁰ (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics protein database). Στο Σχήμα 58 παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις του αναστολέα με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Το Asp32 αλληλεπιδρά με την υδροξυλομάδα, το Asp228 και η Gly34 με την αμινομάδα στην περιοχή S2' σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Η Thr72 και η Gln73 σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με την πρώτη καρβονυλομάδα, ενώ η Thr232 με τη δεύτερη καρβονυλομάδα στην περιοχή S2. Επίσης παρατηρείται ακόμη μια αλληλεπίδραση μεταξύ της Gly230 και της ομάδας NH του αμιδικού δεσμού του LO1. Ο διπλός αυτός δεσμός εντοπίζεται χωρικά ανάμεσα στις περιοχές ανάμεσα στις περιοχές S3 και S1.



Σχήμα 58: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του LO1 με το ενεργό κέντρο της BACE-1

Αρχικά εξετάσθηκε η αξιοπιστία του προγράμματος μελετώντας την προσέγγιση του αναστολέα του ενζύμου 1W51 στο ενεργό κέντρο.⁵⁹ Βρέθηκε ότι η τιμή RMSD (Root-Mean Squared Deviation) μεταξύ της κρυσταλλογραφικής δομής και της προσδεμένης που προέκυψε με εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης ήταν 0.57 Å. Οι υπολογισμοί πρόσδεσης έδειξαν ότι όλα τα παράγωγα της ρεσβερατρόλης και ορισμένα από τα γλυοξυλοϋλο-αρούλο παράγωγα προσδένονταν στο ενεργό κέντρο της BACE-1. Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης ήταν ενθαρρυντικά για τη βιολογική αποτίμηση των ενώσεων και για το λόγο αυτό εστάλησαν στην εταιρία Medivir όπου και πραγματοποιήθηκαν βιολογικά πειράματα *in vitro* στη BACE-1. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Παρατηρήθηκε ότι πέντε παράγωγα της ρεσβερατρόλης παρουσίασαν σημαντική ανασταλτική δράση. Συγκεκριμένα οι ενώσεις: **14**, **13**, **3**, **5** και **1** αποδείχθηκαν βιοδραστικές.

Πίνακας 3: Βιολογική αποτίμηση των παραγώγων της ρεσβερατρόλης^α και της υδραζόνης^β

Ένωση ^α	IC ₅₀ (μM) ^α BACE-1	EC ₅₀ (μM) ^α Προστασία από οξειδωτικό θάνατο	Ένωση ^β	(%) at 100 μM ^β BACE-1	EC ₅₀ (μM) ^β Προστασία από οξειδωτικό θάνατο
1	24	4,667	1	0	not determined
2	> 100	>10	2	36	1,57
3	12	0,484	3	86	not determined
4	> 100	>10	4	60	0,40
5	18	0,432	5	31	2,75
6	> 100	>10	6	41	1,87
8	> 100	>10	7	0	4,95
10	> 100	>10	8	0	2,93
12	> 100	>10	9	61	1,08
13	10	0,030	10	55	>10
14	3	0,012	11	21	>10

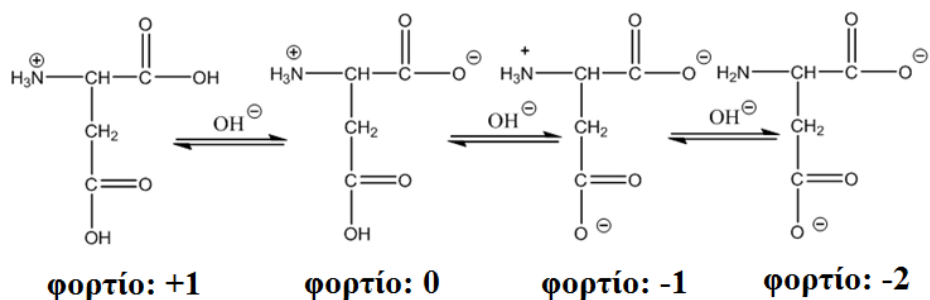
Οι ενώσεις **13** ($IC_{50}=10 \mu M$) και **14** ($IC_{50}=3 \mu M$) που φέρουν ογκώδεις υποκαταστάτες, δότες ηλεκτρονίων σε ορθο-θέση ως προς το φαινολικό OH εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση. Αξίζει να επισημανθεί ότι οι ενώσεις αυτές διαφέρουν μόνο ως προς τον αριθμό των διπλών δεσμών μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων (η **13** φέρει ένα διπλό δεσμό και η **14** δύο διπλούς δεσμούς). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την άποψη, ότι «οι διπλοί δεσμοί μεταξύ δύο αρωματικών που φέρουν φαινολικό OH, συμβάλλουν στην μείωση της Ενθαλπίας Διάσπασης του Δεσμού (Bond Dissociation Energy, BDE), λόγω σχηματισμού σταθερού συζυγιακού συστήματος». Τα υπόλοιπα παράγωγα ήταν μη δραστικά. Τα γλυοξυλο-αροϋλο παράγωγα δεν εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση. Μόνο τρεις ενώσεις: οι **3**, **9** και **4** έδειξαν % δράση στα 100 μM της BACE-1 μεγαλύτερη από 55%.

Στον Πίνακα 3 παρατίθενται τα αποτελέσματα της καταστολής της επαγωγής του θανάτου των κυττάρων HT22 λόγω οξειδωτικού στρες από τη ρεσβερατρόλη και τα παράγωγά της καθώς και των παραγώγων της υδραζόνης. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο βιολογικών δοκιμασιών παρατηρείται ότι και στις δύο σειρές των ενώσεων η ανασταλτική δράση κατά της BACE-1 και η προστασία των ενώσεων αυτών από τον οξειδωτικό θάνατο των κυττάρων HT22 παρουσιάζει τις ίδιες διακυμάνσεις. Τα παράγωγα της ρεσβερατρόλης **13** και **14** παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση καθώς και τη μεγαλύτερη νευροπροστατευτική δράση ($EC_{50}=0,030 \mu M$ και $EC_{50}=0,012 \mu M$, αντίστοιχα). Η εικόνα αυτή παρατηρείται και στα παράγωγα της υδραζόνης. Τα παράγωγα **4** και **9** με τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση έναντι της BACE-1 ($IC_{50}=0,40 \mu M$, $IC_{50}=1,08 \mu M$, αντίστοιχα) εμφάνισαν και τη μεγαλύτερη νευροπροστασία ($EC_{50}=0,40 mM$ και $EC_{50}=1,08 \mu M$, αντίστοιχα). Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η δράση των ενώσεων αυτών είναι πιθανόν να είναι διττή: να δρουν ως αναστολείς της BACE-1 και να προστατεύουν τα νευρικά κύτταρα από τον οξειδωτικό θάνατο.

Στο δεύτερο στάδιο της υπολογιστικής μελέτης πραγματοποιήθηκαν εμπειρισταωμένοι υπολογισμοί πρόσδεσης των ενώσεων στο ενεργό κέντρο της BACE-1 με το πρόγραμμα Glide (Schrodinger)⁶¹, λαμβάνοντας υπόψη την

πρωτονίωση και αποπρωτονίωση των ασπαρτικών αμινοξέων Asp32 και Asp228.

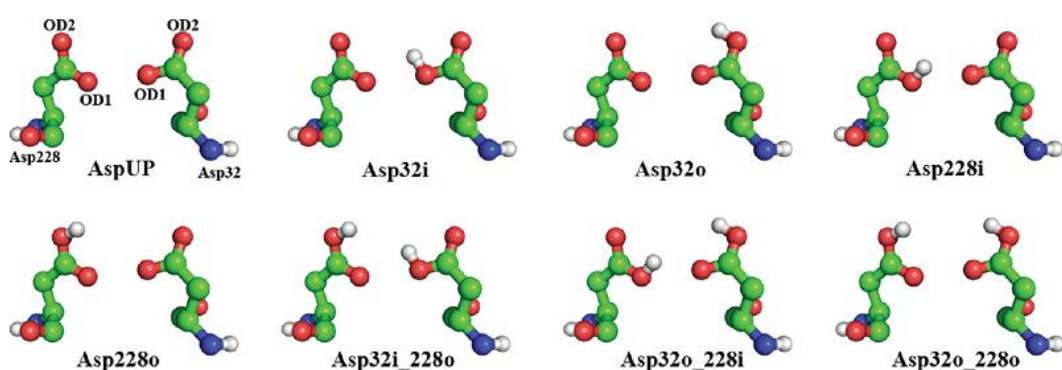
Δεδομένου ότι το ασπαρτικό οξύ μπορεί να υπάρχει σε τέσσερις μορφές οι οποίες φέρουν φορτίο από -2 έως +1, σε διάλυμα ανάλογα με το pH (Σχήμα 59) θεωρητικά η καταλυτική δυάδα Asp32 και Asp228 μπορεί να λάβει 16 μορφές (4^2) στο ενεργό κέντρο ανάλογα με τις βιολογικές συνθήκες.



Σχήμα 59: Μορφές ασπαρτικού οξέος

Οι μορφές αυτές αυξάνονται κατά πολύ αν λάβει κάποιος υπόψη ότι στο μηχανισμό δράσης των ασπαρτικών πρωτεασών, όπως είναι η BACE-1, λαμβάνει μέρος και ένα μόριο νερού. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα έδειξαν όμως ότι από την πληθώρα των δυνατών μορφών που μπορεί να λάβει η καταλυτική δυάδα μόνο οκτώ μορφές είναι πιθανές.⁶²

Οι μορφές αυτές παριστάνονται στο Σχήμα 60.



Σχήμα 60: Μορφές πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης (AspUP) της καταλυτικής δυάδας. Ο συμβολισμός “i” (inner) αναφέρεται στην πρωτονίωση του εσωτερικού οξυγόνου (OD1) του αμινοξέος και ο συμβολισμός “o” (outer) στην πρωτονίωση του εξωτερικού οξυγόνου (OD2) του αμινοξέος.⁶²

Οι Park και Lee ασχολήθηκαν με υπολογισμούς μοριακής δυναμικής στη κρυσταλλική δομή της BACE-1 (PDBid: 1FKN).⁶³ Μελετήθηκαν δύο μορφές πρωτονίωσης: 32i και 228o. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι στη μορφή 32i, οι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ προσδέτη και καταλυτικής δυάδας διατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια του μεγαλύτερου μέρους της τροχιάς, προσδίδοντας την κατάλληλη πρόσδεση του προσδέτη στο ενεργό κέντρο. Αντίθετα, στη μορφή 228o οι αλληλεπιδράσεις δε διατηρήθηκαν στο αρχικό στάδιο της προσομοίωσης και δε συνέβαλαν αποτελεσματικά στη σταθεροποίηση της υδροξυλομάδας του αναστολέα. Η δυνατότητα του υποστρώματος ή του αναστολέα να μεταβάλουν τη μορφή πρωτονίωσης δε μελετήθηκε στην παρούσα μελέτη. Οι Rajamani και Reynolds⁶⁴ σύγκριναν τις ενέργειες όλων των οκτώ πιθανών μορφών πρωτονίωσης σε αέρια και υδατινή φάση, παρουσία και απουσία προσδέτη, χρησιμοποιώντας μία Κβαντομηχανική μέθοδο γραμμικής διαβάθμισης (linear-scaling QM). Όλοι οι υπολογισμοί έγιναν σε τμήμα κρυσταλλογραφικής δομής της 1FKN (truncated model system). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η 228i ήταν η πιο σταθερή ενεργειακά πρωτονιακή μορφή παρουσία προσδέτη (3,5 kcal/mol), ενώ η μορφή διπλής αποπρωτονίωσης (di-deprotonated, ddp) ήταν η προτιμώμενη κατάσταση απουσία προσδέτη (13,2 kcal/mol πιο σταθερή από την 228i). Για να ξεπεραστεί το πρόβλημα των σφαλμάτων που εισάγει το τμήμα της πρωτεϊνικής δομής και ταυτόχρονα οι κβαντομηχανικοί υπολογισμοί (QM) να είναι ακριβείς, ο Yu και οι συνεργάτες του⁶⁵ εισήγαγαν μία βελτιωμένη μέθοδο που αποτελεί συνδυασμό κβαντομηχανικής και μοριακής μηχανικής (QM/MM) για τον καθορισμό της πρωτονιακής μορφής. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, η ενέργεια του συστήματος ελαχιστοποιήθηκε με τη μέθοδο QM/MM με τέτοιο τρόπο ώστε η ελαχιστοποιημένη διαμόρφωση να τοποθετείται στο χάρτη της ηλεκτρονικής πυκνότητας που λαμβάνεται από την κρυσταλλογραφική δομή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η 32i ήταν η προτιμώμενη πρωτονιακή μορφή ($\Delta E = -43$ kcal/mol σε σχέση με τη λιγότερο σταθερή διπλή αποπρωτονιομένη μορφή). Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν επίσης από μία άλλη QM/MM μελέτη από τον Lu και τους συνεργάτες του.⁶⁶ Ο Dominguez και οι συνεργάτες του⁶⁷ διερεύνησαν τη πιθανότητα εναλλακτικών μορφών πρωτονίωσης από

διαφορετικές χημικές ομάδες. Σ' αυτή τη μελέτη, η επίδραση του pH στις συγγένειες πρόσδεσης μίας σειράς χημικά διαφορετικών αναστολέων προσδιορίσθηκε από το συνδυασμό πειραματικών και θεωρητικών μεθόδων. Η μελέτη έδειξε ότι οι προσδέτες που φέρουν μία ουδέτερη υδροξυαιθυλενική ομάδα επάγουν μία διπρωτονιακή μορφή σε όξινο pH (4,5), ενώ η πιθανότητα της ύπαρξης μίας μονοπρωτονιομένης μορφής (δηλαδή Asp32 πρωτονιωμένο) αυξάνεται σε υψηλότερο pH=7,4. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούσαν με αυτά που είχαν προηγουμένως δημοσιευθεί από άλλους ερευνητές. Ακολουθώντας την ίδια σκέψη, ο Sussman και οι συνεργάτες του⁶⁸ εφάρμοσαν επιτυχώς μεθόδους μοριακής μηχανικής σε μία σειρά υδροξυαιθυλαμινικών αναστολέων (HEA) για τους οποίους ήταν γνωστή η δράση πειραματικά. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι για φορτισμένα μόρια HEA, η μονοπρωτονιομένη μορφή (δηλαδή, πρωτονιωμένο Asp32) παρείχε παρόμοια αποτελέσματα και στις δύο τιμές pH (περίπου 4,5–7,4). Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε αντίθεση με αυτά του Gueto-Tettay και των συνεργατών του,⁶⁹ σύμφωνα με τους οποίους η διπρωτονιομένη μορφή επικρατούσε για τους αναστολείς HEA, ενώ οι πρωτογενείς αμίνες ευνοούσαν μια μονοπρωτονιομένη δυάδα (δηλαδή, πρωτονιωμένο Asp32) σε χαμηλότερο pH και διπλή αποπρωτονίωση σε υψηλότερο pH (περίπου 7,4). Συνολικά, οι έρευνες αυτές παρέχουν δύο σημαντικά συμπεράσματα: **α)** οι αναστολείς που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια προς τη BACE-1 και στις δύο τιμές pH (δηλαδή, σε pH=7,4 επί της επιφανείας των κυττάρων και pH=4,5 στο εσωκυτταρικό περιβάλλον) έχουν τάση να παρέχουν υψηλή δράση σε κυτταρικά βιολογικά πειράματα και **β)** ένας συνδυασμός των δύο μορφών πρωτονίωσης θα πρέπει να ληφθεί υπόψη στην εξερεύνηση καινοτόμων αναστολέων.

Η σπουδαιότητα της διπρωτονιομένης μορφής του Asp στην αναζήτηση καινοτόμων φαρμάκων όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος Εικονικής Σάρωσης (Virtual Screening) αποδείχθηκε από τους Polgár και Keserü.⁷⁰ Ανέφεραν ότι μία σημαντική βελτίωση από άποψη εμπλουτισμού παρατηρείται στη μορφή μονοπρωτονίωσης (πρωτονιομένη Asp32), σε σύγκριση με διπλή αποπρωτονιομένη μορφή της καταλυτικής δυάδας. Σε μια άλλη μελέτη ο Tounge και οι συνεργάτες του⁷¹ μελέτησαν την επίδραση της πρωτονίωσης

της πρωτεΐνης και του προσδέτη για τους υπολογισμούς της συγγένειας πρόσδεσης του προσδέτη. Στη μελέτη τους επικεντρώθηκαν σε δυνάμεις van der Waals και Coulomb και στη συνεισφορά συνεχούς ενυδάτωσης στην πρόσδεση του προσδέτη. Παρατήρησαν ότι η πρόβλεψη των συγγενειών πρόσδεσης είναι σχετικά ανεξάρτητη από την κατάσταση πρωτονίωσης της καταλυτικής δυάδας της πρωτεΐνης, όταν οι προδότες είναι ουδέτερα μόρια. Ωστόσο, η ένταξη των θετικά φορισμένων προσθετών οδηγεί σε μεγάλες αποκλίσεις σε ενέργειες Coulomb, ενυδάτωσης και van der Waals. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μία προσπάθεια του συστήματος να ισορροπήσει τις αποστικές δυνάμεις van der Waals και των ισχυρών έλξεων Coulomb μεταξύ αντίθετων φορτίων.

Το συμπέρασμα που εξάγονται από αυτές τις μελέτες δε βρίσκονται σε αρμονία. Ανάλογα με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε εξήχθησαν διαφορετικά αποτελέσματα. Τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα συνιστούν την εξέταση ενός συστήματος προς μελέτη με όλους τους οκτώ πιθανούς τρόπους αλληλεπίδρασης. Ως επικρατών σύστημα που προσομοιώνει το βιολογικό θα θεωρείται αυτό όπου υπάρχει παραλληλία των βαθμολογιών επίδοσης της μοριακής πρόσδεσης με αυτές των βιολογικών αποτελεσμάτων. Εάν φυσικά περισσότερα από ένα συστήματα δικαιολογούν τα βιολογικά δεδομένα τότε σαφώς προτιμητέο είναι αυτό όπου θα δίνει τα ευνοϊκότερα ενεργειακά αποτελέσματα.

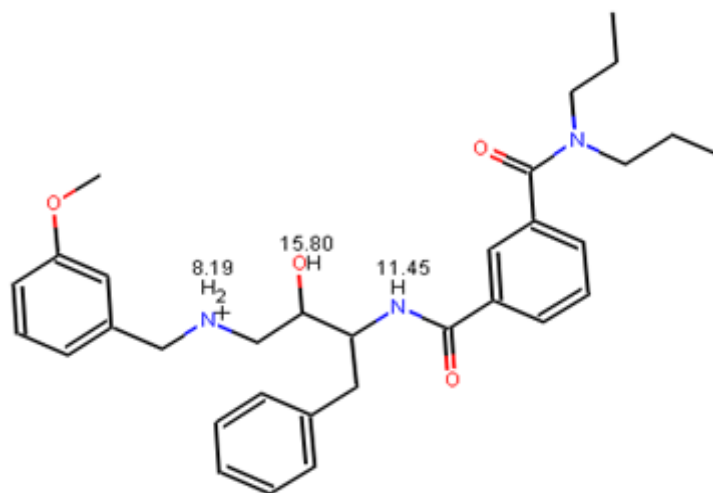
Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι μέθοδοι και οι μορφές πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης της καταλυτικής δυάδας που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 4: Σύνοψη των υπολογισμών της βιβλιογραφίας για τον καθορισμό της μορφής πρωτονίωσης

No	Κρυσταλλογραφική δομή BACE-1	Μέθοδος	Προβλεπόμενη μορφή πρωτονίωσης	Βιβλιογραφία
1	1FKN	Υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής (MD)	32i	63
2	1FKN	Μέθοδος γραμμικής διαβάθμισης στη Κβαντομηχανική (Linear scaling QM)	228i	72
3	1FKN	Συνδυασμός κβαντομηχανικών υπολογισμών και μοριακής μηχανικής και βελτίωσης δομών X-ray (QM/MM X-ray refinement)	32i	65
4	Μοντελοποιημένη δομή της 1FKN	Συνδυασμός κβαντομηχανικών υπολογισμών και μοριακής μηχανικής (QM/MM)	32i	66
5	1FKN	Υπολογισμοί Πρόσδεσης και συγγένειας σύνδεσης	HE: Διπρωτονιομένη σε pH 4,5 Μονοπρωτονιομένη (πρωτονιομένη Asp32 και φορτισμένη Asp228) HEA: Μονοπρωτονιομένη (πρωτονιομένο Asp32 και φορτισμένο Asp228) και στις δύο τιμές pH Πρωτοταγείς αμίνες: Διπλή αποπρωτονιομένη μορφή	67
6	2VNM	Κβαντομηχανικοί Υπολογισμοί (QM)	Διπλή αποπρωτονιομένη μορφή	69
7	1FKN	Υπολογισμοί πρόσδεσης και συγγένειας σύνδεσης	Διπρωτονιομένη μορφή 32i και 228o	68
8	1FKN, 1SGZ	Εικονική σάρωση (Virtual screening)	Μονοπρωτονιομένη Asp32	70
9	1W51, 1YM2, 2QU3, 2FDP, 2ISO, 2QZL, 2WF4	Κβαντομηχανικοί Υπολογισμοί, Μοριακή Δυναμική, Μοριακή Πρόσδεση και Εικονική Σάρωση (QM, MD, docking, virtual screening)	Διάφορες μορφές πρωτονίωσης 32i, 228i και διπλή αποπρωτονιομένη μορφή	73

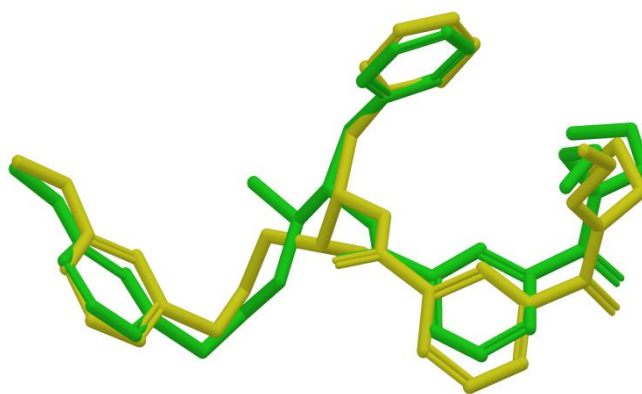
Η επιλογή της μορφής πρωτονίωσης της καταλυτικής δυάδας για τους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης στην κρυσταλλογραφική δομή 1w51 πραγματοποιήθηκε με βάση τα αποτελέσματα της χρήσης της μεθοδολογίας PROPKA.^{74,75} Η τιμή pKa του Asp32 είναι 7,27 ενώ του Asp228 είναι 3,02. Με δεδομένο ότι οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έγιναν σε pH=6,6 και η βιολογική αποτίμηση των ενώσεων έναντι της BACE-1 έγινε σε pH=4,5, το Asp32 στα συγκεκριμένα pH είναι πρωτονιομένο και το Asp228 αποπρωτονιομένο. Για το λόγο αυτό, οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν στις δύο μορφές πρωτονίωσης Asp32i και Asp32o.

Εξετάσθηκε αρχικά η αξιοπιστία του προγράμματος μελετώντας την προσέγγιση του αναστολέα του ενζύμου 1W51 στο ενεργό κέντρο και στις δύο μορφές πρωτονίωσης. Στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-προσδέτη σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η ταυτομερή μορφή του προσδέτη. Για την εύρεση των ταυτομερών μορφών της ένωσης LO1 εφαρμόσθηκε το πρόγραμμα MoKa.^{76,58} Σε pH=6,6 της κρυσταλλογραφικής μελέτης ένα από τα τρία άζωτα του αναστολέα LO1 πρωτονιώνεται (pKa=8,19) όπως παριστάνεται στο Σχήμα 61.



Σχήμα 61 Δομή του αναστολέα LO1 και προβλεπόμενες τιμές pKa στις αντίστοιχες ομάδες που μπορεί να πρωτονιωθούν σε pH 6,6

Δεν παρατηρήθηκε μεγάλη διαφορά στις τιμές βαθμολόγησης XP GScores του LO1 στις μορφές πρωτονίωσης ASP32i και ASP32o (XP GScore: -11,732 kcal/mol και XP GScore: -11,850 kcal/mol, αντίστοιχα καθώς και στις τιμές RMSD (RMSD=1,35 και RMSD=1,34, αντίστοιχα). Στο Σχήμα 62 εμφανίζεται η διαμόρφωση του LO1 όπως προέκυψε από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα και η προβλεπόμενη διαμόρφωση στη μορφή πρωτονίωσης Asp32o. Παρατηρήθηκε ότι η προβλεπόμενη διαμόρφωση και ο προσανατολισμός στο καταλυτικό κέντρο είχε RMSD=1,4 το οποίο εκφράζει χωρική εγγύτητα με αυτή της κρυσταλλογραφικής μελέτης.



Σχήμα 62: Διαμόρφωση του αναστολέα του 1W51 όπως προκύπτει από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα (πράσινο) σε σύγκριση με τη διαμόρφωση της προβλεπόμενης διαμόρφωσης (κίτρινο) από το πρόγραμμα Glide

Στη συνέχεια μελετήθηκε η προσέγγιση των παραγώγων της ρεσβερατρόλης και της υδραζόνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και στις δύο μορφές πρωτονίωσης. Σε pH=4,5 όπου πραγματοποιήθηκε η βιολογική αποτίμηση των ενώσεων, η ρεσβερατρόλη και τα παράγωγά της εμφανίσθηκαν σε ουδέτερη μορφή. Αντίθετα, τα παράγωγα της υδραζόνης εμφανίσθηκαν σε κατιονική μορφή. Συγκεκριμένα, από τις τιμές pKa των ατόμων των παραγώγων αυτών που παρουσιάζονται στο Παράρτημα III προκύπτει ότι πρωτονιώνεται το N που φέρει το διπλό δεσμό (pKa=5,47 - 6,77).

Συγκρίνοντας τις τιμές βαθμολόγησης XP GScore παρατηρήθηκε ότι το πιο δραστικό παράγωγο της ρεσβερατρόλης **14** εμφανίζει τιμή μεγαλύτερη (XP GScore: -7,011 kcal/mol) σε σχέση με το παράγωγο **12** (XP GScore: -5,721 kcal/mol) στην μορφή πρωτονίωσης Asp32o και το αποτέλεσμα αυτό

συμφωνεί με τα βιολογικά αποτελέσματα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται συγκρίνοντας τις τιμές XP GScores και στη μορφή πρωτονίωσης Asp32i.

Στα Σχήματα 63 και 64 παρουσιάζονται οι θέσεις πρόσδεσης των ενώσεων **14** και **12**, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι και τα δύο παράγωγα δεν αλληλεπιδρούν με τα ασπαρτικά αμινοξέα Asp32 και Asp228. Όπως αναφέρθηκε στο πρώτο κεφάλαιο έχει αποδειχθεί κρυσταλλογραφικά ότι δεν είναι απαραίτητη η απαίτηση να αλληλεπιδρούν οι αναστολείς με τα ασπαρτικά οξέα.^{18,77} Για το λόγο αυτό το βιολογικό αποτέλεσμα είναι δυνατό να εξηγηθεί μελετώντας τις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων **14** και **12** με αμινοξέα που γειτνιάζουν με αυτά. Συγκεκριμένα, το ένα από τα δύο φαινολικά υδροξύλια που φέρει ο μη υποκαταστημένος αρωματικός δακτύλιος του παραγώγου **14** σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το -NH της Ser328 (2,080 Å) και το υδροξύλιο της Thr329 (2,247 Å) (Σχήμα 63α). Το φαινολικό υδροξύλιο της Tyr198 εμφανίζει ένα δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της μίας από τις δύο μεθόξυ ομάδες (1,953 Å) που φέρει ο μη υποκαταστημένος αρωματικός δακτύλιος του παραγώγου **12**, ενώ το υδροξύλιο της Thr329 σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της δεύτερης μεθόξυ ομάδας (2,316 Å) (Σχήμα 64α). Στην τιμή XP GScore συνεισφέρουν και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η μία 1-αιθυλο-πρότυλο ομάδα του παραγώγου **14** σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το αμινοξύ Ile110 και η δεύτερη 1-αιθυλο-πρότυλο ομάδα με τα αμινοξέα Tyr71, Phe108 και Ile118 (Σχήμα 63β). Το αμινοξύ Tyr71 ανήκει στο πτερύγιο που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της BACE-1 όπως αναφέρθηκε στο πρώτο κεφάλαιο.³

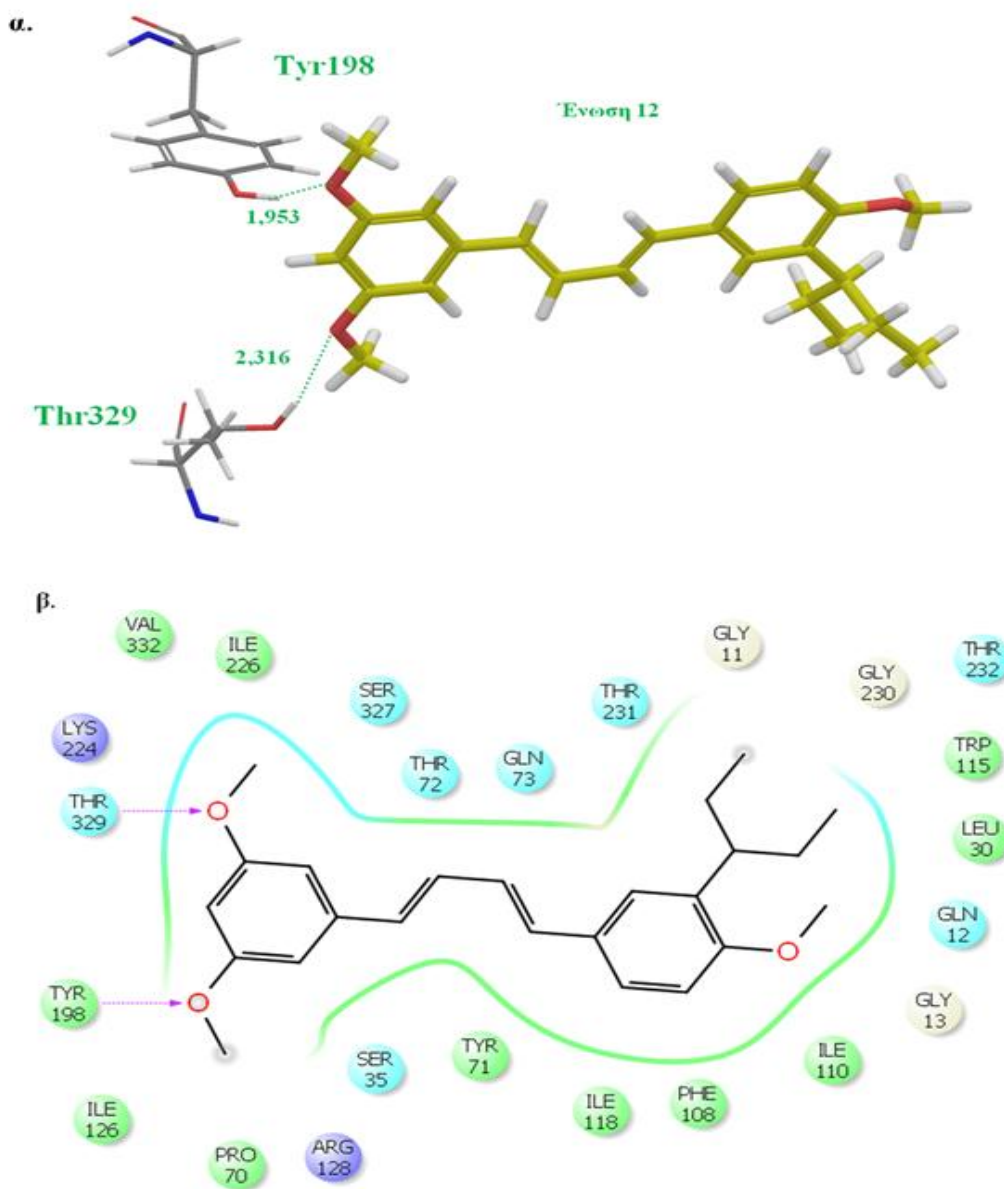
Στο Σχήμα 64β παρατηρούνται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του παραγώγου **12**. Ο φαινολικός δακτύλιος που φέρει τις δύο μεθόξυ ομάδες σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Ile226 και Val332, ενώ η Tyr198 βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με τη μία μεθόξυ ομάδα του ίδιου δακτυλίου. Ο δεύτερος φαινολικός δακτύλιος σχηματίζει αρωματικές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Phe108 και Trp115, η μεθόξυ ομάδα σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τη Leu30, Ile110 και τη Trp115, ενώ η 1-αιθυλοπρότυλο ομάδα με τη Ile110. Αξίζει να σημειωθεί ότι και οι δύο

δακτύλιοι συμμετέχουν σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με το αμινοξύ του πτερυγίου Tyr71.

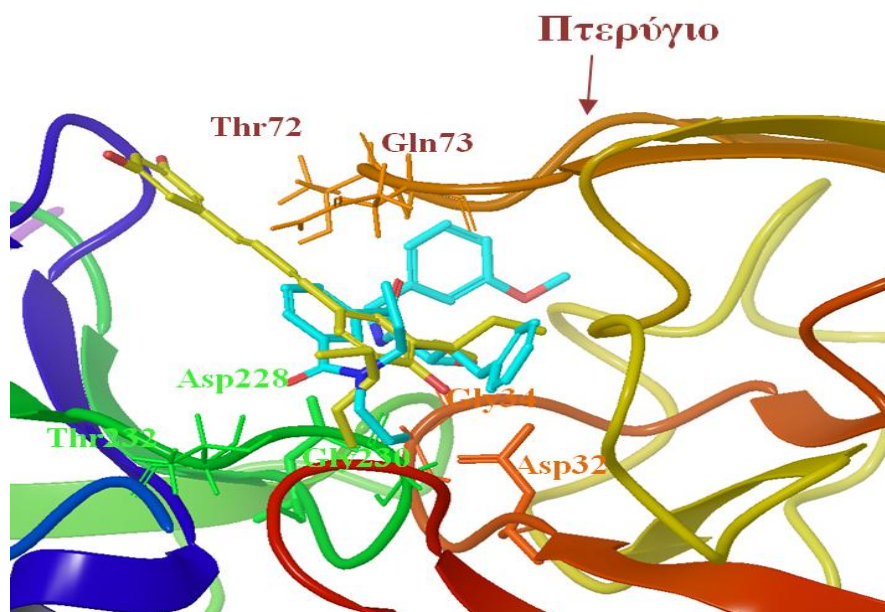
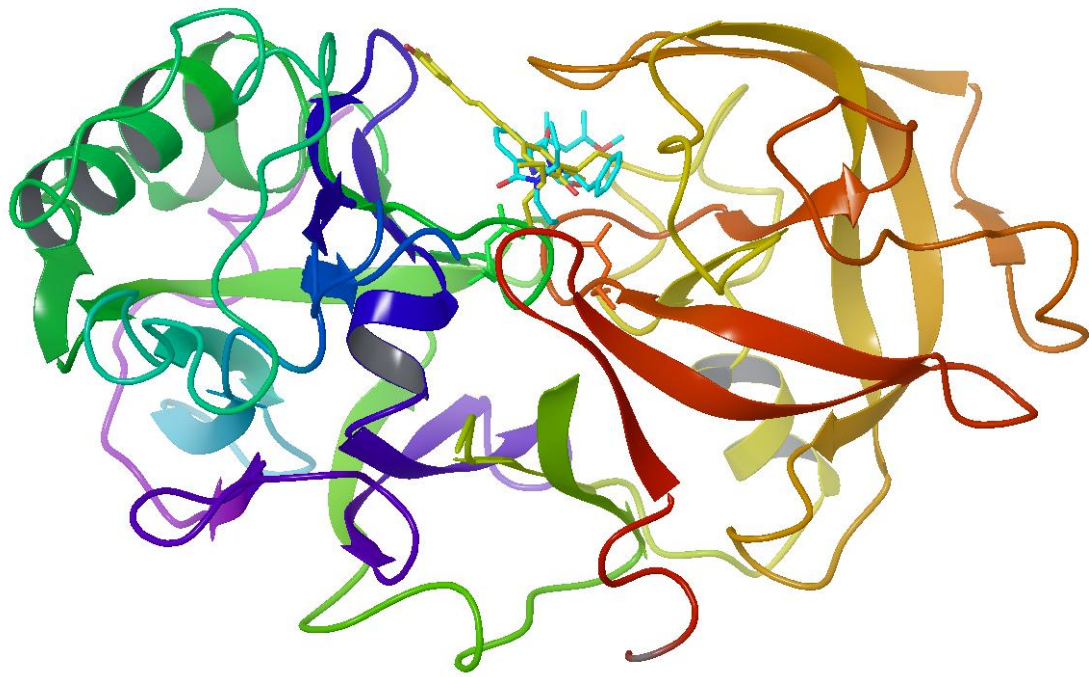
Στο Σχήμα 65 παριστάνεται η υπέρθεση του παραγώγου **14** με τη κρυσταλλογραφική δομή του αναστολέα LO1 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου 1w51. Συγκρίνοντας τη θέση πρόσδεσης του δραστικού παραγώγου **14** με τη θέση πρόσδεσης του αναστολέα LO1 της κρυσταλλογραφικής δομής παρατηρείται ότι οι δύο 1-αιθυλοπρότυλο ομάδες τοποθετούνται στις θήκες S1 και S3, εκεί όπου επίσης τοποθετούνται η φαινυλομάδα και η μία από τις δύο N-πρότυλο ομάδες αντίστοιχα του αναστολέα LO1 (Σχήμα 66). Η φαινυλομάδα και η μία από τις δύο N-πρότυλο ομάδες βρίσκονται και σε χωρική εγγύτητα με τα αμινοξέα της 10s θηλιάς που περιλαμβάνει τα αμινοξέα 9-14 και βρίσκεται στη βάση της θήκης S3 (Σχήμα 67). Η θηλιά αυτή είναι ανοιχτή για να επιτρέπει την αλληλεπίδραση της 1-αιθυλο-πρότυλο ομάδας με τα αμινοξέα της θήκης S3. Επίσης, παρατηρείται ότι η φαινυλομάδα της ένωσης **14** που φέρει τις δύο υδροξυλομάδες προεκτείνεται προς το πτερύγιο (Σχήμα 66). Η υπέρθεση της ρεσβερατρόλης στο ενεργό κέντρο δείχνει ότι οι δύο φαινυλομάδες της προσδέονται στις θήκες S1 και S2' (Σχήμα 66). Η βιοδραστικότητα των τριών ενώσεων μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα φαρμακευτικά τμήματά τους βρίσκονται σε χωρική εγγύτητα.

Τα παράγωγα της υδραζόνης δεν εμφανίζονται να έχουν σημαντική βιολογική δράση. Από τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης των ενώσεων αυτών ενδεικτικά περιγράφεται ο τρόπος πρόσδεσης του παραγώγου **6** (XP GScore: -4,281 kcal/mol) στο Σχήμα 68. Δεν παρατηρούνται δεσμοί υδρογόνου παρά μόνο υδρόφοβες και αρωματικές π-π αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα, η 1-αιθυλο-πρότυλο ομάδα σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Leu30, Ile110, Trp115, Phe108, Ile118. Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σχηματίζουν επίσης και οι μέθυλο ομάδες του δεύτερου αρωματικού δακτυλίου με τα αμινοξέα Ile126 και Tyr198 (Σχήμα 68). Ο αρωματικός αυτός δακτύλιος συμμετέχει και σε αρωματικές π-π αλληλεπιδράσεις με το αμινοξύ Tyr198. Επίσης, παρατηρείται ότι κάποια δομικά τμήματα του LO1 δεν έχουν βιοϊσοδύναμες ομάδες με την ένωση **6**. Αυτή η έλλειψη των φαρμακοφόρων

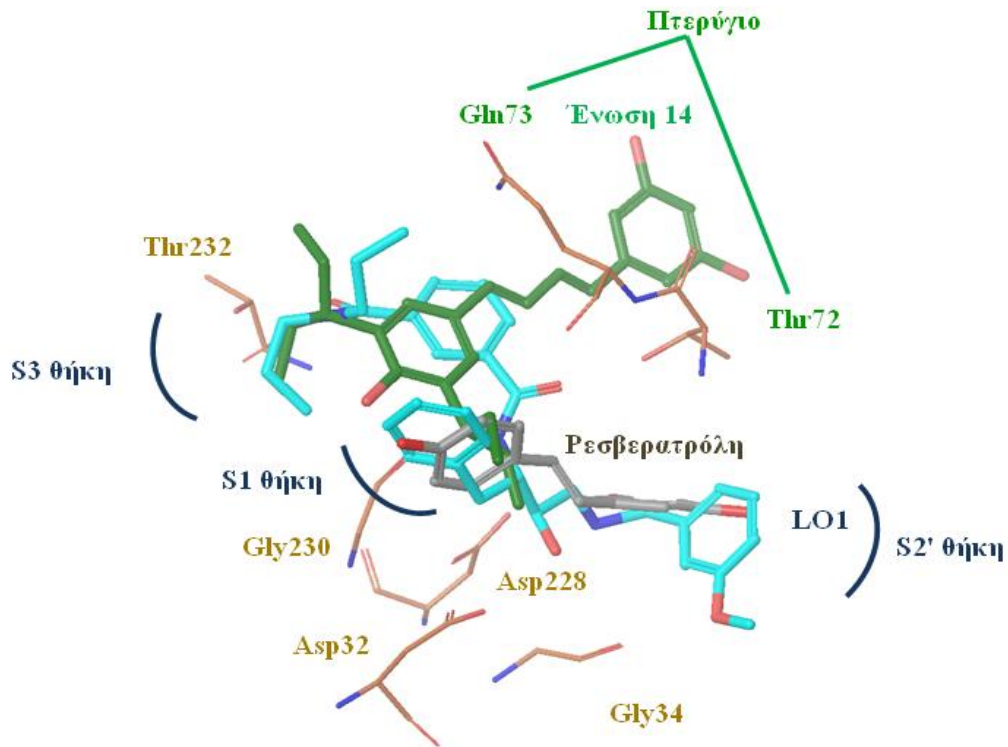
του αναστολέα του ενζύμου LO1. Μία πιθανή εξήγηση της μη δραστηριότητας του παραγώγου 6 είναι ότι κατά την υπέρθεση είναι εμφανές ότι δεν υπάρχουν ισοδύναμα φαρμακοφόρα τμήματα. Επίσης, η 1-αιθυλοπρόπυλο ομάδα ως υδρόφοβος δεν έχει ισοδύναμο τμήμα με τη LO1 ένωση.



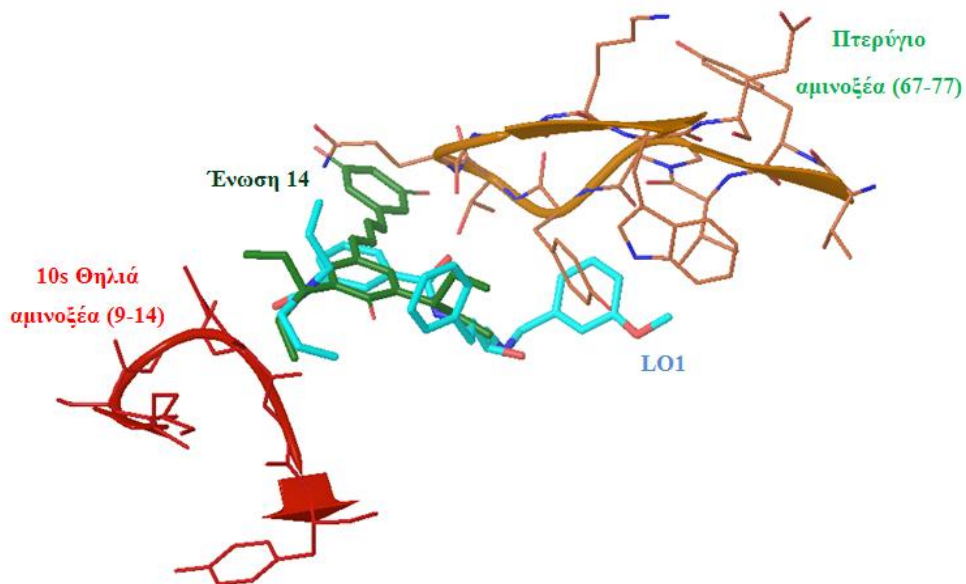
Σχήμα 64: Σχηματική α. τρισδιάστατη και β. δισδιάστατη παράσταση του ενεργού κέντρου όπου προσδένεται το παράγωγο της ρεσβερατρόλης 12. Ο δεσμός υδρογόνου της ένωσης 12 με τα αμινοξέα Tyr198 και Thr329 παριστάνεται με διακεκομμένη γραμμή



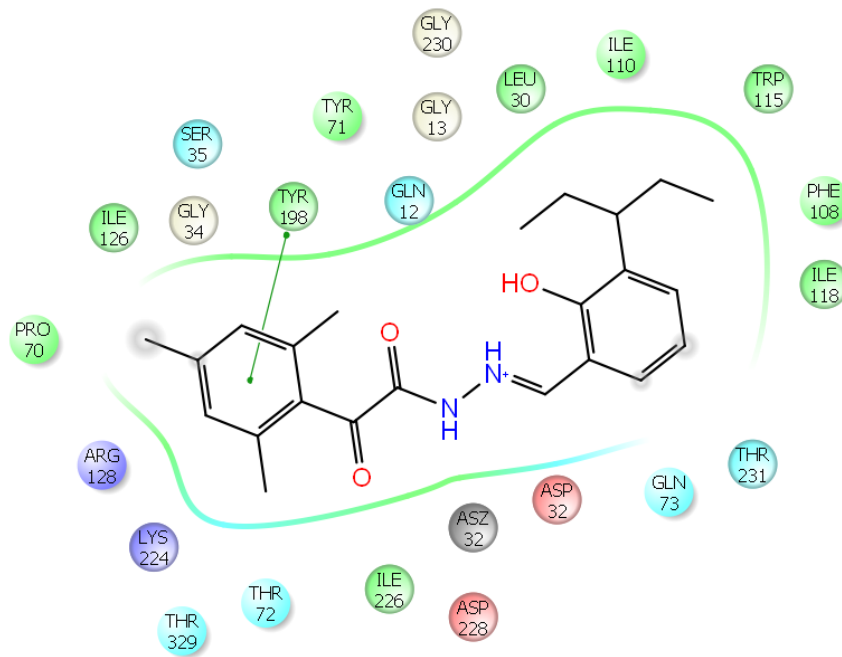
Σχήμα 65: Επάνω: Θέση πρόσδεσης της διαμόρφωσης του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14 (κίτρινο) και της κρυσταλλογραφημένης δομής του αναστολέα του ενζύμου LO1 (γαλάζιο). Κάτω: Μεγέθυνση όπου παριστάνονται οι λεπτομέρειες των δύο θέσεων πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του LO1 και του παραγώγου της ρεσβερατρόλης



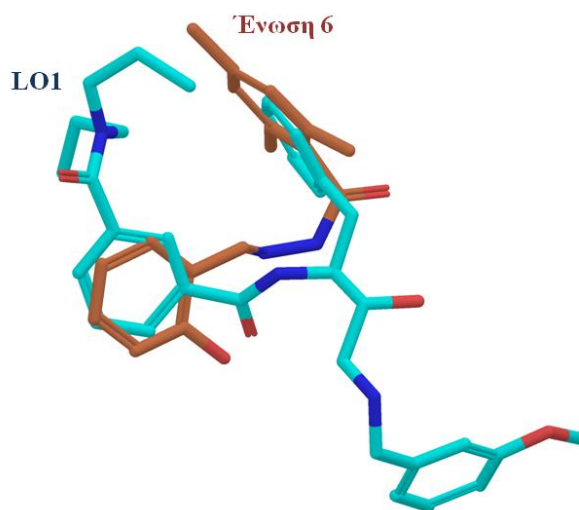
Σχήμα 66: Θέση πρόσδεσης της διαμόρφωσης του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14 (πράσινο) σε σύγκριση με τη θέση πρόσδεσης της κρυσταλλογραφημένης ένωσης του αναστολέα του ενζύμου LO1 (γαλάζιο) και της ρεσβερατρόλης (γκρι)



Σχήμα 67: Χωρική εγγύτητα της 1-αιθυλοπρότυλο ομάδας της ένωσης 14 και της 10s θηλιάς καθώς και του πτερυγίου



Σχήμα 68: α. Δισδιάστατη παράσταση του ενεργού κέντρου όπου προσδέεται το παράγωγο της υδραζόνης 6

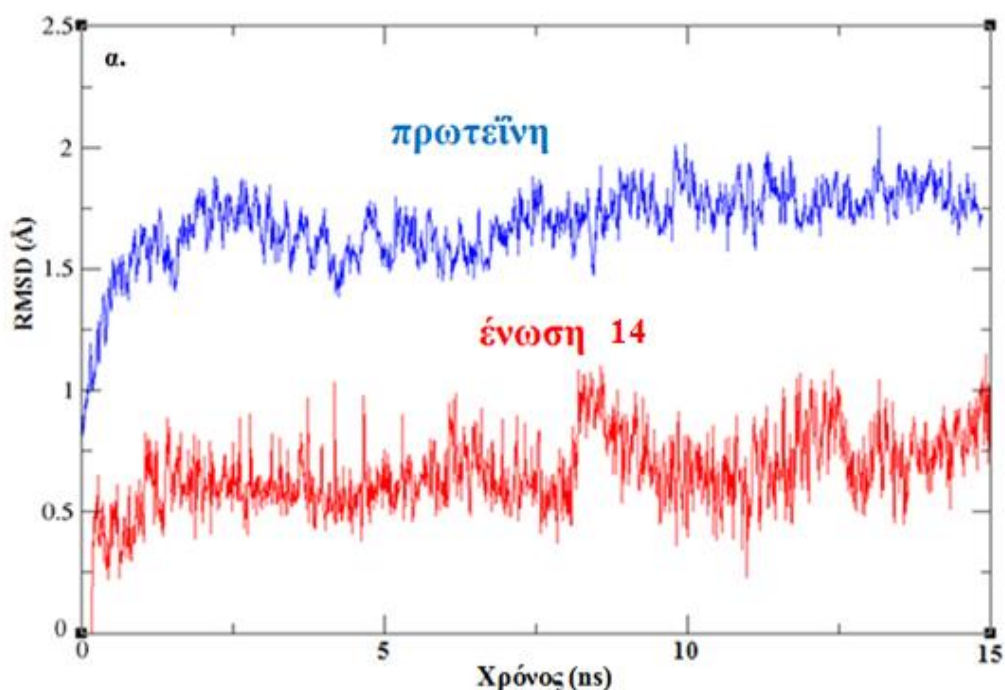


Σχήμα 69: Διαμόρφωση του γλουτοσυλούλο-αρούλο παραγώγου 6 (καφέ) που προκύπτει από τη μοριακή πρόσδεση σε σύγκριση με τη διαμόρφωση της κρυσταλλογραφημένης δομής του αναστολέα του ενζύμου LO1 (γαλάζιο)

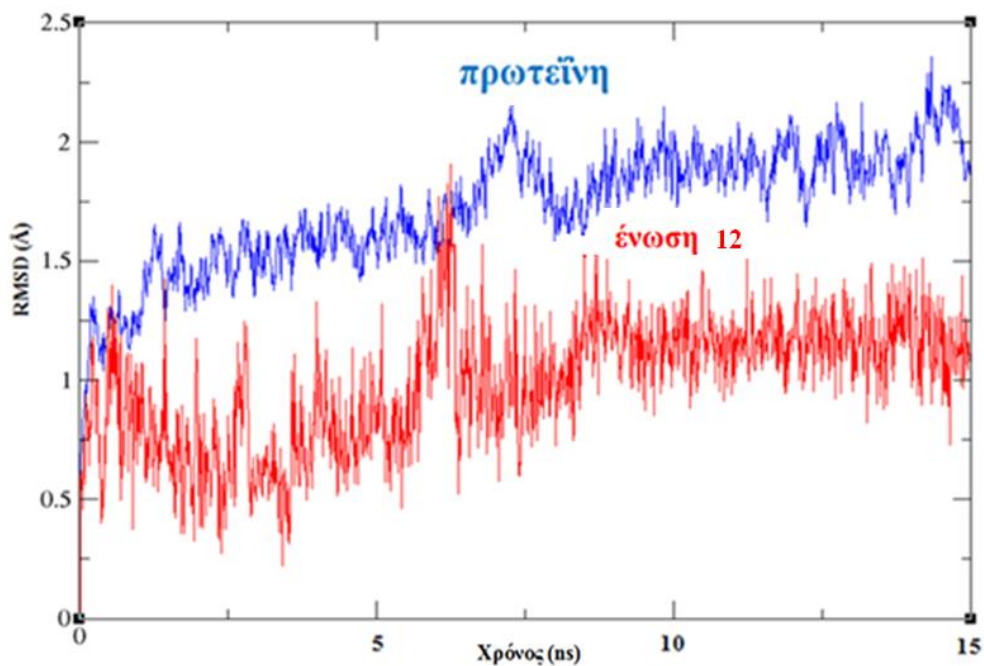
6.3.3 Μελέτες Μοριακής Δυναμικής

Για τη διερεύνηση της σταθερότητας του συμπλέγματος του πιο δραστικού παραγώγου της ρεσβερατρόλης **14** και του μη δραστικού παραγώγου **12** πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής με τη χρήση του προγράμματος AMBER.³⁷

Αρχικά μελετήθηκε η πιθανή αλλαγή στη διαμόρφωση του προσδέτη και της πρωτεΐνης μετά την μοριακή δυναμική σε σχέση με τη διαμόρφωση που προέκυψε από τη μελέτη της μοριακής πρόσδεσης. Η τιμή RMSD για τους Ca της πρωτεΐνης και όλων των ατόμων των προσδετών **14** και **12** παριστάνονται ως συνάρτηση του χρόνου στα Σχήματα 70 και 71, αντίστοιχα. Όσο αφορά στο σύμπλοκο πρωτεΐνη/**14**, παρατηρείται μία δομική αλλαγή του ενζύμου στην αρχή της προσομοίωσης και παραμένει χαμηλότερη από 2 Å καθόλη τη διάρκεια της προσομοίωσης. γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχουν μεγάλες αλλαγές στη διαμόρφωση του συμπλόκου. Μια λιγότερο έντονη μεταβολή παρατηρήθηκε για την ένωση **14**, η οποία εμφανίστηκε επίσης σταθερή σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.



Σχήμα 70: RMSD του συμπλέγματος της BACE-1 και του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14



Σχήμα 71: RMSD του συμπλέγματος της BACE-1 και του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 12

Για το σύμπλοκο πρωτεΐνη/12, παρατηρείται μία μεγαλύτερη δομική μεταβολή τόσο στην πρωτεΐνη όσο και στην ένωση **12** σε σχέση με το σύμπλοκο πρωτεΐνη/14.

Στη συνέχεια μελετήθηκε κατά πόσο διατηρούνται οι δεσμοί υδρογόνου που παρατηρήθηκαν στο αρχικό σύμπλεγμα του παραγώγου της ρεσβερατρόλης **14**. Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει το επί τοις εκατό ποσοστό του χρόνου προσομοίωσης όπου υπάρχει σχηματισμός υδρογονικού δεσμού μεταξύ της ένωσης **14** και ενζύμου. Όπως φαίνεται ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ του οξυγόνου της Ser328 και του υδρογόνου του υδροξυλίου της ένωσης **14** διατηρείται σε ποσοστό 25,73% κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Το ποσοστό αυτό αντιπροσωπεύει τη χαμηλότερη τιμή. Η ένωση σταθεροποιείται με το σχηματισμό δύο άλλων δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Gln326 και Lys107, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 56,6% και 34,87%, αντίστοιχα (Σχήμα 71).

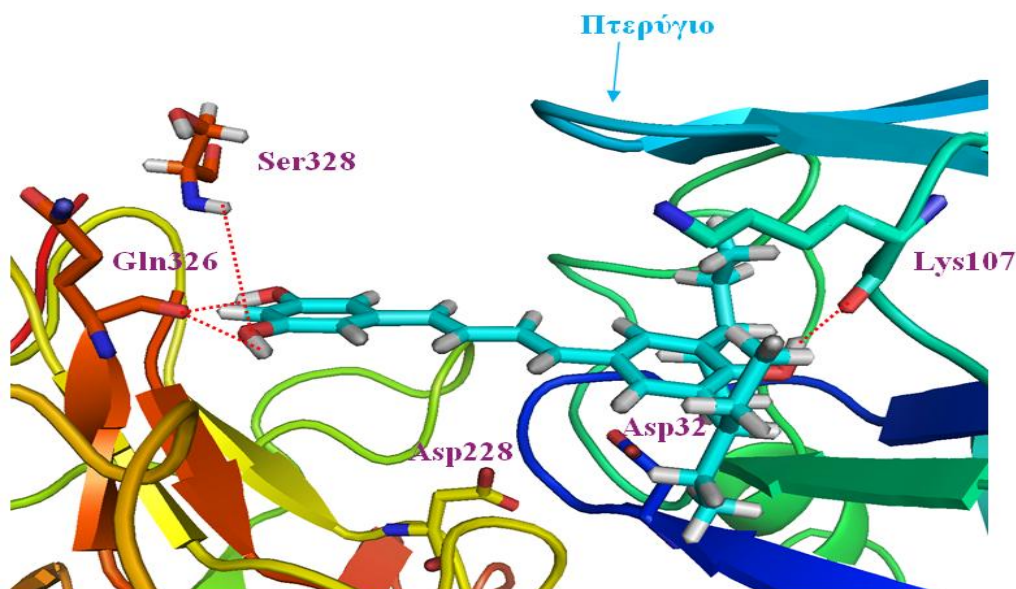
Το μη δραστικό παράγωγο **12** δεν παρουσίασε δεσμούς υδρογόνου κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της

μοριακής πρόσδεσης, τα οποία εμφάνισαν δύο δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Tyr198 και Thr329.

Πίνακας 5: Η διάρκεια παρουσίας δεσμών υδρογόνου μεταξύ BACE-1 και του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14^α

Σύμπλοκο BACE-1 – παράγωγο ρεσβερατρόλης 14	
Αμινοξέα που εμπλέκονται σε δεσμούς υδρογόνου με το παράγωγο ρεσβερατρόλης 14	%
Gln326	56.6/22.67 ^β
Lys107	34.87
Ser328	25.73

^αΗ διάρκεια παρουσίας δεσμών υδρογόνου ορίζεται ως το επί τοις εκατό ποσοστό του χρόνου προσομοίωσης όπου υπάρχει μία συγκεκριμένη αλληλεπίδραση. Αλληλεπιδράσεις λιγότερες από το 10% δε λαμβάνονται υπόψη. ^βΠολλαπλοί δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ διαφορετικών ατόμων της ένωσης 14 και του αμινοξέος Gln326.



Σχήμα 72: Το σύμπλοκο του παραγώγου της ρεσβερατρόλης 14 στο ενεργό κέντρο της BACE-1 μετά από τον υπολογισμό της μοριακής δυναμικής. Με κόκκινη διακεκομμένη γραμμή εμφανίζονται οι υδρογονικοί δεσμοί με τα αμινοξέα Lys107, Gln326, Ser328.

Για τον υπολογισμό των συνεισφορών των διάφορων όρων στην ενέργεια σύνδεσης των παραγώγων **14** και **12** στη BACE-1, εφαρμόστηκε η μέθοδος MM-PBSA (Molecular Mechanic/ Poisson-Boltzmann Surface Area) με τη χρήση του προγράμματος AMBER. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 6.

Παρατηρείται ότι η μεταβολή στην ενέργεια πρόσδεσης είναι $\Delta G_{\text{bind}}=-3,98$ kcal/mol για την ένωση **14** και $\Delta G_{\text{bind}}=1,6$ kcal/mol για την ένωση **12** και οφείλονται κυρίως σε δυνάμεις van der Waals ($\Delta E_{\text{vdW}}=-33,96$ kcal/mol και $\Delta E_{\text{vdW}}=-40,12$ kcal/mol, αντίστοιχα). Συγκρίνοντας τις τιμές ΔG_{bind} συμπεραίνεται ότι η ένωση **14** εμφανίζει ισχυρότερη δράση έναντι της BACE-1 σε σχέση με το παράγωγο **12**. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη μελέτη μοριακής πρόσδεσης και τα βιολογικά αποτελέσματα.

Επίσης, για το παράγωγο **14** παρατηρείται ότι ο ενθαλπικός παράγοντας ($\Delta H=-21,07$ kcal/mol) συνεισφέρει περισσότερο από τον εντροπικό ($-T\Delta S_{\text{solv}}=17,09$ kcal) στη μεταβολή της ενέργειας πρόσδεσης, ενώ για το παράγωγο **12** ο εντροπικός παράγοντας ($-T\Delta S = 19,66$ kcal) είναι λίγο μεγαλύτερος από τον ενθαλπικό παράγοντα ($\Delta H = -18,06$ kcal/mol).

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις συμβάλλουν ευνοϊκά στο σχηματισμό συμπλόκου και στις δύο ενώσεις ($\Delta E_{\text{elec}} = -14,50$ kcal/mol για το παράγωγο **14**, $\Delta E_{\text{elec}} = -9,09$ kcal/mol για το παράγωγο **12**).

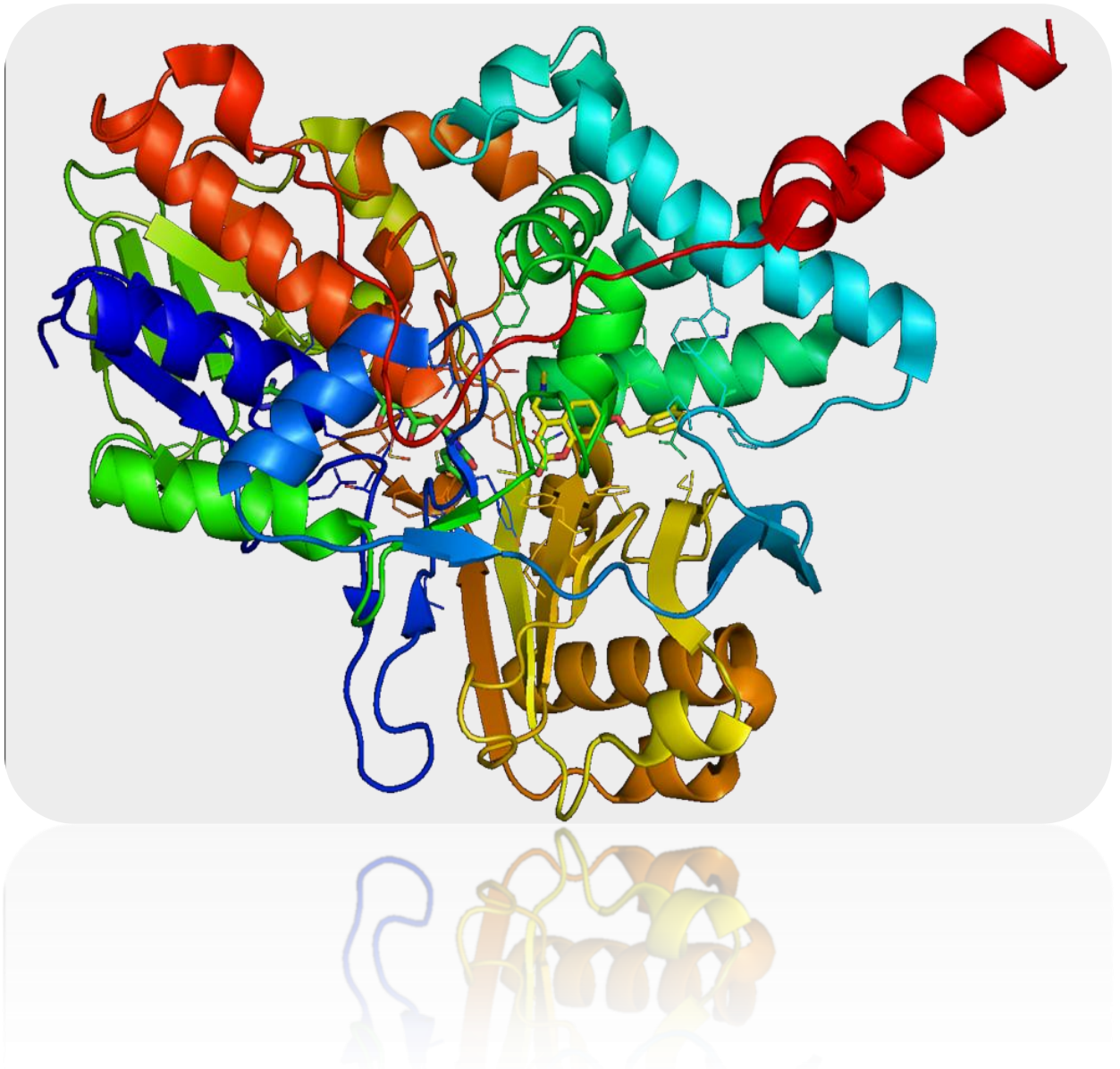
Πίνακας 6: Συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης των παραγώγων 14 και 12 στη BACE-1, όπως υπολογίστηκε με τη μέθοδο MM-PBSA

Ανάλυση ενέργειας	Παράγωγο ρεσβερατρόλης 14	Παράγωγο ρεσβερατρόλης 12
ΔE_{elec}	-14.50 ± 0.14^a	-9.09 ± 0.09^a
ΔE_{vdW}	-33.96 ± 0.09	-40.12 ± 0.10
$\Delta E_{\text{MM}} = \Delta E_{\text{elec}} + \Delta E_{\text{vdW}}$	-48.45 ± 0.17	-49.21 ± 0.13
ΔG_{PB}	31.44 ± 0.12	35.24 ± 0.18
ΔG_{solv}	27.39 ± 0.12	31.15 ± 0.17
$\Delta G_{\text{NP}} = \Delta G_{\text{solv}} - \Delta G_{\text{PB}}$	-4.05 ± 0.17	-4.09 ± 0.25
$\Delta G_{\text{elec (tot)}} = \Delta E_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{PB}}$	16.95 ± 0.18	26.15 ± 0.20
ΔH	-21.07 ± 0.12	-18.06 ± 0.09
$-T\Delta S_{\text{solv}}$	17.09 ± 1.29	19.66 ± 2.32
ΔG_{bind}	-3.98 ± 1.29	1.6 ± 2.32

^a Οι αριθμητικές τιμές που φέρουν μπροστά τους \pm υποδηλώνουν μέσες τιμές απόκλισης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON



7.1 Υπολογιστικές μελέτες στη MAO-B

Όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο 2 η ανασταλτική δράση κουμαρινικών παραγώγων έχει αποδειχθεί έναντι της μονοαμινοοξειδάσης τύπου Β (MAO-B). Εκτός από τον Pisani και τους συνεργάτες του έχουν ασχοληθεί με παρόμοιες μελέτες και άλλοι ερευνητές όπως οι Serra,⁷⁸ Delogu,⁷⁹ Matos,⁸⁰ Chimenti,⁸¹ Gnerre,⁸² Renderbach,⁸³ Secci,⁸⁴ Huong,⁸⁵ Seon,⁸⁶ Lee,⁸⁷ Jo⁸⁸ και οι συνεργάτες τους των οποίων η έρευνα αναφέρεται στην πρόσφατη επισκόπηση του Patil *et al.*⁸⁹ Γι'αυτό το λόγο επιλέχθηκε μία σειρά 13 κουμαρινικών παραγώγων (Πίνακας 7) που συντέθηκαν στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για τη μελέτη της ανασταλτικής τους δράσης στη MAO-B.

7.2 *In silico* φαρμακοκινητικές μελέτες

A. Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού

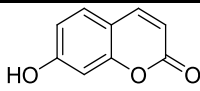
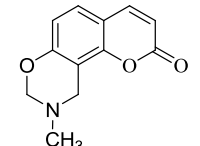
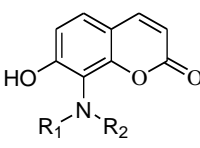
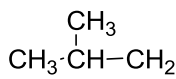
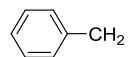
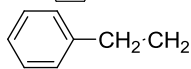
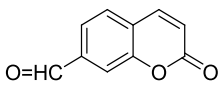
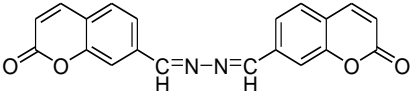
Αρχικά διερευνήθηκε η διαπερατότητά των ενώσεων αυτών από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB, Blood Brain Barrier). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό VolSurf^{56,57} που περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο. Το μοντέλο αυτό παρέχει τη δυνατότητα πρόβλεψης της διαπερατότητας από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω μαθηματικού μοντέλου BBB. Στο Σχήμα 73α όπου παριστάνεται προβολή των κουμαρινικών παραγώγων στο μοντέλο BBB, παρατηρείται ότι όλες οι ενώσεις εκτός από τις ενώσεις με κωδικό K16, K17 και W4 ανήκουν στην κόκκινη περιοχή, που σημαίνει ότι οι ενώσεις αυτές διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αντίθετα, οι ενώσεις K16, K17 και W4 που ανήκουν στην περιοχή της χαμηλής διαπερατότητας (κυανή περιοχή) προβλέπεται να μην τον διαπερνούν.

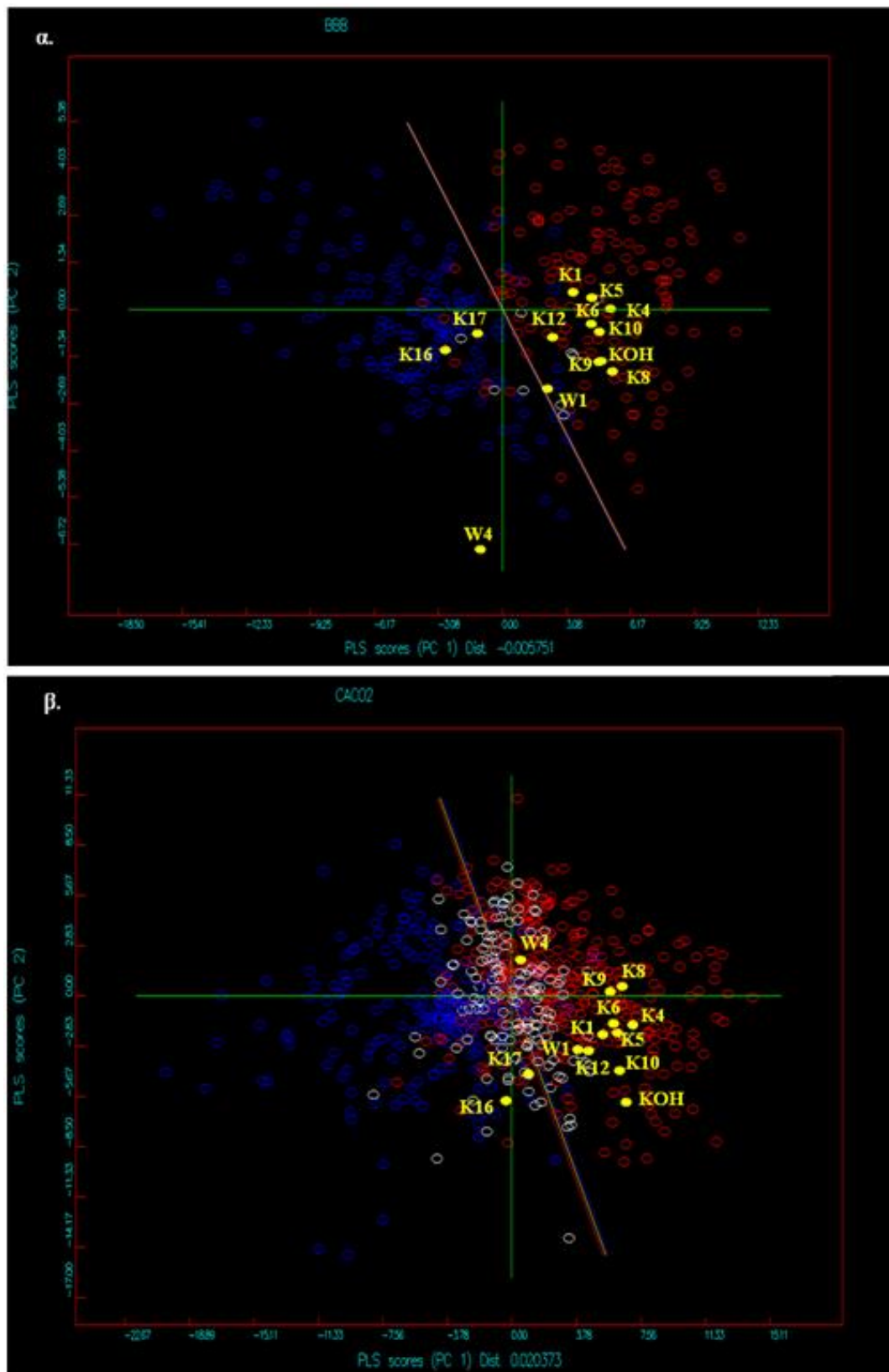
B. Απορρόφηση από τα επιθηλιακά κύτταρα Caco2

Διερευνήθηκε επίσης η απορρόφηση των ενώσεων από τα κύτταρα του επιθηλίου του εντέρου Caco2 που αποτελούν πρότυπο για την *in vitro* μελέτη

της απορρόφησης φαρμάκων από τον άνθρωπο. Στο Σχήμα 73β απεικονίζεται η προβολή των ενώσεων στο μοντέλο Caco2. Παρατηρείται, ότι όλες οι ενώσεις βρίσκονται στην περιοχή της υψηλής απορρόφησης εκτός από τις ενώσεις K17 και K16, που σημαίνει ότι οι ενώσεις αυτές προβλέπεται ότι απορροφούνται από τα κύτταρα του επιθηλίου Caco2. Οι δύο αυτές μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι εξεταζόμενες ενώσεις ικανοποιούν τα φαρμακοκινητικά κριτήρια για να οδηγηθούν σε περαιτέρω μελέτες εξέτασης της ικανότητας αναστολής της MAO-B.

Πίνακας 7: Χημικές δομές των κουμαρινικών παραγώγων

		Ένωση	
1	KOH		
2	K1		
			
		R₁	R₂
3	K4	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -	
4	K5	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H
5	K6		H
6	K8		H
7	K9		H
8	K10	CH ₃ -CH ₂	H
9	K12	-CH ₂ -CH ₂ -NH-CH ₂ -CH ₂ -	
10	K16	NH ₂ CH ₂ CH ₂	H
11	K17	H ₂ N-CH ₂ CH ₂ CH ₂	H
12	W1		
13	W4		

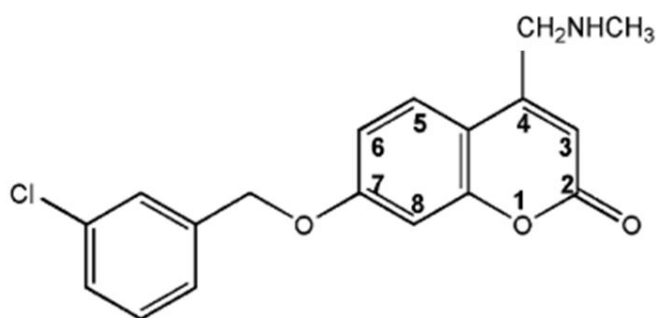


Σχήμα 73 Προβολή των κουμαρινικών παραγώγων στο μοντέλο α. BBB και β. στο μοντέλο Caco2 του λογισμικού VolSurf

7.2 Μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης

Στη συνέχεια ακολούθησαν υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο της MAO-B με το πρόγραμμα Glide⁶¹ της εταιρίας Schrodinger.

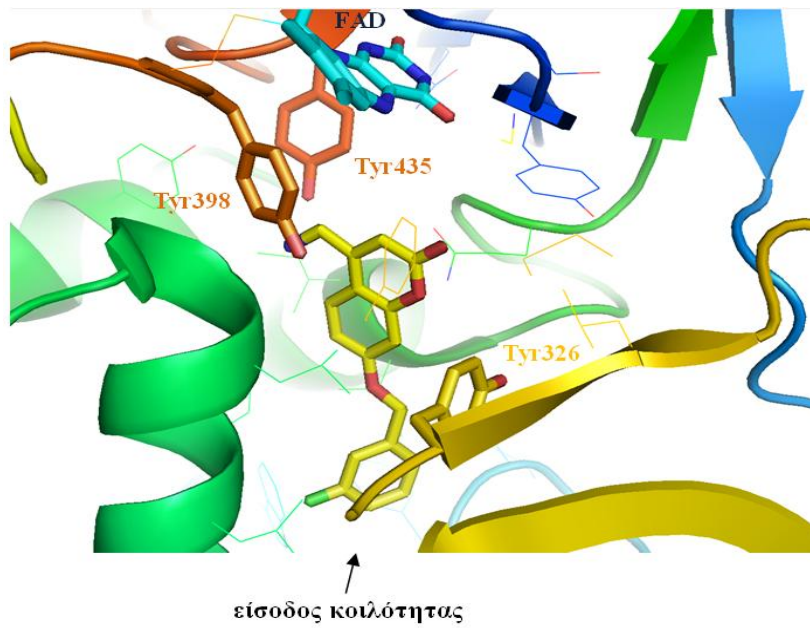
Για τη μελέτη επιλέχθηκε η ανθρώπινη MAO-B συγκρυσταλλωμένη με τον αναστολέα 7-(3-χλωροβενζυλοξυ)-4-(μεθυλοαμινο)μεθυλο-κουμαρίνη (Σχήμα 73) (κωδικός πρόσβασης 2V61⁹⁰ στη βάση κρυσταλλογραφικών δεδομένων των πρωτεϊνών RCSB).⁶⁰



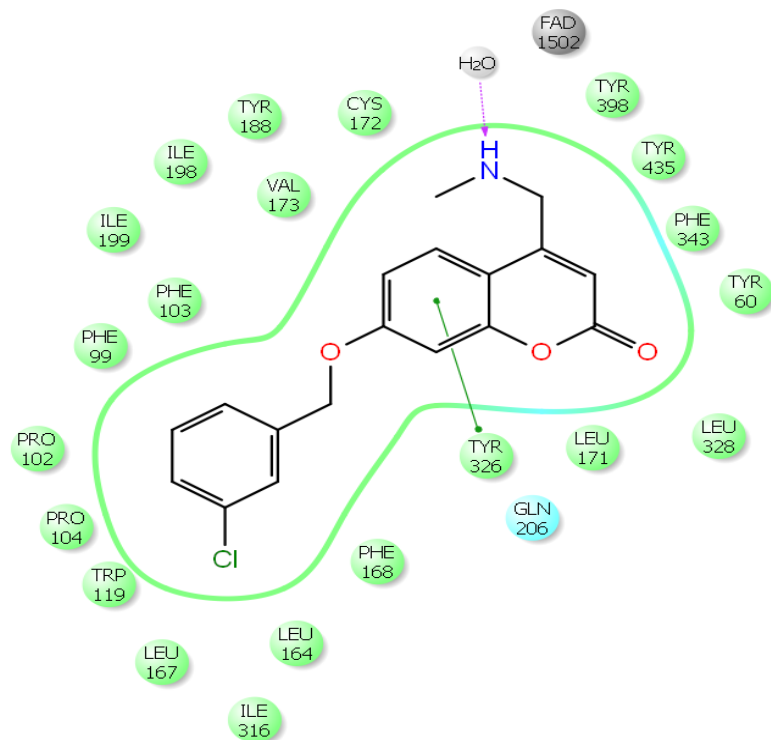
Σχήμα 74 Χημική δομή της 7-(3-χλωροβενζυλοξυ)-4-(μεθυλοαμινο)μεθυλο-κουμαρίνης

Στο Σχήμα 74 παριστάνεται ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Ο φαινολικός δακτύλιος εντοπίζεται στην κοιλότητα εισόδου, ενώ ο κουμαρινικός προσδένεται στην κοιλότητα του υποστρώματος με το οξυγόνο του πυρανικού δακτυλίου να κατευθύνεται στο αμινοξύ Tyr326. Ο υποκαταστάτης στη θέση 4 βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με τα αμινοξέα Tyr398 και Tyr435. Στο επάνω μέρος της κοιλότητας του υποστρώματος βρίσκεται προσδεμένο το αδενινικό δινουκλεοτίδιο της φλαβίνης (FAD), όπως έχει αναφερθεί και στην παράγραφο 2.3.

Η κοιλότητα του υποστρώματος είναι υδρόφοβη όπως παρατηρείται στο Σχήμα 75. Ένα μόριο νερού σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την ομάδα -NH του αναστολέα. Αρχικά, εξετάσθηκε η αξιοπιστία του προγράμματος μελετώντας την προσέγγιση του αναστολέα του ενζύμου 2V61 στο ενεργό κέντρο.

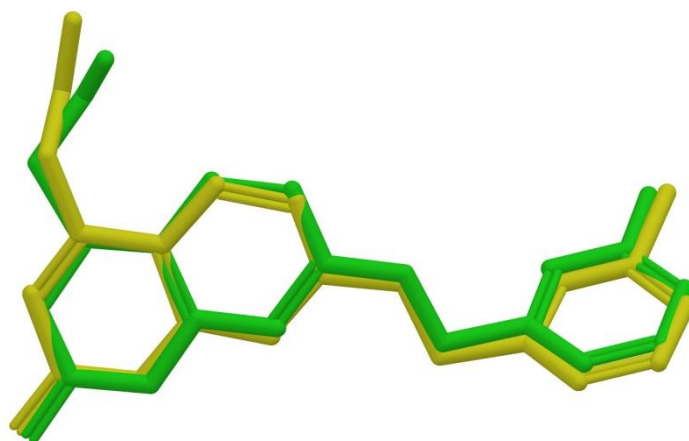


Σχήμα 75: Πρόσδεση της 7-(3-χλωροβενζυλοξυ)-4-(μεθυλοαμινο)μεθυλο-κουμαρίνης στο ενεργό κέντρο της MAO-B



Σχήμα 76: Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της 7-(3-χλωροβενζυλοξυ)-4-(μεθυλοαμινο)μεθυλο-κουμαρίνης με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου

Στο Σχήμα 76 εμφανίζεται η διαμόρφωση ένωσης όπως προέκυψε από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα και η προβλεπόμενη διαμόρφωση από το πρόγραμμα. Παρατηρήθηκε ότι η προβλεπόμενη διαμόρφωση και ο προσανατολισμός στο καταλυτικό κέντρο είχε RMSD=0,40 το οποίο εκφράζει χωρική εγγύτητα με αυτή της κρυσταλλογραφικής μελέτης. Η τιμή βαθμολόγησης της πρόσδεσης είναι (XP GScore: -11,529 kcal/mol).



Σχήμα 77 Διαμόρφωση του αναστολέα του 2V61 όπως προκύπτει από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα (πράσινο) σε σύγκριση με τη προβλεπόμενη διαμόρφωση (κίτρινο) από το πρόγραμμα Glide

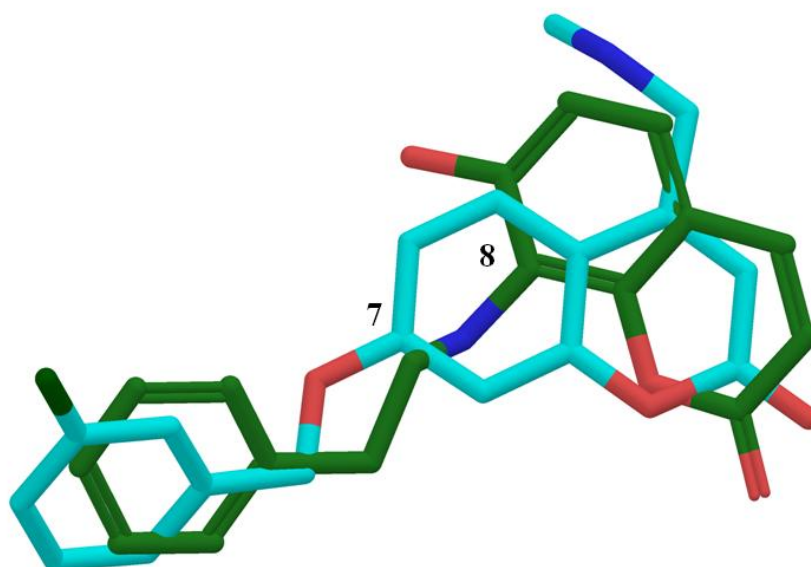
Στη συνέχεια μελετήθηκε η προσέγγιση των κουμαρινικών παραγώγων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Στον Πίνακα 8 παρατίθενται οι τιμές βαθμολόγησης της πρόσδεσης των προσδετών (XP GScore) στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

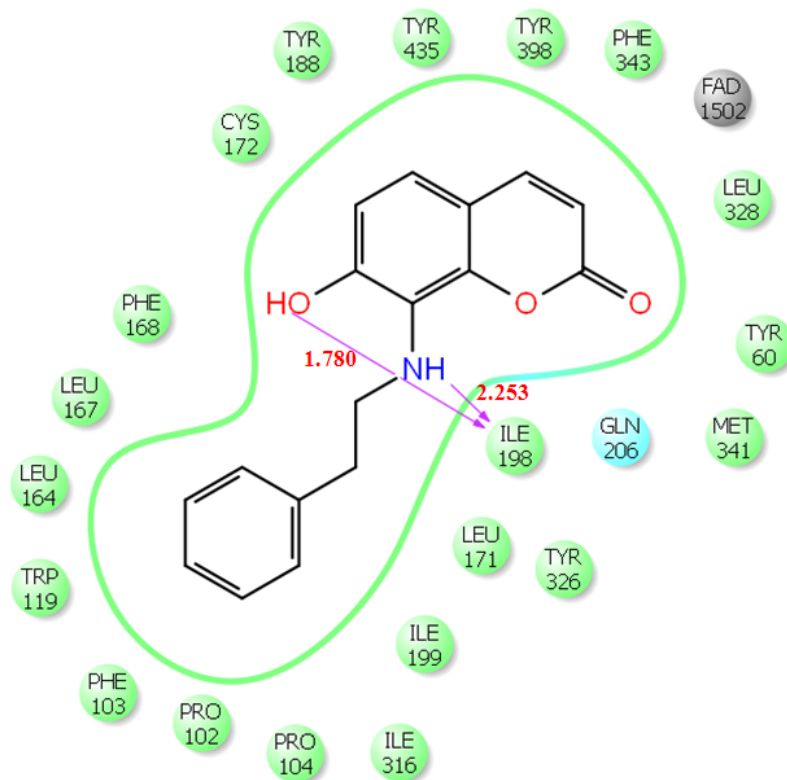
Στο Σχήμα 77 παρουσιάζεται η προβλεπόμενη διαμόρφωση της ένωσης **K9** με τη μεγαλύτερη τιμή βαθμολόγησης καθώς και η διαμόρφωση του αναστολέα του ενζύμου. Παρατηρείται ότι ο υποκαταστάτης της θέσεως 8 της **K9** εντοπίζεται στην είσοδο της κοιλότητας, εκεί ακριβώς που βρίσκεται και ο υποκαταστάτης της θέσεως 7 του αναστολέα της κρυσταλλογραφικής μελέτης.

Πίνακας 8: Τιμές βαθμολόγησης της πρόσδεσης των προσδετών (XP GScore) στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα

Ενώσεις	XP GScore (kcal/mol)
K9	-11,192
K4	-9,118
K5	-8,826
K8	-8,580
K6	-8,226
K12	-8,038
K1	-7,985
K16	-7,258
K10	-7,211
W1	-7,211
K17	-7,136
KOH	-6,907



Σχήμα 78: Προβλεπόμενη διαμόρφωση της ένωσης K9 (πράσινο) σε σύγκριση με τη διαμόρφωση του αναστολέα του ενζύμου (γαλάζιο)



Σχήμα 79: Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις του παραγώγου K9 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι δεσμοί υδρογόνου παριστάνονται με βέλη

Σ' αυτή τη θέση ο υποκαταστάτης σταθεροποιείται, εκτός των αλληλεπιδράσεων του με τα υδρόφοβα αμινοξέα: Leu171, Tyr326, Ile199, Ile316, Pro104, Pro102, Phe103, Trp119, Leu164, Leu167, Phe168, και με ένα δεσμό υδρογόνου που αναπτύσσεται μεταξύ του αμινοξέος Ile198 και της ομάδας –NH (Σχήμα 78).

Ο κουμαρινικός δακτύλιος καλύπτει το επάνω μέρος της κοιλότητας του υποστρώματος όπως και ο αναστολέας της κρυσταλλογραφικής μελέτης και βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με το FAD. Σχηματίζει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Cys172, Tyr188, Tyr435, Tyr398, Phe343, Leu328, Tyr60, Met341. Επίσης, το υδροξύλιο στη θέση 7 του κουμαρινικού δακτυλίου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Ile198 (Σχήμα 78).

Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης ήταν ενθαρρυντικά για τη βιολογική αποτίμηση των ενώσεων και για το λόγο αυτό εστάλησαν στο εργαστήριο της Dr. Dolores Viña του Τμήματος Φαρμακολογίας του Πανεπιστημίου του Σαντιάγο ντε Καμποστέλα για τη βιολογική τους αποτίμηση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Βιολογική αποτίμηση των κουμαρινικών παραγώγων

Ένωση	IC ₅₀ MAO-A (μM)	IC ₅₀ MAO-B (μM)
KOH	**	**
K1	**	**
K4	**	**
K5	**	7.39 ± 0.32
K6	**	**
K8	**	37.02 ± 2.47
K9	**	4.49 ± 0.30
K10	***	**
K12		N.D.
K16	N.D.	N.D.
K17	N.D.	N.D.
W1	**	21.97 ± 1.47
W4	N.D.	N.D.
Κλοργυλίνη	0.0052 ± 0.00092	63.41 ± 1.20
R-(-)-Δεπρενίλη	68.73 ± 4.21	0.017 ± 0.0019
Ιπρονιαζίδη	6.56 ± 0.76	7.54 ± 0.36
Μακλοβεμίδη	361.38 ± 19.37	*

Κάθε τιμή IC₅₀ είναι η μέση τιμή ± S.E.M. (Standard Error of the Mean) από πέντε πειράματα.

** Μη δραστικές ενώσεις σε 100 μM (υψηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι ενώσεις καθιζάνουν.

*** 100 μM προκαλούν 40-45% αναστολή της ενζυμικής δράσης. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι ενώσεις καθιζάνουν.

N.D. Δεν προσδιορίστηκε - (Not Determined)

Παρατηρήθηκε ότι τέσσερα κουμαρινικά παράγωγα: **K9**, **K5**, **W1**, **K8** παρουσίασαν ανασταλτική δράση. Η ένωση K9 με τη μεγαλύτερη τιμή βαθμολόγησης πρόσδεσης (XP GScore -11,192 kcal/mol) στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα εμφάνισε την ισχυρότερη ανασταλτική δράση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η Dr. Viña και οι συνεργάτες της έχουν μελετήσει εκτεταμένα την επίδραση διαφόρων υποκαταστατών του κουμαρινικού δακτυλίου όσο αφορά την ανασταλτική τους δράση με τη MAO-B.

Μία από τις μελέτες τους, που ήταν και πρωτοποριακή, αφορά τις 8-υποκαταστημένες 3-αρυλοκουμαρίνες.⁹¹

Η πιο δραστική ένωση με ένα μέθυλο υποκαταστάτη στη θέση 8 και μία μεθόξυ ομάδα στη θέση *para* του 3-αρυλοκουμαρινικού δακτυλίου εμφάνισε IC₅₀=0,003 μM. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους θα συγκριθούν με τα αποτελέσματα των δικών μας ενώσεων έτσι ώστε να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για τη σημαντικότητα της υποκατάστασης στη θέση 8 του κουμαρινικού δακτυλίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΠΟΛΥΣΤΟΧΕΥΜΕΝΟΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ALZHEIMER



8.1 Εισαγωγή

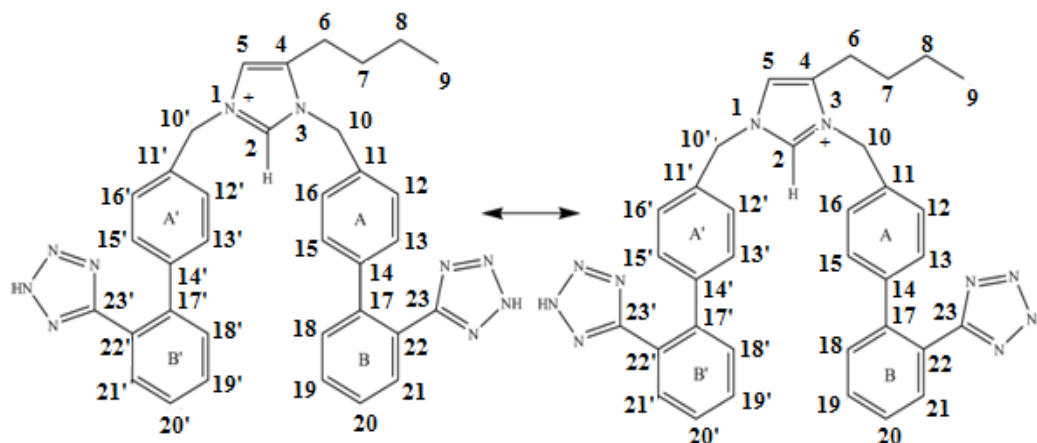
AT1 ανταγωνιστές που στοχεύουν πιθανά και κατά της BACE-1

Οι AT1 ανταγωνιστές είναι μία τάξη φαρμακευτικών μορίων κατά της υπέρτασης και δρουν παρεμποδίζοντας τις επιβλαβείς δράσεις της αγγειοσυσταλτικής πεπτιδικής ορμόνης Αγγειοτασίνης II στον AT1 υποδοχέα. Οι AT1 ανταγωνιστές εξασκούν ευεργετικές επιδράσεις που δεν περιορίζονται στις καρδιοαγγειακές ασθένειες. Έχει βρεθεί ότι εξασκούν αντιοξειδωτικές δράσεις και μπορούν να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στις νόσους Alzheimer και Parkinson.⁹²

Για το λόγο αυτό υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για να εξευρεθούν AT1 ανταγωνιστές που να παρουσιάζουν καλύτερο φαρμακολογικό προφίλ και φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Η εντατική ερευνητική δραστηριότητα στο πεδίο ανιχνεύεται από τα οκτώ φάρμακα της σειράς αυτής που κυκλοφορούν στο εμπόριο με την αζιλαρτάνη να έχει κυκλοφορήσει μόλις τον προηγούμενο χρόνο.

Το BV6 (4-βουτυλο-N,N'-(2H-τετραζολ-5-υλ)διφαινυλ-4υλ]μεθυλ]ιμιδαζολιο βρωμίδιο) είναι ένα συνθετικά και ορθολογικά σχεδιασμένο μόριο που παρασκευάζεται στην Ελλάδα από την τεχνοβλαστό εταιρία EL-DRUG το οποίο παρουσιάζει υψηλότερη δράση *in vitro* συγκριτικά με τη λοσαρτάνη ($-\log IC_{50} BV6=9,46$ και $-\log IC_{50}$ λοσαρτάνης 8,25)⁹³ (Σχήμα 80).

Το μόριο αποτελείται από γνωστά φαρμακοφόρα τμήματα που είναι ταυτόσημα με αυτά της λοσαρτάνης, ειδικότερα τα δύο διφαινυλοτετραζολικά τμήματα στο N-1 και N-3 του ιμιδαζολικού δακτυλίου και της βουτυλικής αλκυλικής αλυσίδας. Όμως, σε αντίθεση με τη λοσαρτάνη δεν περιέχει άτομο χλωρίου στον ιμιδαζολικό δακτύλιο. Η ισχυρότερή του δράση μπορεί να οφείλεται στον τρόπο που αλληλεπιδρά με τις λιπιδικές διπλοστιβάδες ή λόγω των επιπρόσθετων υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων που μπορεί να έχει με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Γι' αυτό αποτελεί ερευνητική πρόκληση η κατανόηση της μοριακής βάσης του μηχανισμού δράσης του στις λιπιδικές διπλοστιβάδες και υποδοχείς AT1 και BACE-1.



Σχήμα 80: Μοριακή δομή BV6

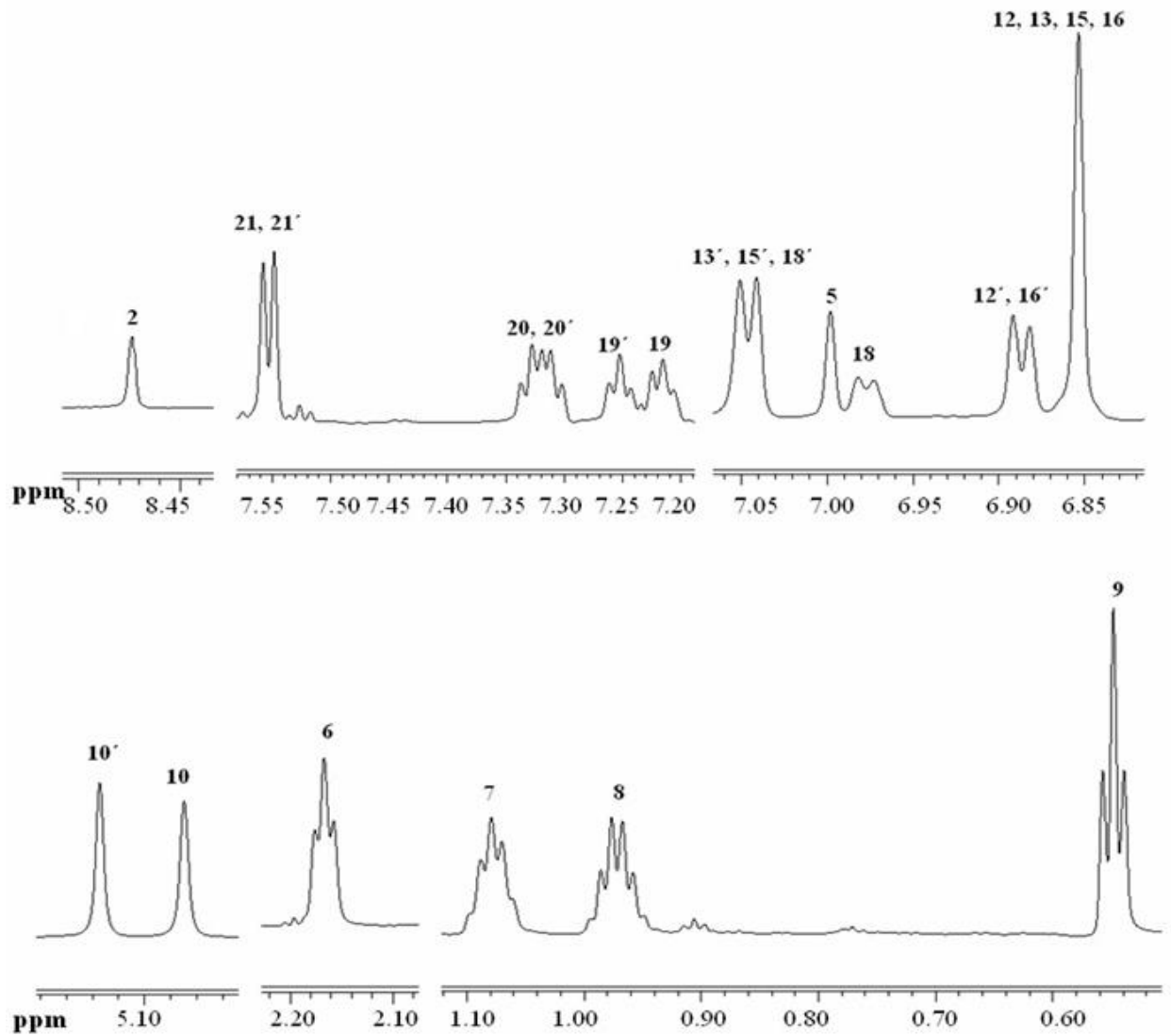
8.1.2 Ταυτοποίηση του μορίου BV6

Η χημική δομή του BV6 ταυτοποιήθηκε με συνδυασμό πειραμάτων 2D DQF-COSY και 2D ROESY πειράματα (Πίνακας 9). Η αλκυλική του αλυσίδα ταυτοποιήθηκε εύκολα από το πείραμα 2D DQF-COSY, την πολλαπλότητα των κορυφών και την ολοκλήρωσή τους (Σχήμα 81, Σχήμα 82). Λόγω της ασυμμετρίας του μορίου, τα αρωματικά πρωτόνια του διφαινυλίου έδειξαν διακριτές κορυφές οι οποίες επιβεβαιώθηκαν από την ολοκλήρωσή τους (προσέξτε ότι η αλκυλική αλυσίδα επεκτείνεται μόνο στη μία πλευρά του διφαινυλοτετραζολίου). Τα H10 και H10' πρωτόνια είναι μαγνητικά ανισοδύναμα και εμφανίζονται ως απλές κορυφές (Σχήμα 81). Το 2D DQF-COSY (Σχήμα 82) σε συνδυασμό με το 2D ROESY κατέστησαν δυνατή την ταυτοποίηση όλων των αρωματικών κορυφών. Στο 2D ROESY παρατηρήθηκε ότι το H10 είναι σε χωρική εγγύτητα με την απλή κορυφή στα 6,85 ppm, η οποία σύμφωνα με την ολοκλήρωση αντιστοιχεί σε τέσσερα πρωτόνια. Αυτά ταυτοποιήθηκαν ότι είναι τα H12, H13, H15 και H16 του αρωματικού δακτυλίου A (

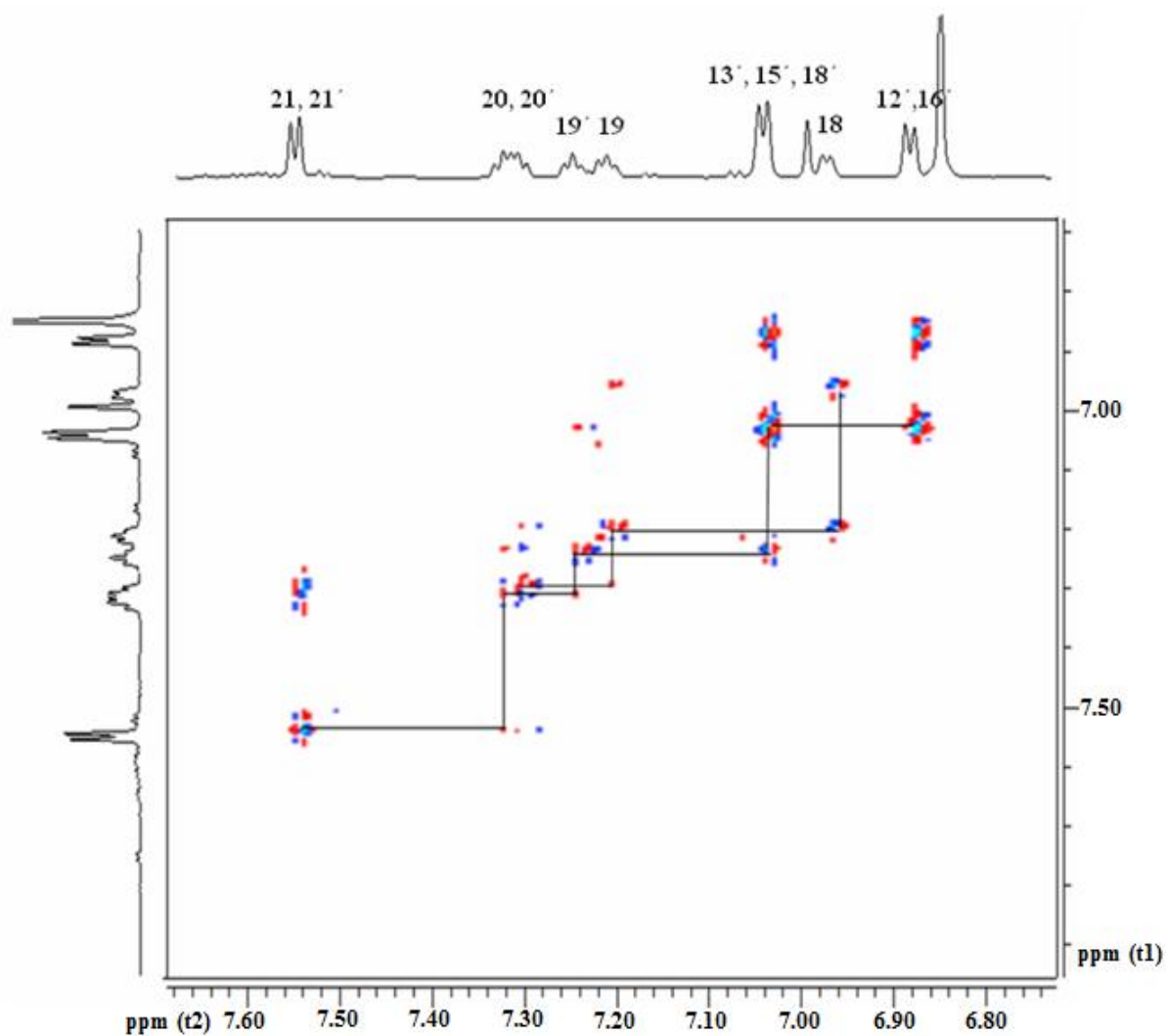
Σχήμα 83).

Πίνακας 10 Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μορίου BV6-Na σε διαλύτη D_2O . Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz Varian INOVA σε θερμοκρασία 25°C

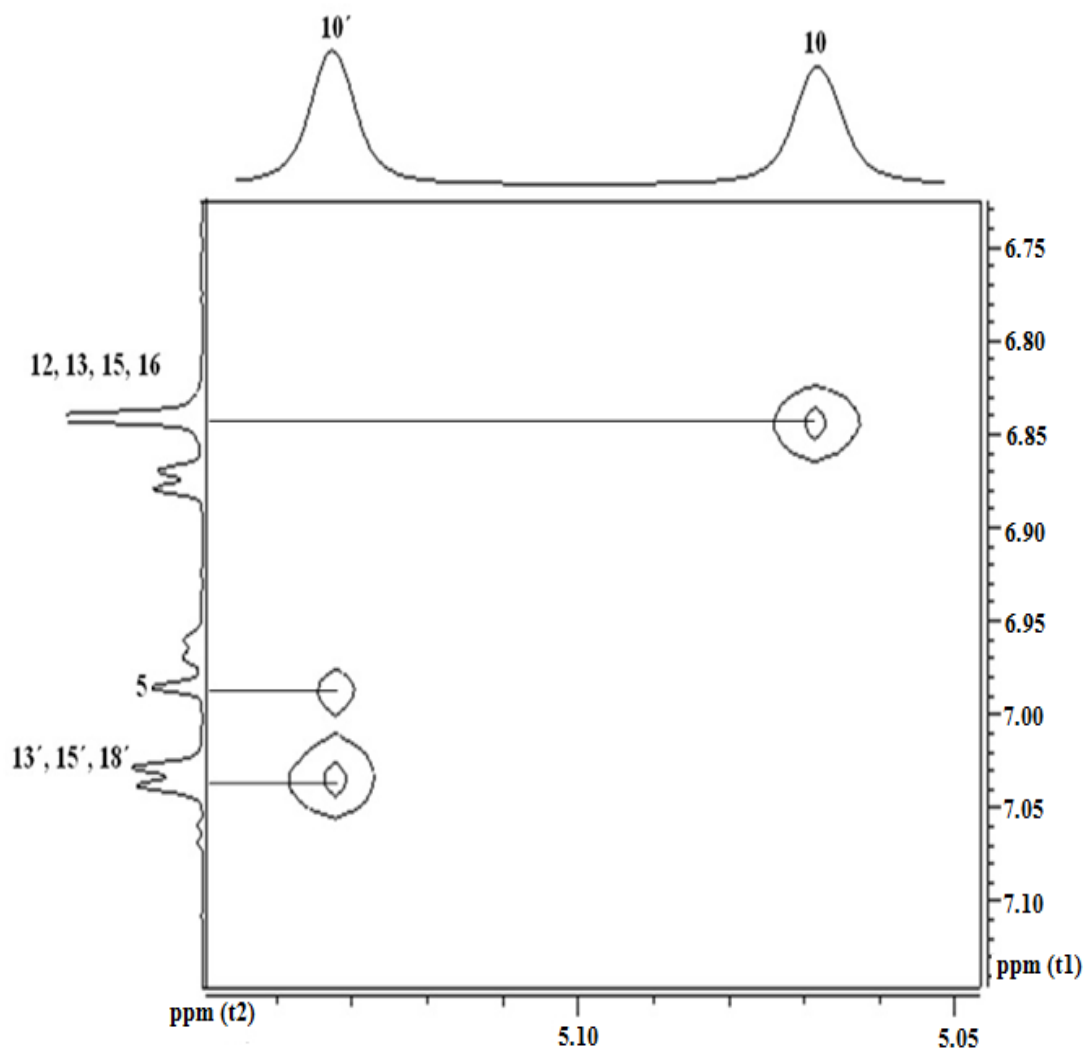
Υδρογόνα	Χημική μετατόπιση (ppm)	Αριθμός Υδρογόνων	Πολλαπλότητα
9	0,54	3	t
8	0,97	2	m
7	1,07	2	m
6	2,16	2	t
10	5,06	2	s
10'	5,13	2	s
12, 13, 15, 16	6,85	4	bs
12', 16'	6,86	2	d
18	6,97	1	d
5	6,99	1	s
13' και 15', 18'	7,04	3	d
19	7,21	1	t
19'	7,25	1	t
20, 20'	7,31	2	m
21, 21'	7,55	2	d
2	8,47	1	s



Σχήμα 81: ^1H NMR φάσμα του BV6-Na σε διαλύτη D_2O διαχωρισμένο σε έξι περιοχές για την καλύτερη παρουσίαση. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz

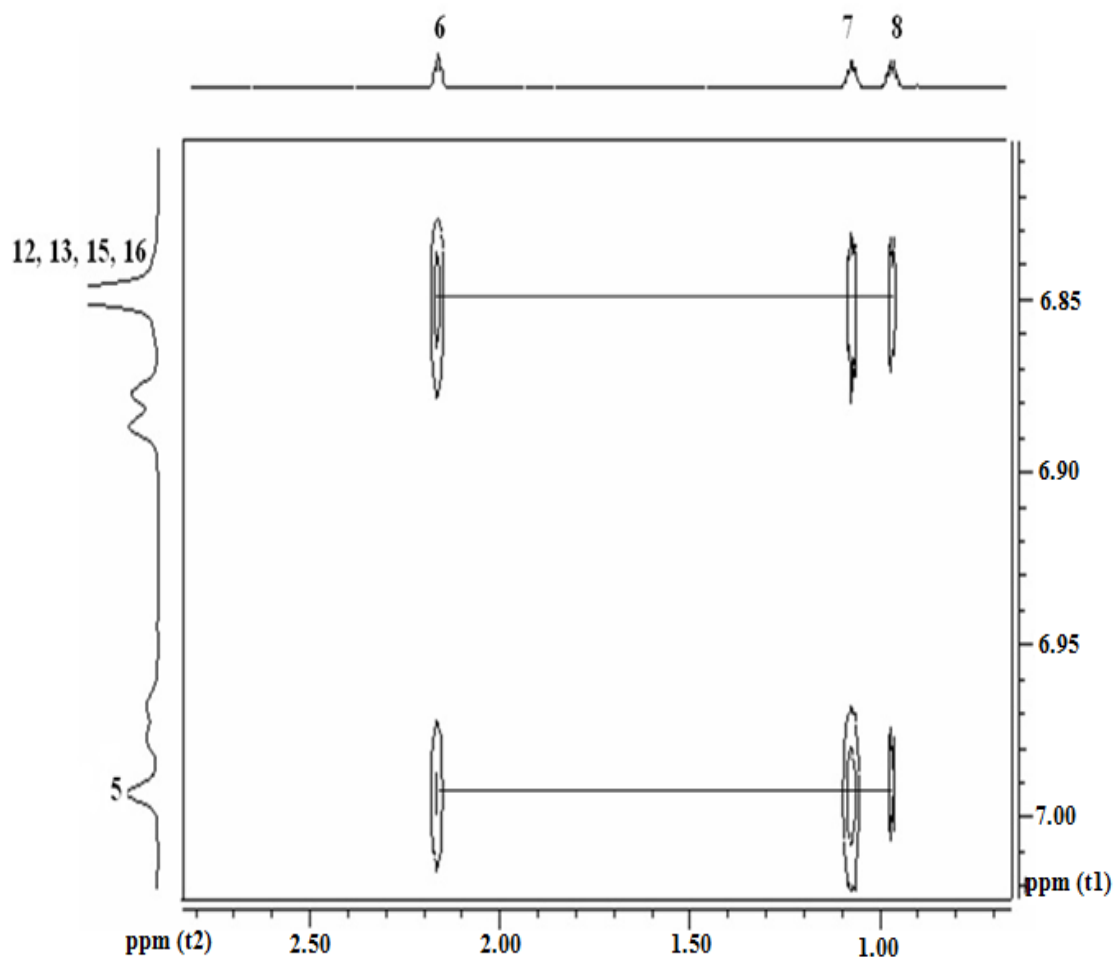


Σχήμα 82: Η αρωματική περιοχή του 2D DQF-COSY φάσματος του BV6-Na σε διαλύτη D₂O. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz Varian INOVA σε θερμοκρασία 25°C



Σχήμα 83: Μεγεθυμένη περιοχή φάσματος 2D ROESY φάσματος του BV6-Na σε διαλύτη D₂O. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz Varian INOVA σε θερμοκρασία 25°C. Σε αυτό δείχνεται η σχέση μεταξύ H10 και του φαινυλικού δακτυλίου A και H10' με το φαινυλικό δακτύλιο A' και H2

Στο φάσμα 2D ROESY (Σχήμα 84) παρατηρήθηκε επίσης ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στα τέσσερα πρωτόνια είναι σε χωρική εγγύτητα με τα πρωτόνια της αλκυλικής αλυσίδας H6, H7 και H8 (Σχήμα 84). Όμοια για το H10' παρατηρήθηκε ROE με τη διπλή κορυφή στα 7,04 ppm η οποία οφειλόταν στα πρωτόνια 13', 15' και 18' (Σχήμα 82).



Σχήμα 84: Μεγεθυμένη περιοχή του φάσματος 2D ROESY του BV6-Na σε διαλύτη D₂O. Το φάσμα έχει ληφθεί σε φασματογράφο 800 MHz Varian INOVA σε θερμοκρασία 25°C. Στο φάσμα δείχνεται η σχέση μεταξύ H6, H7 και H8 και των πρωτονίων του φαινυλικού δακτυλίου A και του H2 με τα πρωτόνια H6, H7 και H8

Με τη λήψη του φάσματος 2D DQF-COSY επιβεβαιώθηκε αυτή η ταυτοποίηση. Η διπλή κορυφή η οποία συντονίζεται στα 6,86 ppm ταυτοποιήθηκε ως τα 12' και 16' πρωτόνια και σχετίζεται μέσω δεσμού με τη

διπλή κορυφή που συντονίζεται στα 7,04 ppm. Τέτοιος συσχετισμός παρατηρήθηκε και στη λοσαρτάνη που περιέχει το δομικό τμήμα του διφαινυλοτετραζολίου.⁹⁴ Η ολοκλήρωση της διπλής κορυφής δείχνει την ύπαρξη τριών πρωτονίων, επομένως το τρίτο ταυτοποιείται ως το H18'. Αυτό γιατί το H18' συσχετίζεται με την τριπλή κορυφή που εντοπίζεται στα 7,25 ppm και ταυτοποιείται ως το H19'. Αντίστοιχα, το H19' συσχετίζεται με μια πολλαπλή στα 7,31 ppm που ταυτοποιείται ως το H20, η οποία σχετίζεται με μια διπλή κορυφή στα 7,55 ppm που αυτή ταυτοποιείται ως το H21'. Η διπλή κορυφή που συντονίζεται στα 7,55 ppm ολοκληρώνεται σε δύο πρωτόνια και ταυτοποιείται στα πρωτόνια 21, 21'. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά που έχουν ληφθεί για τη λοσαρτάνη. Επιπρόσθετα, τα πρωτόνια αυτά αναμένεται να είναι τα πιο αποπροστατευμένα μαγνητικά γιατί είναι σε χωρική εγγύτητα με τον τετραζολικό δακτύλιο. Τα πρωτόνια των δύο δακτυλίων B και B' έχουν ταυτόσημα ή σχεδόν ταυτόσημες χημικές μετατοπίσεις επειδή βρίσκονται μακριά από τη βουτυλική αλυσίδα η οποία διαφοροποιεί το περιβάλλον των αρωματικών δακτυλίων A και A'.

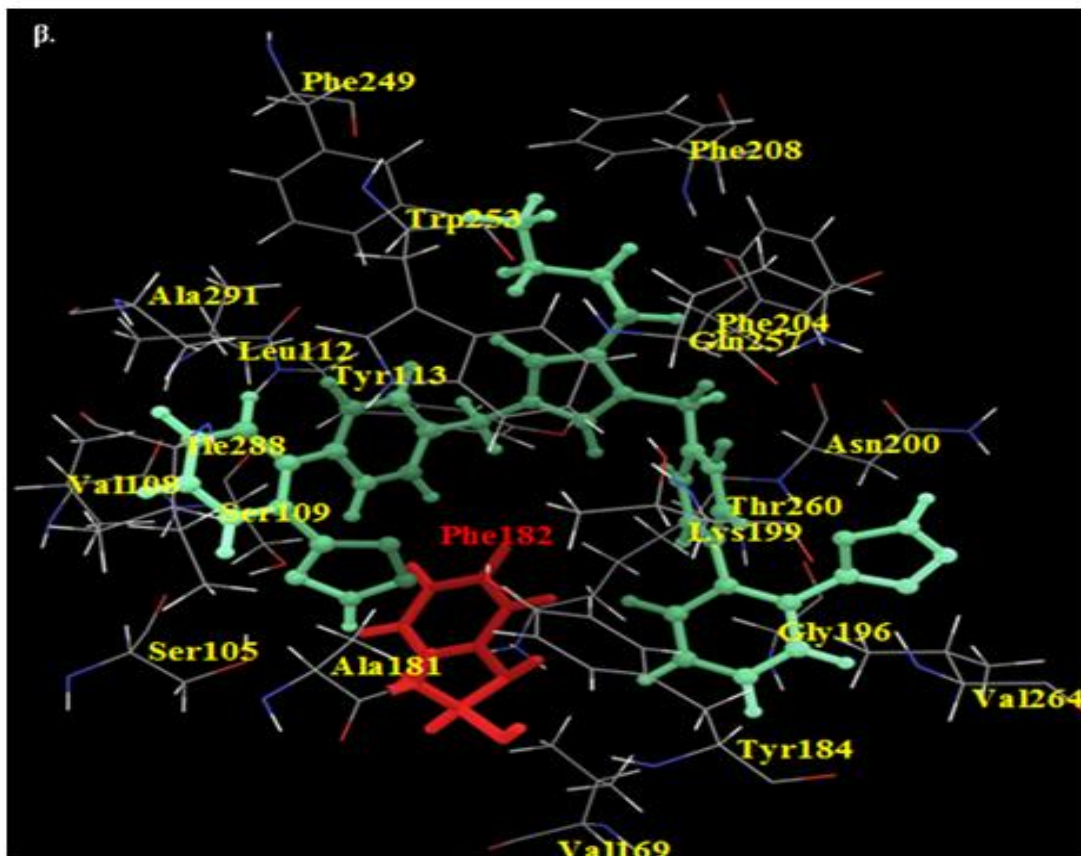
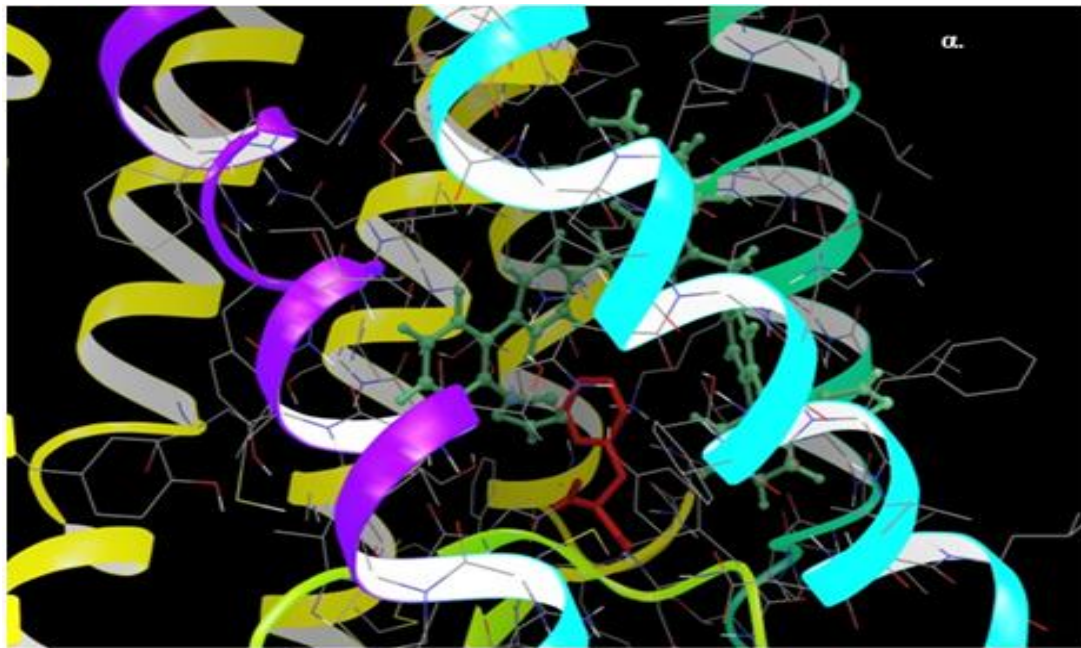
Η ευρεία κορυφή στα 6,99 ppm δεν έχει σύζευξη μέσω δεσμού. Το πείραμα 2D ROESY αναδεικνύει ότι η κορυφή αυτή συσχετίζεται χωρικά με το H10' και με τα πρωτόνια της αλκυλικής αλυσίδας H6, H7 και H8. Η κορυφή αυτή ταυτοποιείται ως το H5 του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Τα δύο διαφορετικά φάσματα λόγω των διφαινυλικών δακτυλίων παρατηρήθηκαν και σε προηγούμενες μας μελέτες σε εμπορικά διαθέσιμα και συνθετικά ανάλογα ARBs. Στη λοσαρτάνη,⁹⁴ βαλσαρτάνη⁹⁵ και επροσαρτάνη⁹⁶ ο δακτύλιος A δείχνει καθαρά δύο διπλές κορυφές που είναι κοινές σε 1,4-δισ υποκατεστημένες αρωματικές ενώσεις. Όμως, το συνθετικό ανάλογο V8 δείχνει μια απλή κορυφή που ταυτοποιείται στον ίδιο δακτύλιο.^{97,98} Είναι εμφανές ότι η ισοδυναμία των πρωτονίων εξαρτάται από το περιβάλλον του διφαινυλοτετραζολίου. Μια μικρή κορυφή που συντονίζεται στα 8,47 ppm είναι η παραμένουσα κορυφή και ταυτοποιείται ως H2. Αυτό συντονίζεται στο χαμηλότερο πεδίο γιατί βρίσκεται μεταξύ δύο αζώτων.

8.1.3 Μοριακή Πρόσδεση στον AT1 υποδοχέα

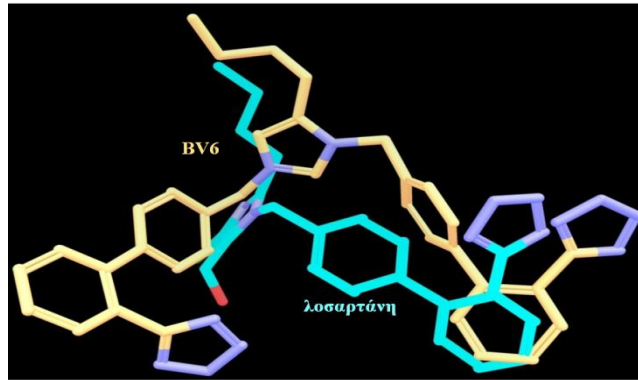
Η σύνθεση του BV6 και των παράγωγων του βασίστηκε σε μελέτες μοριακής πρόσδεσης. Οι μελέτες πρόσδεσης του BV6 στον υποδοχέα AT1 και των αλληλεπιδράσεων του με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος. Στο Σχήμα 85 απεικονίζεται η βέλτιστη θέση πρόσδεσης του BV6 στο ενεργό κέντρο του AT1 (Glide Gscore=-16,21 kcal/mol) με τις υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές γύρω από το μόριο. Οι δύο διφαινυλομάδες προσανατολίζονται στην ευρέως εκτεταμένη υδρόφοβη περιοχή, ενώ η υδρόφιλη περιοχή περιβάλλει κυρίως τον δακτύλιο του ιμιδαζολίου και είναι λιγότερο εκτεινόμενη γύρω από το τετραζόλιο.

Υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιώντας το ίδιο πρόγραμμα και το πρωτόκολλο έχουν επισημάνει την ευνοϊκότερη θέση πρόσδεσης της λοσαρτάνης στο ενεργό κέντρο⁵³. Η λοσαρτάνη, σε σύγκριση με το BV6, είναι προσδεδεμένη στο ενεργό κέντρο με μικρότερη ενέργεια πρόσδεσης (Glide Gscore=-12,30 kcal/mol), γεγονός που δικαιολογεί τη μείωση της ανασταλτικής της δράσης. Στο Σχήμα 86 απεικονίζονται οι βέλτιστες προβλεπόμενες διαμορφώσεις του BV6 και της λοσαρτάνης που προκύπτουν από το πρόγραμμα. Οι δύο προσδέτες δείχνουν παρόμοιο προσανατολισμό στη θέση πρόσδεσης του AT1 εκτός από τη διφαινυλομάδα του τετραζολίου (βλ. A, B δακτύλιοι) του BV6. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το πρόσθετο αυτό λιπόφιλο τμήμα βρίσκεται σε μια λιπόφιλη κοιλότητα που περιβάλλεται από τα αμινοξέα Leu112, Ala181, Phe182, Ile288, Ala291. Αυτές οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι υπεύθυνες για την αυξημένη ενέργεια πρόσδεσης του BV6 σε σύγκριση με τη λοσαρτάνη. Η ικανότητα αυτή του BV6 να βρίσκεται σε μία επιπλέον κοιλότητα προκάλεσε το ενδιαφέρον μας για τη σύνθεση νέων φαρμάκων.

Η σύνθεση αυτού του μορίου και των παραγώγων του δείχνει ότι η συνεργασία της φαρμακευτικής και της υπολογιστικής χημείας μπορεί να οδηγήσει σε νέες ιδέες για τον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων ενώσεων με βελτιστοποιημένη βιολογική δράση, λαμβάνοντας υπόψη τον προσανατολισμό των φαρμακοφόρων και των φορτίων.



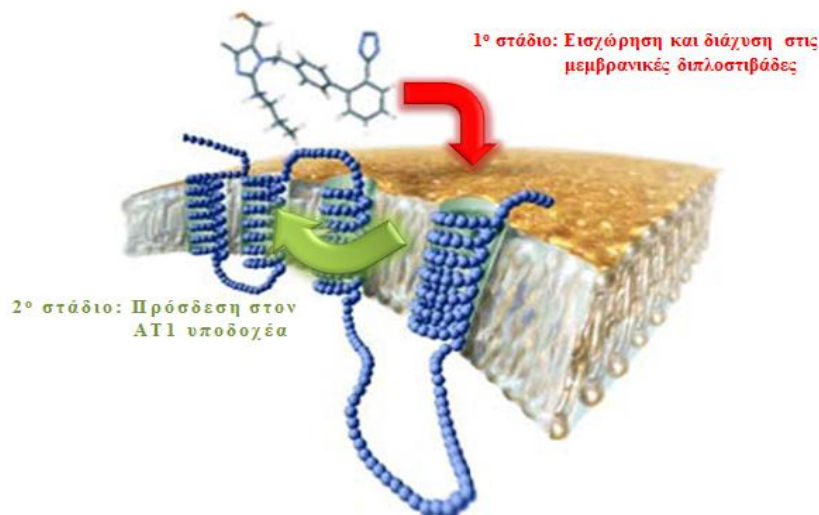
Σχήμα 85: α, β Θέση πρόσδεσης του BV6 στο ενεργό κέντρο του AT1. Το αμινοξύ Phe 249 (κόκκινο χρώμα) είναι τοποθετημένο μεταξύ των διφαινυλομαδών του τετραζολίου του BV6



Σχήμα 86: Σύγκριση της διαμόρφωσης της λοσαρτάνης με τη διαμόρφωση του BV6 που προκύπτουν από τη μοριακή πρόσδεση

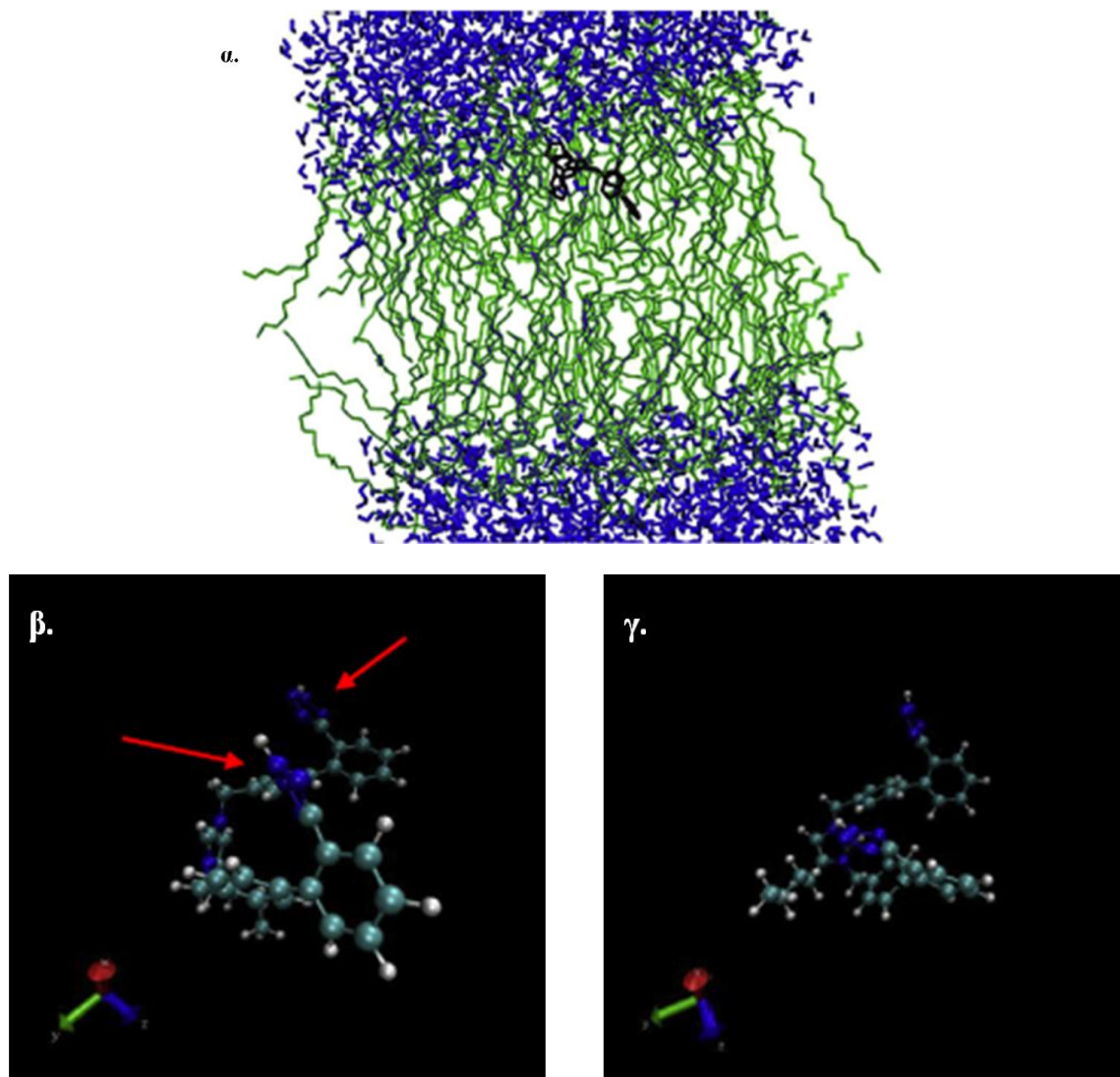
8.4 Μοριακή Δυναμική

Ο Ζουμπουλάκης και οι συνεργάτες του πρότειναν τον πιο κάτω μηχανισμό για τα αμφίφιλα μόρια AT₁ ανταγωνιστές⁹⁹ (Σχήμα 87). Το φαρμακευτικό μόριο εισέρχεται στο εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας και με πλευρική διάχυση προσεγγίζει και προσδένεται στον υποδοχέα. Είναι λοιπόν απαραίτητο για να κατανοηθεί η βιολογική του δράση να εξετασθούν οι αλληλεπιδράσεις του με τη λιπιδική διπλοστιβάδα.



Σχήμα 87: Το πρώτο βήμα αλληλεπίδρασης AT₁ ανταγωνιστών με τους υποδοχείς AT₁ περιλαμβάνει την εισχώρησή τους στις λιπιδικές διπλοστιβάδες. Εκεί διαχέονται πλευρικά προς το ενεργό κέντρο όπου μέσω αμφοτερικών αλληλεπιδράσεων ενεργοποιούν τον υποδοχέα και τελικά αναστέλλουν τη δράση της αγγειοδιασταλτικής ορμόνης αγγειοτασίνης II.

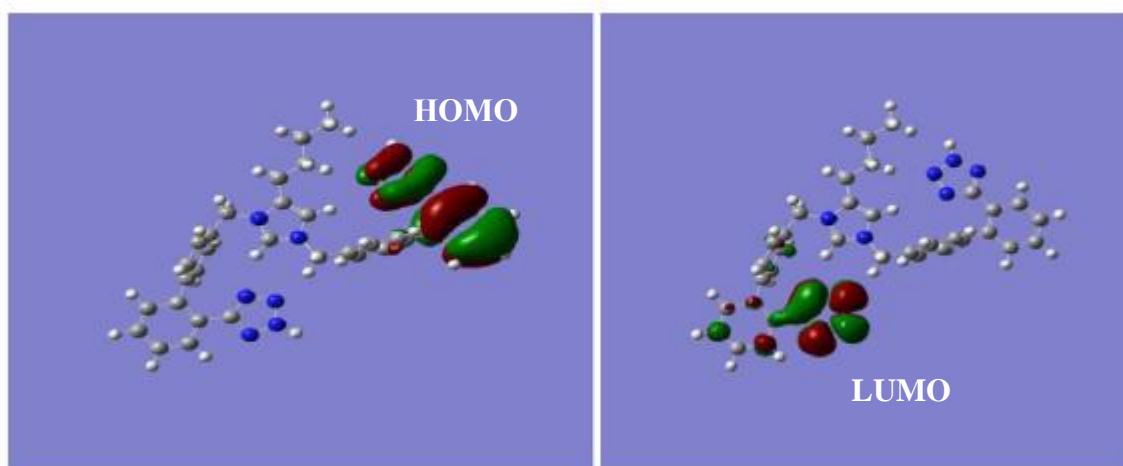
Με χρήση Μοριακής Δυναμικής σε σύστημα λιπιδικών διπλοστιβάδων βρέθηκε η τοπογραφική του θέση και ο προσανατολισμός του στη λιπιδική διπλοστιβάδα καθώς και οι ενεργειακά ευνοϊκότερες του διαμορφώσεις. Εντοπίζεται στο ενδιάμεσης πολικότητας τμήμα, μεταξύ της πολικής κεφαλής και του άνω υδρόφοβου τμήματος. Ο ίδιος τοπογραφικός εντοπισμός έχει βρεθεί και για άλλα εμπορικά διαθέσιμα φάρμακα που δρουν ως AT1 ανταγωνιστές (Σχήμα 88).^{99,100,51,101,93}



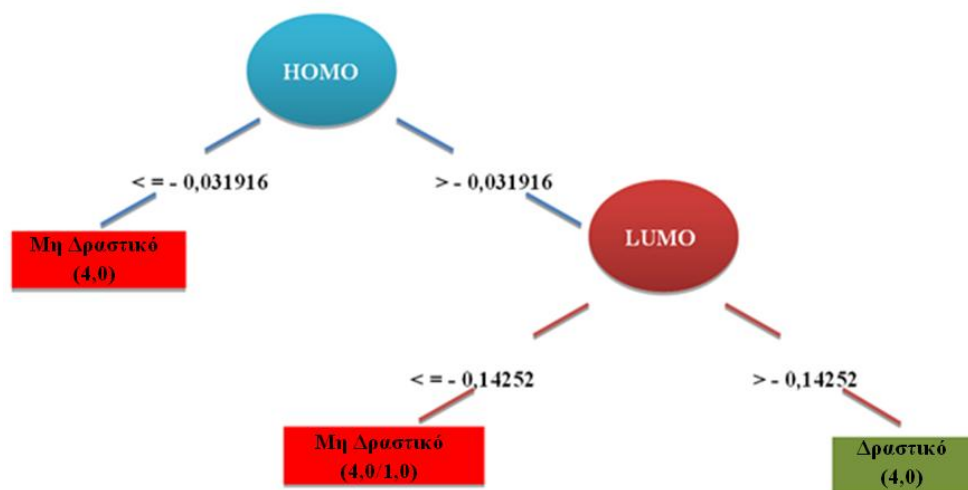
Σχήμα 88: α. Γραφική παρουσίαση του συστήματος προσομοίωσης του BV6-Na όταν ενσωματώνεται στις λιπιδικές διπλοστιβάδες διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης. Στα σχήματα β. και γ. παριστάνονται οι σταθερότερες διαμορφώσεις που προσαρμόζει το μόριο BV6-Na κατά τον τοπογραφικό εντοπισμό του στις λιπιδικές διπλοστιβάδες

8.5 E_{HOMO} και E_{LUMO} ΤΟΥ BV6

Υπολογίστηκε το HOMO-LUMO του BV6 και μιας σειράς παραγώγων του (Σχήμα 89). Βρέθηκε ότι για τα παράγωγα αυτά θα έπρεπε να πληρούν τις σχέσεις που δείχνονται στο Σχήμα 90. Οι τιμές HOMO και LUMO για το BV6 ήταν -0,3185 και -0,1449 αντίστοιχα που πληρούσαν αυτές τις προϋποθέσεις.⁹³



Σχήμα 89: HOMO και LUMO τροχιακά του μορίου BV6



Σχήμα 90: Δενδρόγραμμα με τη χρήση του οποίου αποφασίζεται η κατάταξη των παραγώγων του BV6 σε δραστικά ή μη δραστικά ανάλογα

8.6 Λιποφιλικότητα του BV6

Πίνακας 11: Τιμές logP του BV6 και των AT1 ανταγωνιστών που αποτελούν φαρμακευτικά προϊόντα. Οι τιμές υπολογίστηκαν με χρήση του προγράμματος ALOGPS 2.1¹⁰²

	logP
Λοσαρτάνη	4,50
Καντεσαρτάνη	4,02
Ιρμπεσαρτάνη	4,51
Βαλσαρτάνη	3,68
Ολμεσαρτάνη	1,79
Ασιλσαρτάνη	4,50
Τελμισαρτάνη	6,66
Τασοσαρτάνη	3,07
BV6	5,70

Η λιποφιλικότητα του BV6 είναι παρόμοια με αυτή των άλλων AT1 ανταγωνιστών όπως παρατηρείται στον πιο κάτω Πίνακα 10.

8.7 Αλληλεπιδράσεις BV6 με λιπιδικές διπλοστιβάδες με χρήση Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης, Φασματοσκοπίας Raman και Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Στερεάς Κατάστασης

A. Πειράματα Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης

Η Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry-DSC), χρησιμοποιείται για τη μελέτη των μεταβάσεων. Με τον όρο μεταβάσεις περιγράφονται οι μεταβολές που πραγματοποιούνται σε ένα σώμα όταν αυτό

θερμαίνεται ή ψύχεται. Για παράδειγμα η θέρμανση μια λιπιδικής διπλοστιβάδας που παρουσιάζει πολυμορφισμό και βρίσκεται στη φάση πηκτής (gel phase) είναι μία θερμική μετάβαση, ενώ η ψύξη της υγροκρυσταλλικής λιπιδικής διπλοστιβάδας (liquid crystalline phase) είναι μία ψυκτική μετάβαση.

Οι χρήσιμες παράμετροι μίας ενδόθερμης ή εξώθερμης καμπύλης που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι οι ακόλουθες:

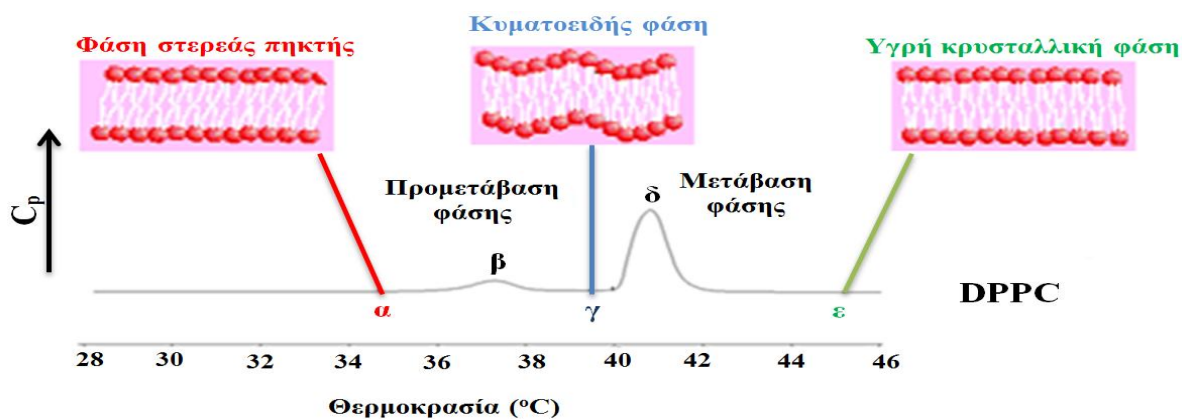
- Θερμοκρασία μετασχηματισμού φάσης T_m . Είναι η θερμοκρασία στην οποία η ειδική θερμοχωρητικότητα C_p έχει τη μέγιστη τιμή της. Για μία συμμετρική καμπύλη η T_m αντιπροσωπεύει τη θερμοκρασία στην οποία η μετάβαση (π.χ. από τη στερεή στην υγρή-κρυσταλλική φάση) έχει κατά το ήμισυ ολοκληρωθεί.
- Θερμοκρασία στην οποία αρχίζει ο θερμικός μετασχηματισμός (*Tonset*).
- Το ημίσειο εύρος της καμπύλης $T_{m1/2}$.
- Το εμβαδόν που περικλείεται από την καμπύλη, το οποίο αντιστοιχεί στην ενθαλπία μετασχηματισμού (ΔH) εκφράζεται σε kcal/mol ή σε J/g.

Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι σύμπλοκα συστήματα που αποτελούνται από διάφορα είδη πρωτεϊνών και λιπιδίων όπως επίσης και το βιοδραστικό μόριο της χοληστερόλης. Οι φωσφατιδυλοχολίνες είναι τα πιο άφθονα απαντώμενα είδη λιπιδίων στις μεμβράνες του καρδιακού σαρκειλήμματος. Οι σε μεγαλύτερη αφθονία φωσφατιδυλοχολίνες είναι αυτές που έχουν λινολεϊκές, ελαϊκές ή διπαλμιτικές αλυσίδες. Πειραματικά, τα ενυδατωμένα λιπίδια της διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης προτιμούνται, επειδή αυθόρμητα σχηματίζουν πολυκυστιδικές διπλοστιβάδες των οποίων οι μεσομορφικές μεταβολές επιτυγχάνονται σε θερμοκρασιακό εύρος 25-50 °C. Οι δυναμικές και θερμοκρασιακές ιδιότητες έχουν εκτενώς μελετηθεί και ο συντελεστής κατανομής ειδικότερα στη ρευστή κατάσταση μοιάζει με τις φυσικές καρδιακές μεμβράνες. Οι διπλοστιβάδες φωσφατιδυλοχολινών σε χαμηλές θερμοκρασίες βρίσκονται στη φάση πηκτής (L_β') και σε υψηλότερες θερμοκρασίες στην υγρή

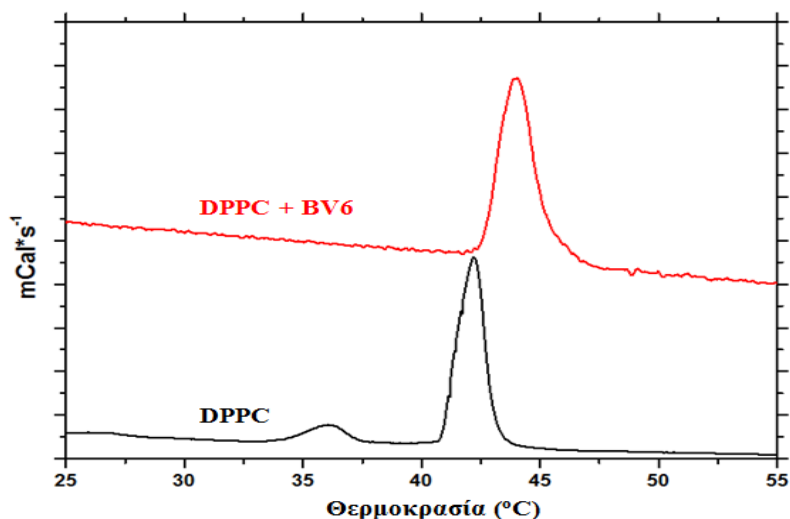
κρυσταλλογραφική φάση (L_{α}). Η αλλαγή φάσης συνοδεύεται με αρκετές δομικές αλλαγές στα λιπιδικά μόρια όπως επίσης με συστηματική αλλαγή στη γεωμετρία της λιπιδικής διπλοστιβάδας, για παράδειγμα *trans:gauche* ισομερισμό που λαμβάνει μέρος στην αλκυλική αλυσίδα. Ο *trans:gauche* ισομερισμός δεν εξαρτάται μόνο από το είδος του λιπιδίου αλλά και από το φαρμακευτικό μόριο που διαταράσσει με την εισδοχή του το πακετάρισμά τους.

Όλο και περισσότερο κατανοείται ότι τα φάρμακα σχηματίζουν μικροπεριοχές που ρυθμίζουν τη δράση των πρωτεϊνών και έτσι προσφέρουν νέες οδούς στη μεμβρανική λιπιδική θεραπεία. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα για τις αλληλεπιδράσεις φαρμάκων:μεμβράνης είναι οι β αδρενεργικοί αγωνιστές ινδακεταρόλη και σαλματερόλη που χαρακτηρίζονται από διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες. Βρέθηκε, ότι η συνέργεια μεταξύ της περισσότερο λιπόφιλης ινδακεταρόλης σε μικροπεριοχές που περιέχουν χοληστερόλη και της ταχύτερης διαπερατότητας της στη μεμβράνη, οδηγούσε σε ταχύτερο χρόνο και ισχυρότερη θεραπευτική δράση. Αντίθετα, η σαλματερόλη επειδή εξασκούσε ισχυρή δράση στη ρευστότητα είχε λιγότερη θεραπευτική δράση. Άλλες μελέτες θεώρησαν ότι τα δραστικά φάρμακα μεταβάλλουν την πλευρική πίεση και επιδρούν στις ιδιότητες των πρωτεϊνών. Ως συνέπεια αυτής της δράσης κάθε φάρμακο εξασκεί ένα ειδικό αποτύπωμα όταν αλληλεπιδρά με τις μεμβράνες. Με αυτό το σκεπτικό στο εργαστήριο μας μελετήθηκαν ήδη οι εμπορικοί ανταγωνιστές (βαλσαρτάνη, ολμεσαρτάνη, CV-11974 και TCV-116).^{100,51,101,93} Τα αποτελέσματα των ερευνητικών αυτών μελετών προάγουν την επιστημονική γνώση όσο αφορά τη δράση της τάξης των σαρτανών στις κυτταρικές μεμβράνες. Στο Σχήμα 91 παρουσιάζονται διάφορες μεσομορφικές καταστάσεις μιας λιποειδούς διπλοστιβάδας διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης σε ένα θερμογράφημα DSC. Στο Σχήμα 92 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα της λιποειδούς διπλοστιβάδας διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης με ή χωρίς την ενσωμάτωση του BV6. Η ενσωμάτωση του BV6 επιφέρει αύξηση της θερμοκρασία φάσης μετασχηματισμού. Αυτή η ιδιότητα δεν έχει παρατηρηθεί στις προηγούμενες μελέτες.^{100,51,101,93} Επίσης επιφέρει διαπλάτυνση της κύριας φάσης

μετασχηματισμού και απαλοιφή της προμετάβασης φάσης μετασχηματισμού (της μικρής φάσης μετασχηματισμού που προηγείται της κύριας φάσης). Τα πειράματα αυτά της Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης προτείνουν ότι η εισδοχή του BV6 στις λιποειδείς διπλοστιβάδες DPPC επάγει την οργάνωσή τους. Το φάρμακο εντοπίζεται να προκαλεί μεταβολές στην πολική φάση (αφού απαλείφει την προμετάβαση που είναι πολύ ευαίσθητη στις αλλαγές του περιβάλλοντος της πολικής κεφαλής).^{103,104}



Σχήμα 91: Μετάβαση φάσης λιπιδικής διπλοστιβάδας DPPC, όπως καταγράφεται με Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης: (α) φάση στερεάς πηκτής (gel phase), (β) προμετάβαση φάσης (pretransition phase), (γ) κυματοειδής φάση (ripple phase), (δ) μετάβαση φάσης (transition phase), (ε) υγρή κρυσταλλική φάση (liquid phase)



Σχήμα 92: Διαφορικά θερμογραφήματα σάρωσης λιποειδών διπλοστιβάδων DPPC (κάτω) και των ίδιων διπλοστιβάδων που περιέχουν μοριακή αναλογία BV6 20%

B. Πειράματα φασματοσκοπίας Raman

Η ιδιότυπη αυτή ιδιότητα του ΒV6 επιβεβαιώθηκε και με τη φασματοσκοπία Raman.¹⁰⁴ Με τη φασματοσκοπία Raman μελετώνται διάφοροι λόγοι όπως:

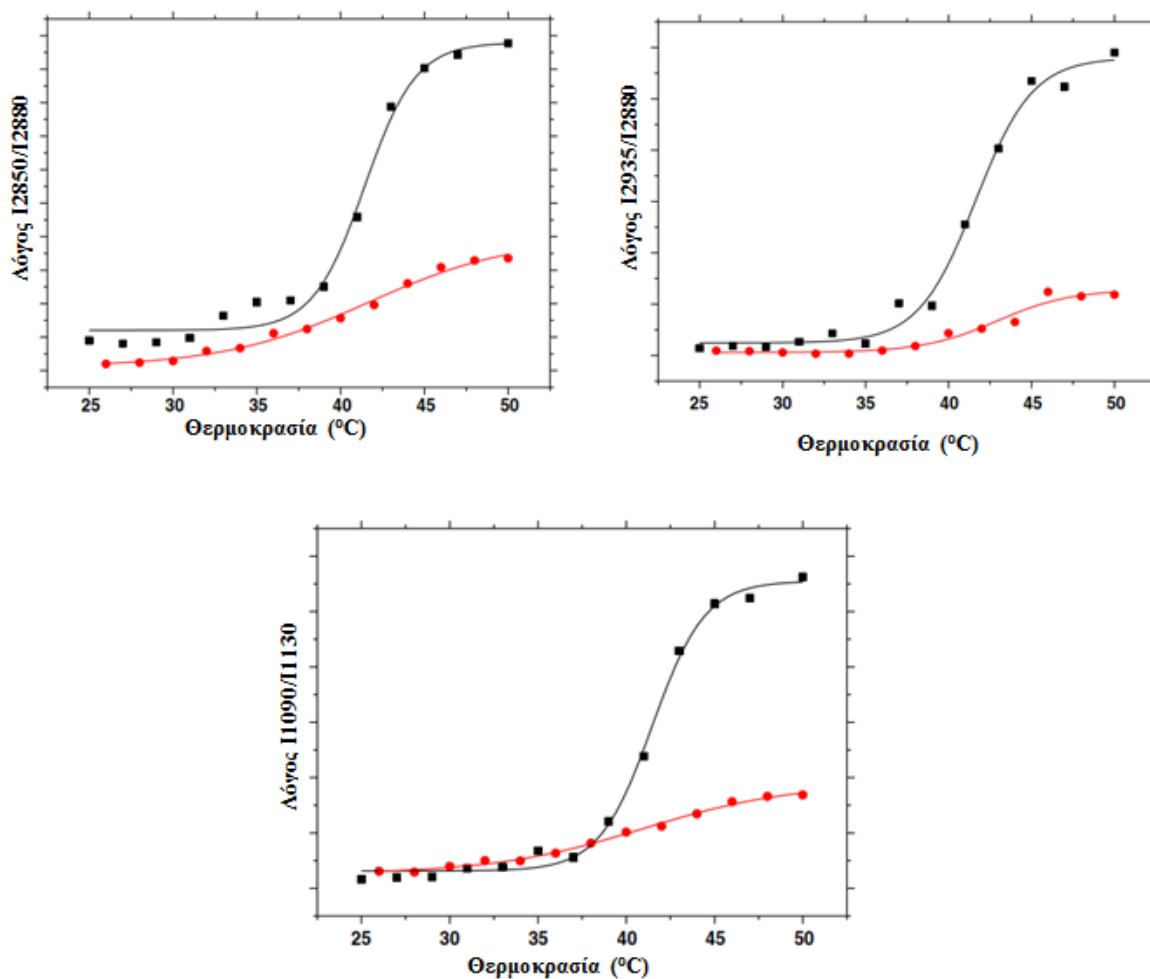
Λόγος I_{2850}/I_{2880} : Ο λόγος αυτός των εντάσεων των κορυφών Raman μας δίνει πληροφορίες τόσο για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις των λιπιδικών αλυσίδων μεταξύ τους όσο και για την αταξία τους. Όπως παρατηρείται και στο Σχήμα 93 αύξηση της θερμοκρασίας αποφέρει αύξηση των παραπάνω χαρακτηριστικών. Η σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας και του λόγου των εντάσεων είναι μια σιγμοειδής καμπύλη το σημείο καμπής της οποίας προσδιορίζεται στους 41,2 °C, όπως προσδιορίζεται και από τη θερμική ανάλυση (Σχήμα 93).

Λόγος I_{2935}/I_{2880} : Ο λόγος αυτός των εντάσεων κορυφών Raman μας δίνει ταυτόχρονα πληροφορίες για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις αλυσίδας-αλυσίδας αλλά και για την ευκαμψία-ρευστότητα των διπλοστιβάδων. Η συνάρτηση που καταγράφει τη συμπεριφορά του λόγου αυτού με την αύξηση της θερμοκρασίας είναι και αυτή σιγμοειδής, το σημείο καμπής συμπίπτει με τη θερμοκρασία κύριας φάσης μετασχηματισμού που παρατηρείται στη Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (41,2 °C, Σχήμα 93).

Περιοχή 1000–1200 cm^{-1} : Η περιοχή αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί σε αυτή εμφανίζονται κορυφές οι οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις δεσμών C–C των αλειφατικών αλυσίδων. Οι κορυφές στα 1060 cm^{-1} και στους 1130 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δονήσεις C–C των αλειφατικών αλυσίδων που έχουν μορφή *trans*, ενώ η κορυφή στους 1090 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δομές που έχουν μορφή *gauche*. Λαμβάνοντας τον λόγο εντάσεως κορυφών I_{1090}/I_{1130} σε συνάρτηση της θερμοκρασίας παρατηρούμε ότι υπάρχει μια σιγμοειδής εξάρτηση των δυο αυτών μεγεθών, της οποίας το σημείο

καμπής προσδιορίζεται στους 41,2 °C, και που συμπίπτει με αυτή της θερμικής ανάλυσης. Ο λόγος αυτός μας δίνει πληροφορίες για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις αλλά αποτελεί και μέτρο της αταξίας-ρευστότητας των αλυσίδων.

Οι τρεις αυτοί λόγοι έχουν υπολογιστεί όταν 20% σε μοριακή αναλογία ενσωματωθεί BV6 στις λιπιδικές διπλοστιβάδες της διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης. Έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία του BV6 ελαττώνει αυτούς τους λόγους που σημαίνει ότι αυξάνει την trans: gauche ισομερείωση και την οργάνωση των λιπιδικών διπλοστιβάδων.



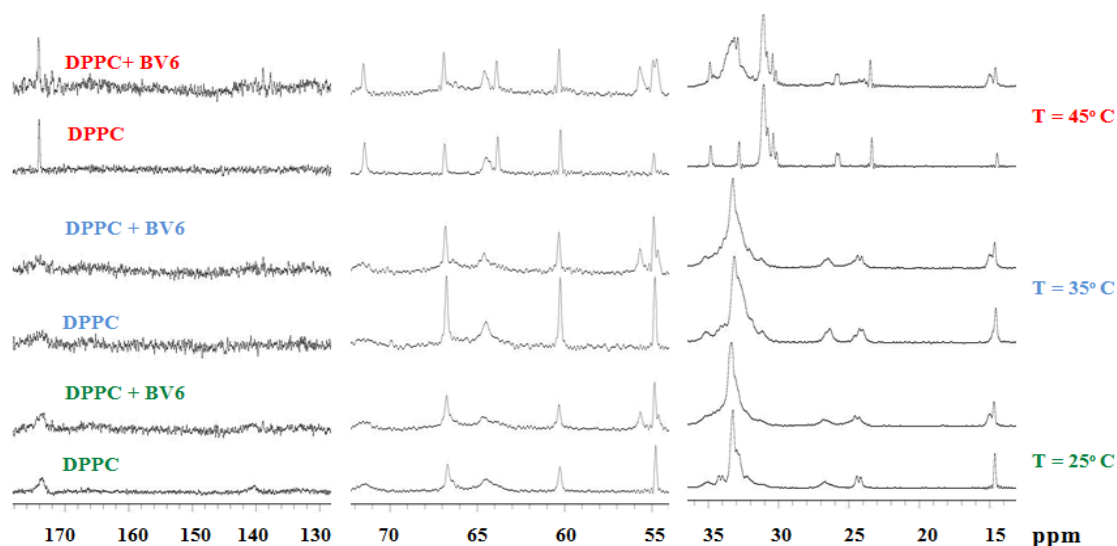
Σχήμα 93: Λόγοι I_{2850}/I_{2880} , I_{2935}/I_{2880} και I_{1090}/I_{1130} λιπιδίων διπλοστιβάδων διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης απουσία (μαύρες καμπύλες) και παρουσία (κόκκινες καμπύλες) BV6

Γ. Πειράματα ^{13}C CP/MAS

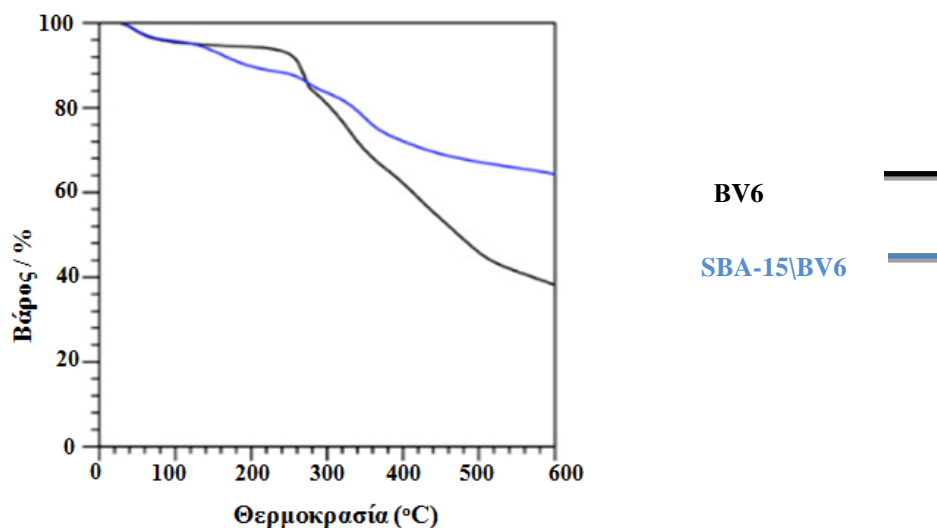
Περαιτέρω επιβεβαίωση των παραπάνω παρέχεται από τα φάσματα ^{13}C CP/MAS απουσία και παρουσία 20% σε μοριακή αναλογία BV6 στις λιπιδειείς διπλοστιβάδες της διπαλμιτικής φωσφατιδυλοχολίνης (Σχήμα 94). Οι κορυφές που περιέχονται στις λιπιδεικές διπλοστιβάδες με το BV6 έχουν μεγαλύτερο ημίσειο εύρος. Αυτό αποδεικνύει ότι είναι σε λιγότερο ρευστή κατάσταση. Σημαντικό είναι ότι στα πειράματα αυτά αναφέρονται και κορυφές που οφείλονται στο BV6. Αυτό είναι μια άμεση απόδειξη της εισδοχής του στις λιπιδειείς διπλοστιβάδες.

8.8 Αλληλεπιδράσεις BV6 σε μεσοπορώδη υλικά

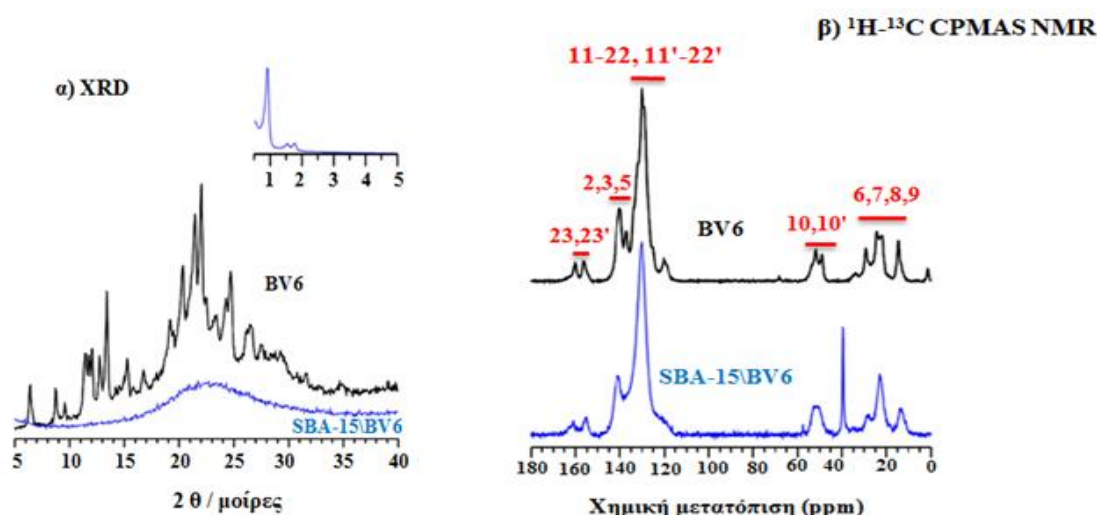
Οι ιδιότητες του BV6 σε μεσοπορώδη υλικά οδήγησαν σε περαιτέρω μελέτες με μεσοπορώδη υλικά. Επιθυμητές ιδιότητες για το μόριο έχουν παρατηρηθεί στο μεσοπορώδες σύστημα SBA-15 κάνοντας χρήση διαφόρων τεχνικών όπως θερμοσταθμική ανάλυση (thermogravimetric analysis), διάθλαση ακτίνων-X σε σκόνη (X-ray Powder Diffraction -XRPD) και φασματοσκοπία ^{13}C CP/MAS (Σχήμα 95 Σχήμα 96).^{103,105}



Σχήμα 94: Φάσματα ^{13}C CP/MAS απουσία και παρουσία BV6 σε τρεις θερμοκρασίες (25 °C, 35 °C και 45 °C). Τα φάσματα είναι χωρισμένα σε τρεις περιοχές για την καλύτερη παρουσίασή τους.



Σχήμα 95: Η απώλεια βάρους του BV6 είναι μικρότερη στο σύστημα SBA-15 συγκριτικά με αυτό που είναι μόνο του. Αυτό είναι μία επιθυμητή ιδιότητα για τα φαρμακευτικά μόρια



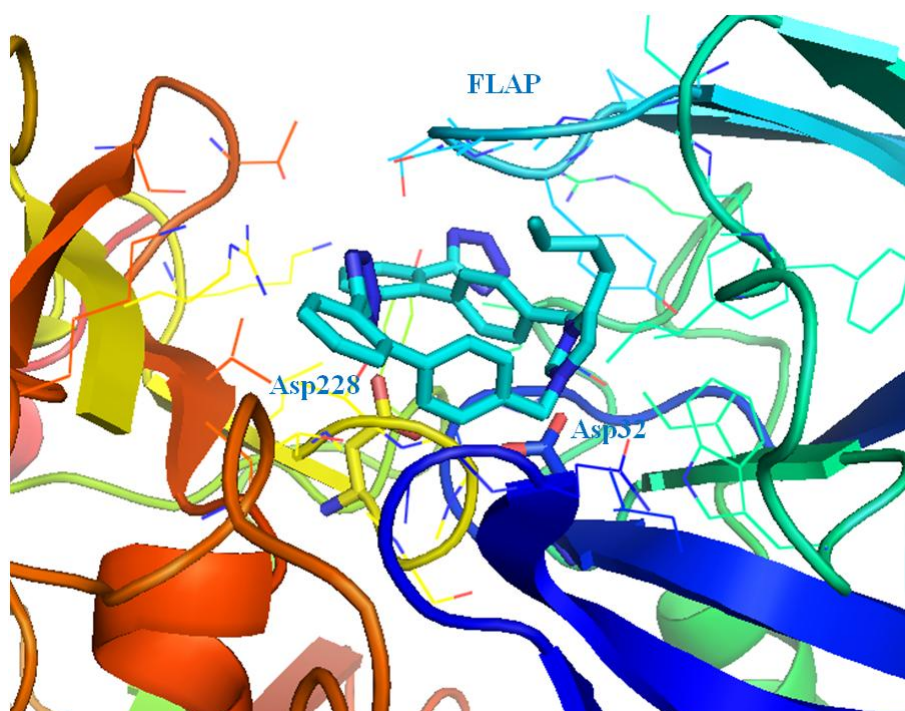
Σχήμα 96: (α) XRPD φάσματα του BV6 σε σκόνη ή ενσωματωμένο στο μεσοπορώδες υλικό SBA-15. (β) ¹H-¹³C CPMAS φάσματα του BV6 ή BV6 ενσωματωμένου στο μεσοπορώδες υλικό SBA-15. Με τα XRPD κατανοείται ότι μέσα στο μεσοπορώδες υλικό SBA-15 το BV6 δεν έχει την ίδια κρυσταλλικότητα (απουσία κορυφών 5-35 μοίρες) συγκριτικά όταν βρίσκεται μόνο του. Με τα ¹H-¹³C CPMAS φάσματα παρατηρείται ότι τόσο το BV6 μόνο του ή όταν βρίσκεται στο μεσοπορώδες υλικό είναι εμφανείς οι κορυφές από το αρωματικό και αλειφατικό του τμήμα. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στους άνθρακες του σχήματος

Μοριακή Πρόσδεση του BV6 στη BACE-1

Όπως αναφέρθηκε και στην πρώτη παράγραφο αυτού του κεφαλαίου έχει βρεθεί ότι οι ανταγωνιστές AT1 εξασκούν αντιοξειδωτικές δράσεις και μπορούν να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στη νόσο Alzheimer.⁹²

Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε το συνθετικό ανάλογο BV6 ως προς την πιθανή ανασταλτική του δράση έναντι της BACE-1 με τη βοήθεια της μοριακής πρόσδεσης. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Glide και το ίδιο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της μοριακής πρόσδεσης των παραγώγων της ρεσβερατρόλης και της υδραζόνης.

Στο Σχήμα 96 παριστάνεται η θέση πρόσδεσης του BV6 στο καταλυτικό κέντρο της BACE-1. Παρατηρείται ότι βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με τα αμινοξέα Asp32 και Asp228 και τα αμινοξέα του πτερυγίου.



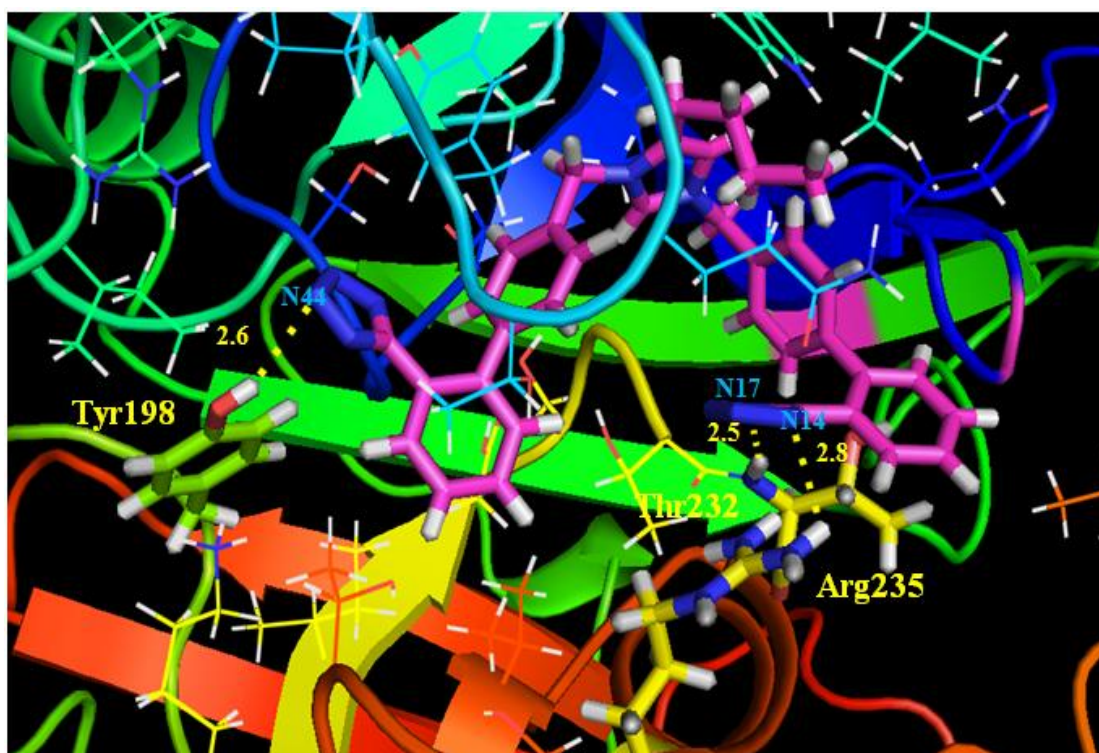
Σχήμα 97: Θέση πρόσδεσης του BV6 στο ενεργό κέντρο της BACE-1

Στο Σχήμα 97 εμφανίζονται οι δεσμοί υδρογόνου με τους οποίους προσδένεται η ένωση στο ενεργό κέντρο της BACE-1. Το τετραζολικό N44

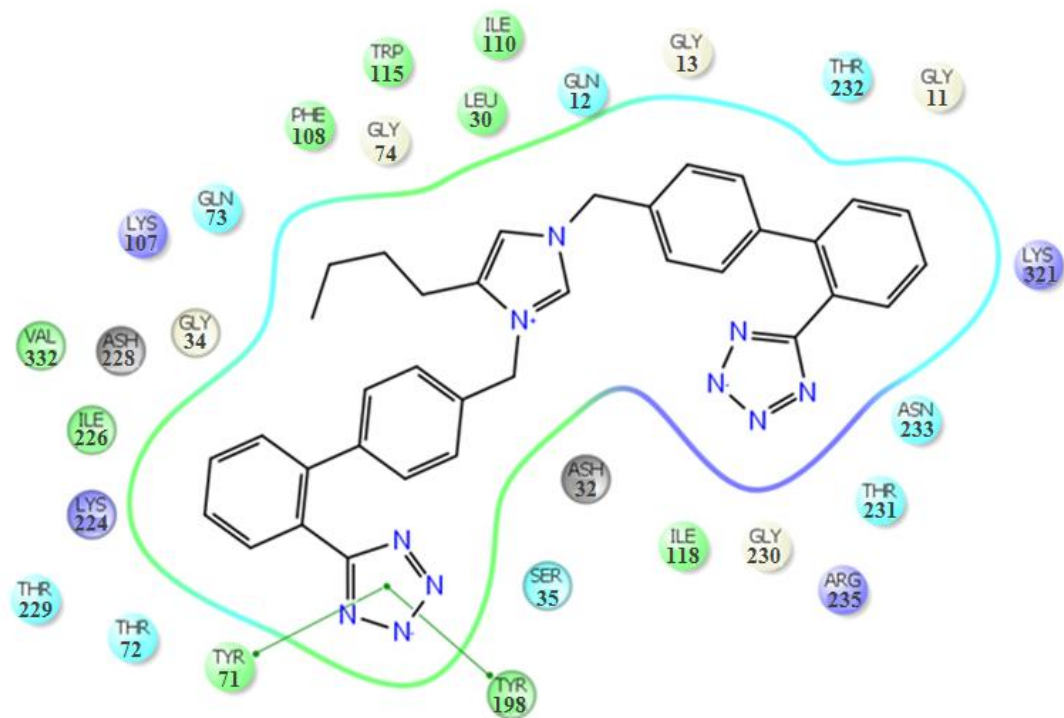
δημιουργεί έναν δεσμό υδρογόνου με το υδρογόνο της υδροξυλομάδας της Tyr198. Το τετραζολικό N17 αναπτύσσει δεσμό υδρογόνου με το υδρογόνο της ομάδας – NH της Thr234, ενώ το N14 του τετραζολίου σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το υδρογόνο της αμινομάδας της Arg235.

Το μόριο σταθεροποιείται στο ενεργό κέντρο και μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα Leu30, Ile110, Trp115, Phe108, Val332, Ile226, και Ile118. Επίσης, ο ένας από τους δύο τετραζολικούς δακτυλίους συμμετέχει σε αρωματικές π-π αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Tyr71 και Tyr198 (Σχήμα 98).

Τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά και η ένωση θα δοκιμασθεί *in vitro* έναντι της BACE-1.



Σχήμα 98: Εμφάνιση δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ του BV6 και των αμινοξέων Tyr198, Arg235 και Thr232 (κίτρινη διακεκομμένη γραμμή)



Σχήμα 99: Υδρόφοβες (σφαίρες με πράσινο) και αρωματικές π-π αλληλεπιδράσεις (πράσινα βέλη) της ένωσης BV6 με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της διδακτορική διατριβής συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Τα πειραματικά και τα *in silico* αποτελέσματα της μελέτης των παραγώγων της ρεσβερατρόλης και της υδραζόνης υποδεικνύουν ότι νέα παράγωγα ρεσβερατρόλης μπορούν να συντεθούν με υποσχόμενη αυξημένη βιολογική δράση.

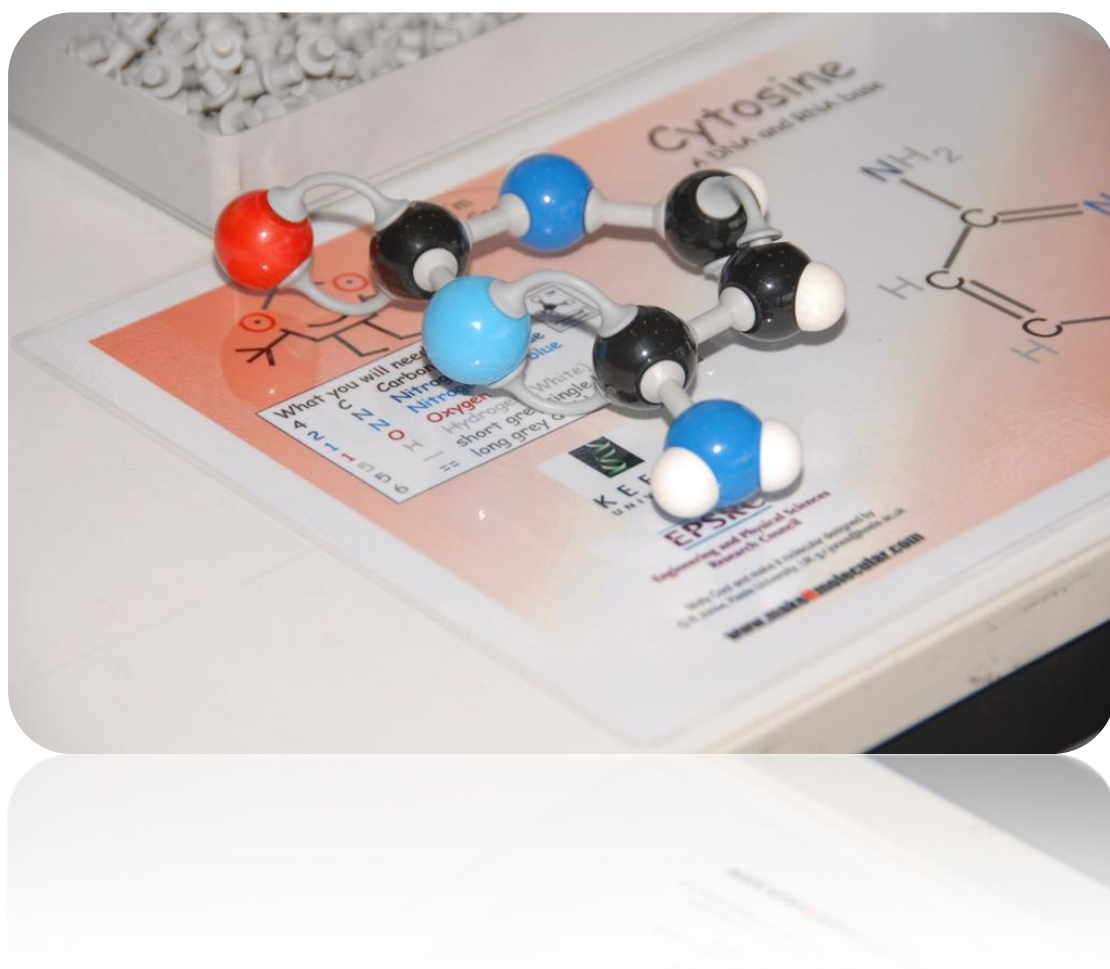
Πιο αναλυτικά, το παράγωγο ρεσβερατρόλης **14** με δύο ογκώδεις υποκαταστάτες σε ορθο- θέση ως προς το φαινολικό υδροξύλιο και με δύο διπλούς δεσμούς εμφάνισε τη μεγαλύτερη βιολογική δράση έναντι της BACE-1 και τη μεγαλύτερη προστασία από τον οξειδωτικό θάνατο των κυττάρων HT22. Αντίθετα, τα γλυοξυλοϋλο-αροϋλο παράγωγα δεν εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση. Μόνο τρεις ενώσεις: οι **3**, **9** και **4** έδειξαν % δράση στα 100 μM της BACE-1 μεγαλύτερη από 55% και επομένως δεν είναι υποσχόμενα μόρια για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer.

Τα αποτελέσματα από τη μοριακή δυναμική δείχνουν διαφορές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δραστικών και μη δραστικών ενώσεων στο ενεργό κέντρο της BACE-1

- Τα *in silico* και τα βιολογικά αποτελέσματα των κουμαρινικών παραγώγων υποδεικνύουν ότι οι ενώσεις αυτές είναι υποσχόμενοι αναστολείς της MAO-B. Η ένωση **K9** με τη μεγαλύτερη τιμή βαθμολόγησης της πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα αποδείχθηκε ο ισχυρότερος αναστολέας.
- Η ένωση BV6 είναι πιθανός πολυπαραγοντικός παράγοντας (αναστολέας του AT1 και της BACE-1)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ



9.1 Πειραματικό τμήμα

Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός σε υγρά

Τα φάσματα 2D DQF-COSY και 2D-ROESY έχουν ληφθεί σε φασματογράφο Varian Direct Drive 800 MHz στους 25 °C. 2 mg της ουσίας διαλύθηκαν σε 0,7 mL D₂O. Τα πειράματα που εκτελέστηκαν ήταν ευαίσθητα σε φάση (phase-sensitive mode) και χρησιμοποιήθηκαν παλμικές αλληλουχίες της βιβλιοθήκης που ήταν ενσωματωμένες στο φασματογράφο. Τα φάσματα έχουν ληφθεί με φασματικό πλάτος 8012 Hz, 4096 σημεία δεδομένων στην t₂, 4-32 σαρώσεις, 512 σύμπλοκα σημεία στην t₁ και χρόνο εφησυχασμού 1,5 s. Ο χρόνος μίξης που χρησιμοποιήθηκε για το 2D ROESY πείραμα ήταν 75 ms.

Πειράματα ¹³C MAS και ¹³CP/MAS

Αφού ταυτοποιήθηκε η ουσία BV6 και η καθαρότητά της διεξήχθησαν πειράματα άνθρακα-13 με τη χρήση της διασταυρούμενη πόλωσης και περιστροφής υπό μαγική γωνία (¹³C MAS και 13CP/MAS). Η περιστροφή του δείγματος υπό μαγική γωνία ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο είναι η μόνη γνωστή τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε στερεά δείγματα, προκειμένου να εξαλειφθεί η ανισοτροπία της χημικής μετατόπισης και να επιτευχθεί η ισοτροπική μετατόπιση που παρατηρείται στον Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό υγρής φάσης. Το δείγμα περιστρέφεται σε υψηλές συχνότητες (2-15 KHz), γύρω από άξονα που σχηματίζει 54,7° με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B₀. Όταν η γωνία που σχηματίζει ο άξονας με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο είναι 54,7°, ονομάζεται "μαγική" μιας και επιτυγχάνει συμπεριφορά του στερεού δείγματος όμοια με αυτή του υγρού και συνεπώς φάσμα υψηλής διακριτικότητας. Η διπολική σύζευξη άνθρακα-13/πρωτονίου η οποία μειώνει τη διαχωριστικότητα των φασμάτων του άνθρακα-13 σε στερεή κατάσταση, παρέχει συγχρόνως τη δυνατότητα αύξησης της ευαισθησίας μέσω της τεχνικής διασταυρούμενης πόλωσης (Cross Polarization-CP). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί τη μεγάλη μαγνήτιση του πρωτονίου για να πολώσει τους πυρήνες άνθρακα-13. Συγχρόνως με τον

τρόπο αυτό επιλύεται το πρόβλημα των μεγάλων χρόνων αποδιέγερσης των πυρήνων άνθρακα-13 γιατί οι χρόνοι αποδιέγερσής τους καθορίζονται από τους μικρούς χρόνους αποδιέγερσης των πρωτονίων. Αποτέλεσμα ο πειραματικός χρόνος λήψης είναι να μειώνεται. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε υποδοχείς 3,2 mm και τα φάσματα ελήφθησαν σε 600 MHz φασματογράφο συντονισμένο στα 150,70 MHz για τον ^{13}C . Ο φασματογράφος που ελήφθησαν τα πειράματα είναι τύπου Varian (Palo Alto, CA). Ο ρυθμός περιστροφής του δείγματος ήταν 5 kHz. Οι πειραματικές θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 25°C, 35°C και 45°C για τα πειράματα ^{13}C CP/MAS. Προστέθηκε απεσταγμένο και απιοντισμένο νερό στο μίγμα DPPC/BV6 για να παραχθεί 50% (w/w) λιπόσωμα. Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Εθνικό Κέντρο Λουμπλιάνας υπό την καθοδήγηση του Δρ. Gregor Mali όπως και τα πειράματα με τα μεσοπορώδη υλικά.

9.2 Υπολογιστικό τμήμα

▪ Σχεδιασμός δομών

Τα μόρια σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Sybyl¹⁰⁶ και η ελαχιστοποίηση της ενέργειάς τους έγινε με την μέθοδο Powell χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων της Tripos.¹⁰⁷

▪ *In silico* φαρμακοκινητικές μελέτες

Για την εξαγωγή των φυσικοχημικών παραμέτρων επιλέχθησαν οι ιχνηθέτες: H₂O, DRY και O. Η πρόβλεψη της διαπερατότητας των ενώσεων διαμέσου του αιματεγκεφαλικού φραγμού και της απορρόφησης από τα επιθηλιακά κύτταρα Caco2 πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος VolSurf.^{56,57}

▪ Μελέτη πρόσδεσης των παραγώγων της ρεσβερατρόλης και της υδραζόνης στη BACE-1

Οι μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Glide και το πρωτόκολλο υψηλής ακρίβειας (extra precision-XP),^{108,109} της εταιρείας Schrodinger. Η κρυσταλλογραφημένη δομή του συμπλόκου της BACE-1 με την ένωση LO1 (PDB ID: 1W51)⁵⁹ χρησιμοποιήθηκε από την τράπεζα Protein Data Bank.⁶⁰ Η μεθοδολογία PROPKA^{74,110} εφαρμόστηκε για την πρόβλεψη των τιμών pKa της καταλυτικής δυάδας Asp παρουσίας του προσδέτη LO1. Για τον καθορισμό των ταυτομερών μορφών των προσδετών σε pH=4,5 όπου πραγματοποιήθηκε το βιολογικό πείραμα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MoKa.^{111,58} Η ρεσβερατρόλη και τα παράγωγά της αποτελούν ουδέτερα μόρια σε pH=4,5. Αντίθετα, τα παράγωγα της υδραζόνης εμφανίσθηκαν σε κατιοντική μορφή. Οι τιμές pKa κυμάνθηκαν από pKa=5,47 σε pKa=6,77.

Για την δημιουργία του πλέγματος ορίστηκαν οι προκαθορισμένες τιμές του παράγοντα van der Waals (1,00) και της απόστασης αποκοπής των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (0,25). Το ενεργό κέντρο ορίστηκε σε μία ακτίνα 10 Å γύρω από τον προσδέτη της κρυσταλλογραφικής δομής. Δεν ετέθησαν περιορισμοί στους υπολογισμούς πρόσδεσης. Οι επιτυχεστερες θέσεις πρόσδεσης για κάθε προσδέτη με τη χαμηλότερη τιμή XP Gscore μελετήθηκαν αναλυτικά.

▪ **Μελέτη προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής του συμπλέγματος: παράγωγο ρεσβερατρόλης 14/ BACE-1**

Οι υπολογισμοί προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα AMBER και με τη χρήση του PMEMD.³⁷ Το πεδίο δυνάμεων ff99SB χρησιμοποιήθηκε για την παραμετροποίηση της πρωτεΐνης.¹¹² Για την παραμετροποίηση του προσδέτη **14** εφαρμόστηκε το πρόγραμμα ANTECHAMBER το οποίο χρησιμοποιεί το πεδίο δυνάμεων General AMBER force field (GAFF) και τη μέθοδο AM1-BCC για τον υπολογισμό των φορτίων.¹¹³ Για την προσομοίωση των μορίων του διαλύτη χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο επιδιαλυτοποίησης TIP3P¹¹⁴ με διαλύτη νερό. Προστέθηκαν 10792 μόρια νερού καθώς και 11 ιόντα Na⁺ με το πρόγραμμα tLEap. Οι

ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις υπολογίστηκαν με τη μέθοδο PMED.¹¹⁵ Η ελαχιστοποίηση του συμπλέγματος πραγματοποιήθηκε σε 5000 βήματα. Για τα πρώτα 2500 βήματα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Βαθύτερης Κατάδυσης (Steepest Descent), ενώ για τα επόμενα 2500 βήματα η μέθοδος Βαθμιδωτής Σύζευξης (Conjugate Gradient). Η επόμενη διαδικασία περιελάμβανε την ήπια θέρμανση του κάθε συμπλέγματος υπό σταθερό όγκο και με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας 0 έως 300 K (βήμα χρόνου: 2 fs). Ακολούθησε η εξισορρόπηση του συμπλέγματος υπό σταθερή πίεση διάρκειας 200 ps, για την παρατήρηση της σταδιακής αύξησης της πυκνότητας, η οποία συνέκλινε μετά από ≈ 50 ps. Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιήθηκε προσομοίωση μοριακής δυναμικής διάρκειας 15 ns, για το κάθε σύμπλεγμα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Langevin για την κλιμάκωση της θερμοκρασίας με συχνότητα σύγκρουσης (collision frequency) 2 ps^{-1} .¹¹⁶ Κατά την προσομοίωση MD, όλοι οι δεσμοί που περιλάμβαναν άτομα υδρογόνου ήταν περιορισμένοι στις αποστάσεις ισορροπίας τους.¹¹⁷ Ακολούθησε ανάλυση των αρχείων τροχιάς (rmsd πρωτεΐνης, rmsd προσδέτη, υπολογισμοί δεσμών υδρογόνου). Για τον καθορισμό των δεσμών υδρογόνου ορίστηκε ως απόσταση αποκοπής (cutoff) η τιμή 3,5 Å, ενώ η γωνία αποκοπής ορίστηκε στις 120° για τη γωνία δότη δεσμών υδρογόνου-δέκτη.

▪ **Μελέτη ενέργειας σύνδεσης του συμπλέγματος: BACE-1/παράγωγο ρεσβερατρόλης 14 με χρήση της μεθόδου MM-PBSA**

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης (ΔG_{bind}) του συμπλέγματος BACE-1/παράγωγο ρεσβερατρόλης **14** υπολογίστηκε με τη χρήση της μεθόδου MM-PBSA.^{118,119}

Η μέθοδος περιλαμβάνει υπολογισμούς σε μία σειρά στιγμιότυπων (snapshots) που παράγονται κατά τη διάρκεια της μοριακής δυναμικής. Στη συγκεκριμένη μελέτη θεωρήθηκαν 1500 στιγμιότυπα του συμπλόκου. Οι διηλεκτρικές σταθερές για τη διαλυμένη ουσία και το διαλύτη προσδιορίστηκαν στις τιμές 1 και 80, αντίστοιχα. Τα ιόντα και τα μόρια νερού δεν ελήφθησαν

υπόψη. Για κάθε στιγμιότυπο, υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια των συμπλόκων, της BACE-1 και των προσδετών.

Η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης υπολογίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση (1):

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{complex}} - [G_{\text{BACE-1}} + G_{\text{ligand}}]^{120} \quad (1)$$

όπου G_{complex} , $G_{\text{BACE-1}}$, G_{ligand} είναι οι ελεύθερες ενέργειες του συμπλέγματος, της BACE-1, και του προσδέτη, αντίστοιχα.

Η ελεύθερη ενέργεια περιλαμβάνει δύο όρους, τον όρο της ενθαλπίας και τον όρο της εντροπίας και δίνεται από την εξίσωση (2):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

Η ενθαλπία αποτελεί το άθροισμα της μεταβολής της ενέργειας ΔG_{MM} της μοριακής μηχανικής κατά το σχηματισμό του συμπλέγματος πρωτεΐνης/προσδέτη και της ενέργειας διαλυτοποίησης ΔG_{solv} .

Η ΔG_{MM} δίνεται από την εξίσωση (3):

$$\Delta G_{\text{MM}} = \Delta G_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{vdW}} \quad (3)$$

όπου ΔG_{ele} και ΔG_{vdW} είναι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας που οφείλονται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και στις van der Waals αλληλεπιδράσεις, αντίστοιχα.

Η ελεύθερη ενέργεια διαλυτοποίησης είναι το άθροισμα δύο όρων και δίνεται από την εξίσωση (4):

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{PB}} + \Delta G_{\text{NP}} \quad (4)$$

όπου ΔG_{PB} και ΔG_{NP} είναι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας που οφείλονται στις πολικές και μη πολικές αλληλεπιδράσεις, αντίστοιχα.

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ΔG_{PB} υπολογίστηκε με επίλυση της εξίσωσης του Poisson-Boltzmann χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MM-PBSA,¹²¹ ενώ η συνεισφορά των μη πολικών αλληλεπιδράσεων προσδιορίστηκε ως συνάρτηση του διαλύτη-προσβάσιμη περιοχή επιφάνειας (\AA^2) (SASA).¹²²

$$\Delta G_{\text{NP}} = \gamma \text{SASA} + \beta \quad (5)$$

όπου γ ($\gamma = 0.00542 \text{ kcal/mol \AA}^2$) αποτελεί την τάση επιφάνειας και β είναι μία σταθερά ($\beta = 0.92 \text{ kcal/mol}$).¹²³

Η ΔG_{NP} υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση (5), με τη μέθοδο Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO).¹²⁴

Ο όρος της εντροπίας– $T\Delta S$ υπολογίστηκε με την ανάλυση Normal Mode analysis χρησιμοποιώντας το NMODE¹²⁵ μόνο σε 150 ισόχρονα στιγμιότυπα για την εξοικονόμηση υπολογιστικού χρόνου. Η εντροπία αποτελεί το άθροισμα των όρων ΔS_{trans} , ΔS_{rot} , και ΔS_{vib} :

$$\Delta S = \Delta S_{trans} + \Delta S_{rot} + \Delta S_{vib} \quad (6)$$

▪ Μελέτη πρόσδεσης των κουμαρινικών παραγώγων στη MAO-B

Οι μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης των κουμαρινικών πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Glide και το πρωτόκολλο υψηλής ακρίβειας (extra precision-XP).^{108,109} Η κρυσταλλογραφημένη δομή του συμπλόκου της ανθρώπινης MAO-B συγκρυσταλλωμένη με τον αναστολέα 7-(3-χλωροβενζυλοξυ)-4-(μεθυλοαμινο)μεθυλο-κουμαρίνη (κωδικός πρόσβασης 2V61)⁹⁰ χρησιμοποιήθηκε από την τράπεζα Protein Data Bank.⁶⁰ Για την δημιουργία του πλέγματος ορίστηκαν οι προκαθορισμένες τιμές του παράγοντα van der Waals (1,00) και της απόστασης αποκοπής των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (0,25). Το ενεργό κέντρο ορίστηκε σε μία ακτίνα 10 Å γύρω από τον προσδέτη της κρυσταλλογραφικής δομής. Δεν ετέθησαν περιορισμοί στους υπολογισμούς πρόσδεσης. Οι επιτυχεστέρες θέσεις πρόσδεσης για κάθε προσδέτη με τη χαμηλότερη τιμή XP Gscore μελετήθηκαν αναλυτικά.

▪ Μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης του αναστολέα BV6 στον υποδοχέα AT1

Το τρισδιάστατο μοντέλο του υποδοχέα AT1 που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης παραχωρήθηκε από τον Tuccinardi και τους συνεργάτες του.¹²⁶ Η μελέτη Μοριακής Πρόσδεσης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Glide και το πρωτόκολλο υψηλής ακρίβειας (extra precision-XP).^{108,109} Ακολούθησε η εφαρμογή του πρωτόκολλου IFD (Induced Fit Docking),^{127,128} το οποίο επιτρέπει την μερική ευκαμψία του υποδοχέα. Το πρωτόκολλο IFD ακολουθεί τα παρακάτω βήματα: (α) Ελαχιστοποίηση του υποδοχέα υπό περιορισμό με RMSD αποκοπής 0,18Å. (β) Αρχική μοριακή πρόσδεση με χρήση του Glide, μαλακών δυναμικών (0,5 Van der Waals

ακτίνες, μεγέθυνση των μη πολικών ατόμων των προσδετών και υποδοχέα και χρήση αποκοπής φορτίων 0,15). (γ) Οι προκύπτουσες πόζες από τη μοριακή πρόσδεση βελτιώθηκαν με το Prime Induced Fit, αλγόριθμο επίσης της εταιρίας Schrodinger. Αμινοξέα σε απόσταση μέχρι 5,0 Å από τις πόζες των προσδετών ελαχιστοποιήθηκαν για να σχηματίσουν κατάλληλες διαμορφώσεις. (δ) Επανάληψη μοριακής πρόσδεσης του συμπλόκου πρωτεΐνης:προσδέτη.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενογλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Amyloid Precursor Protein, APP	πρόδρομη πρωτεΐνη του αμυλοειδούς
bifunctional	διλειτουργικός
disease network	δίκτυο
dual ligands	προσδέτες σε δύο στόχους
dual mechanism	μόρια με διπλό μηχανισμό
Fragment Based Drug Discovery-FBDD	ανακάλυψη φαρμάκων με βάση τη τμηματική δόμηση
free energy calculations	υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας
high-throughput screening	γρήγορη σάρωση
interatomics	ενδοατομική
Isothermal Titration Calorimetry-ITC	ισόθερμη θερμιδομετρία ογκομέτρησης
molecular dynamics	μοριακή δυναμική
multifunctional ligands	πολυλειτουργικά μόρια
multimechanistic	μόρια που δρουν με πολλαπλούς μηχανισμούς
multitarget	πολυστοχευμένο
neuronal reuptake of dopamine	επαναπρόσληψη στους νευρώνες της ντοπαμίνης
pharmacophores	φαρμακοφόρα
positive feed back loop	μηχανισμός θετικής ανάδρασης
radii scaling	ακτίνες μεγέθυνσης
resting-state	κατάσταση ηρεμίας
S (sites), P (pockets))	τμήματα και θήκες
scissile	τμητός
structure-based approach	στρατηγική με βάση τη δομή των πρωτεϊνών
substantia nigra	μέλαινα ουσία

Surface Plasmon Resonance-SPR	επιφανειακός πλάσματος	συντονισμός
-------------------------------	---------------------------	-------------

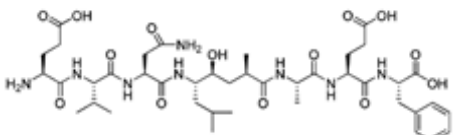
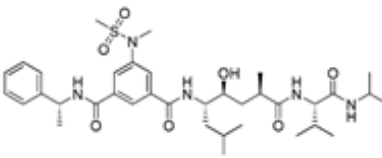
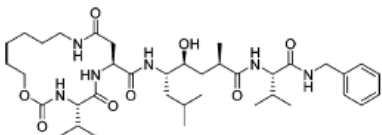
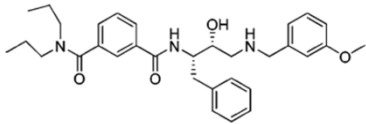
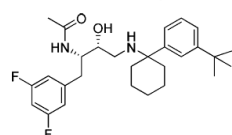
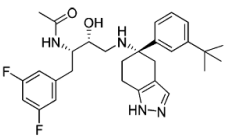
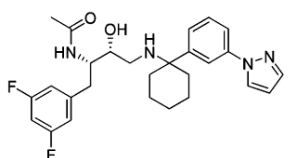
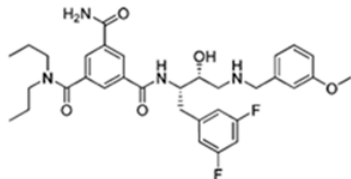
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

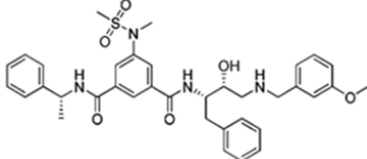
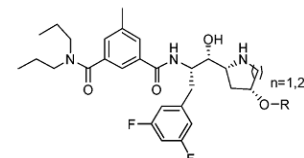
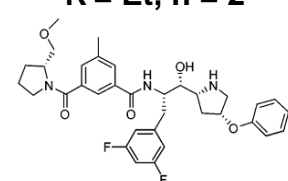
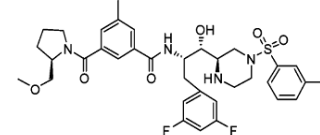
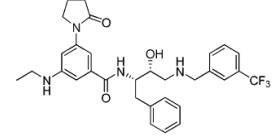
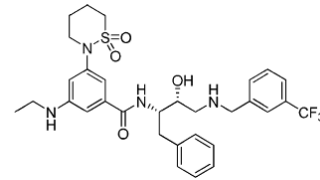
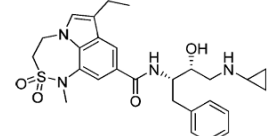
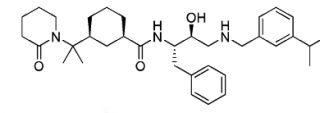
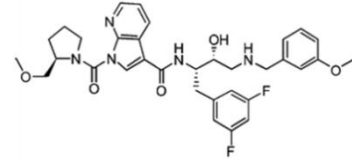
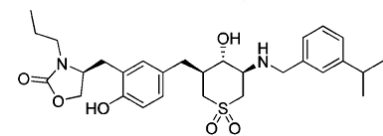
Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

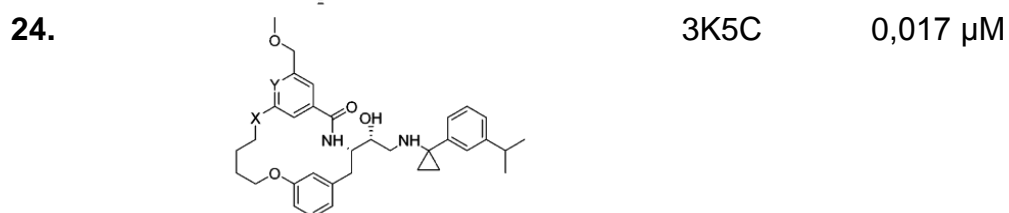
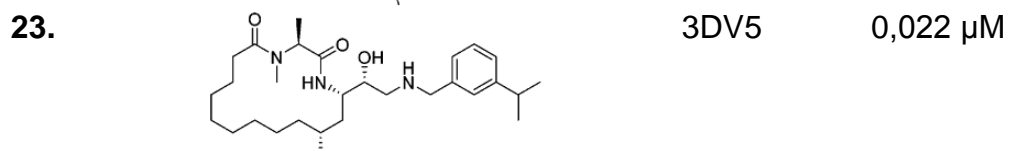
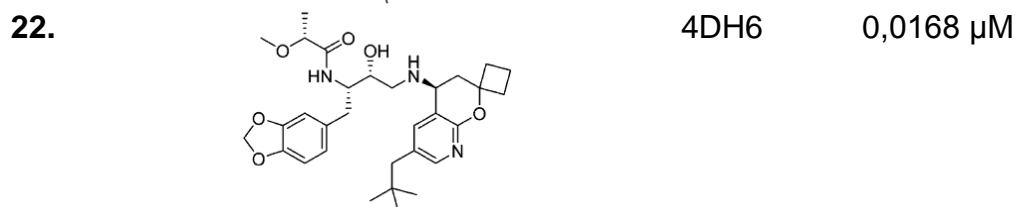
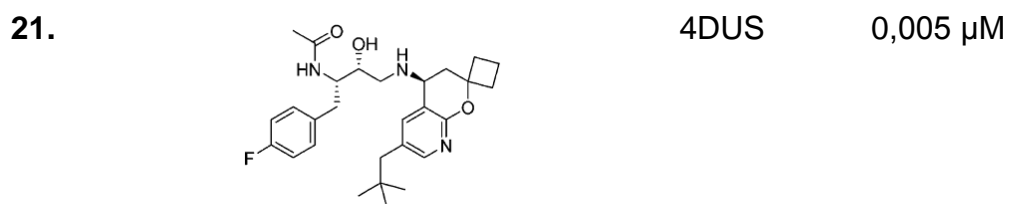
AchE	Acetylcholinesterase
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion
BuChE	butyrylcholinesterase
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
CoQ	Coenzyme Q10
DMLS	Designed Multiple LigandS
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
HE	Hydroxyethylene
HEA	Hydroxyethylamine-)
L-dopa	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
NIA	Νευροϊνιδικές Αλλοιώσεις
NMDA	N-methyl-D- aspartate
RAS	Renin-Angiotensin System
rMAO-B	rat Monoamine Oxidase B
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxide Dismutase
AMBER	Assisted Model Building Energy Refinement

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

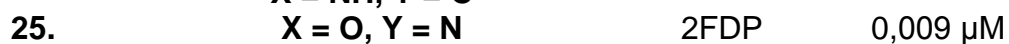
ΠΙΝΑΚΑΣ: ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ “ΚΛΕΙΣΤΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ” ΤΗΣ BACE-1

Υδροξυαιθυλενικά παράγωγα (Hydroxyethylenes, HE)			
	ΔΟΜΗ	PDB	BACE-1
1.		1FKN	0,0016 μM
2.		2P4J	0,0011 μM
3.		1XS7	0,025 μM
Υδροξυαιθυλαμινικά παράγωγα (Hydroxyethylamines, HEA)			
	ΔΟΜΗ	PDB	BACE-1
4.		1W51	0,020 μM
5.		3IVH	0,047 μM
6.		3IVI	0,012 μM
7.		3N4L	0,059 μM
8.		2P83	0,011 μM

9.		2VKM	0,0018 μM
10.		2QMF	0,005 μM
11.	R = Bn, n = 1	2QMF	0,003 μM
12.	R = Ph, n = 1	2QMF	0,008 μM
13.	R = Et, n = 2	2QMG	0,0007 μM
			
14.		3LPK	0,0008 μM
15.		2VJ7	0,040 μM
16.		2VNM	0,003 μM
17.		2VNM	0,020 μM
18.		3K5G	0,0025 μM
19.		3K5G	0,01 μM
20.		3QBH	0,150 μM



X = NH, Y = C

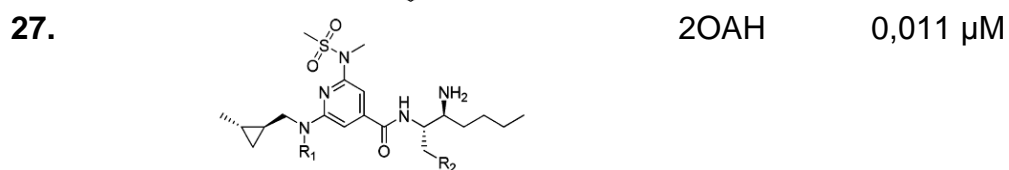
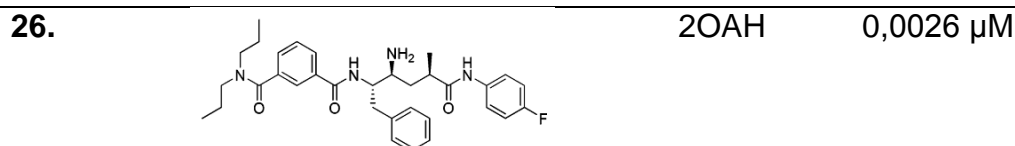


Αμινοαιθυλενικά παράγωγα (Aminoethylenes (Carbinamines))

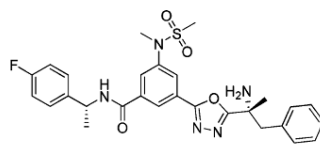
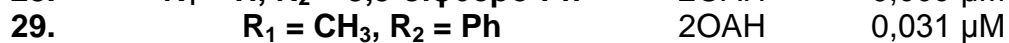
ΔΟΜΗ

PDB

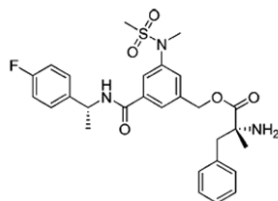
BACE-1



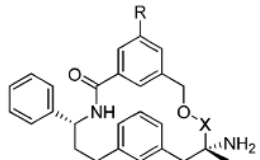
R₁ = H, R₂ = 3-θειοφαίνιο



31. 2PH6 0,027 μM



32. 2PH6 0,049 μM



X = CH₂, R = CH₃-N-SO₂CH₃

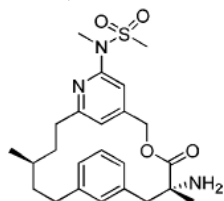
33. 2PH6 0,002 μM

X = CO, R = CH₃-N-SO₂CH₃

34. 2PH6 0,027 μM

X = CO, R = 2-CN-Ph

35. 2PH8 1,8 μM



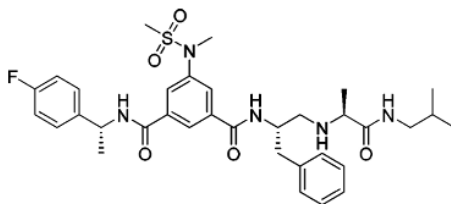
Λοιπές Δομές (Miscellaneous)

ΔΟΜΗ

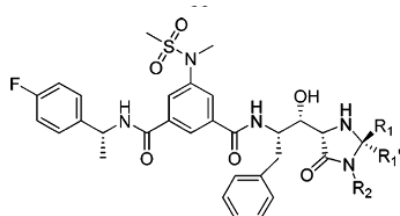
PDB

BACE-1

36. 2QZL 0,008 μM



37. 2P8H 0,071 μM



R₁, R₁' , R₂ = CH₃

38. 2P8H 0,004 μM

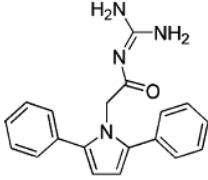
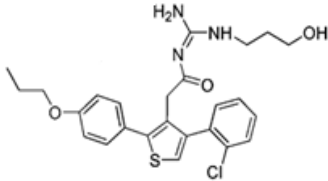
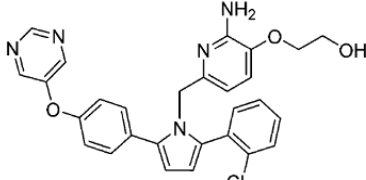
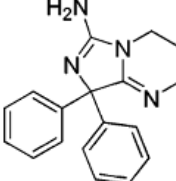
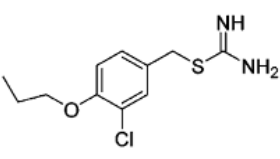
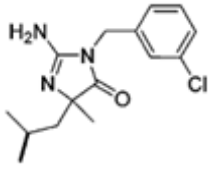
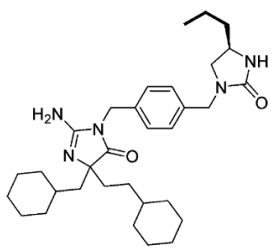
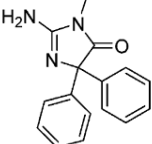
R₁, R₁' = CH₃, R₂ = Bn

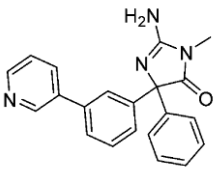
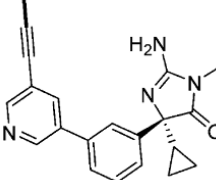
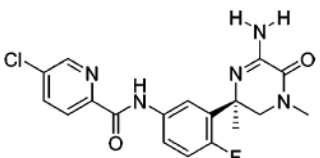
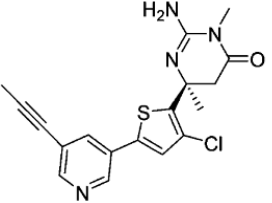
39. 2P8H 0,0021 μM

R₁ = CH₃, R₁' = H, R₂ = Bn

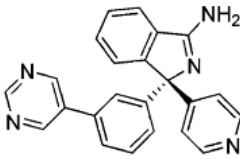
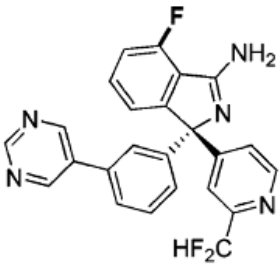
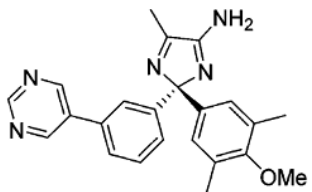
ΠΙΝΑΚΑΣ: ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ “ΑΝΟΙΚΤΗΣ ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗΣ” ΤΗΣ BACE-1

Ακυλογουανιδικά παράγωγα (Acylguanidines)

	ΔΟΜΗ	PDB	BACE-1
1.		2QU2	3,7 μM
2.		2QU3	0,15 μM
3.		3L38	0,04 μM
4.		3IGB	38 μM
5.		3L59	200 μM
6.		3L5B	55 % at 500 μM
7.		3L5E	0,067 μM
8.		4DJU	3,6 μM

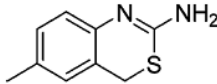
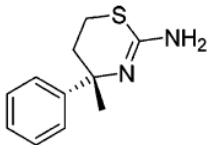
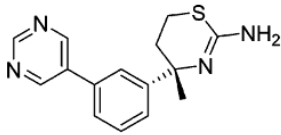
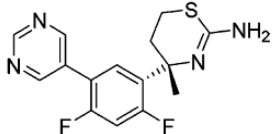
9.		4DJW	0,1 μM
10.		4DJY	0,0054 μM
11.		3USA	0,040 μM
12.		4FRS	0,0017 μM

Αμινοισοϊνδολικά παράγωγα (Aminoisoindoles)

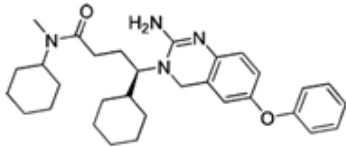
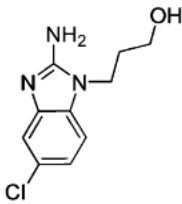
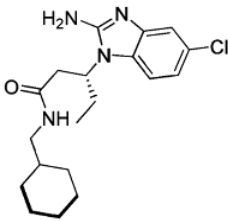
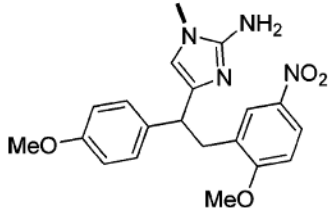
	ΔΟΜΗ	PDB	BACE-1
13.		4AZY	0,50 μM
14.		4B05	0,035 μM
15.		4B1D	0,024 μM

Αμινοβενζοθειαζίνες (Aminobenzthiazines)

ΔΟΜΗ PDB^α BACE-1

16.		790 μM
17.		22 μM
18.		0,92 μM
19.		0,24 μM

**Ετεροκυκλικά παράγωγα με πενταμελή δακτύλιο
(Five-Membered Heterocycles)**

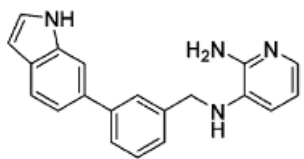
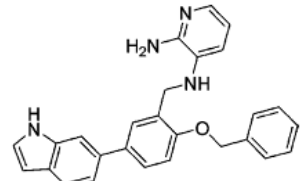
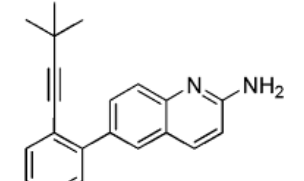
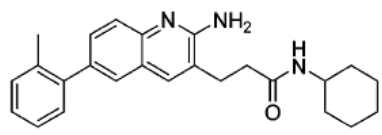
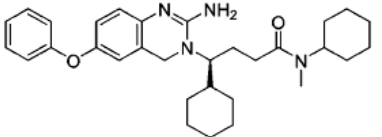
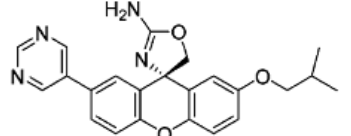
	ΔΟΜΗ	PDB	BACE-1
20.		2Q15	0,011 μM
21.		3MSJ	770 μM
22.		3MSL	7 μM
23.		3H0B	0,47 μM

2-Αμινοκινολίνες και Πυριδίνες (2-Aminoquinoline and Pyridine)

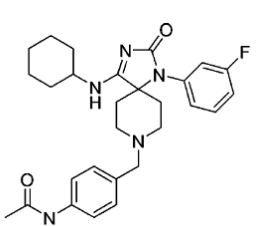
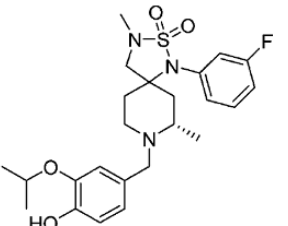
ΔΟΜΗ

PDB

BACE-1

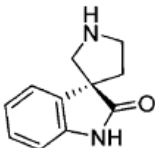
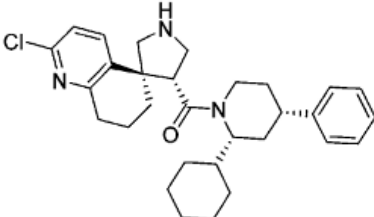
24.		2OHT	9,1 μM
25.		2OHU	0,69 μM
26.		3RTH	6,1 μM
27.		3RTN	0,074 μM
28.		2Q15	0,011 μM
29.		4FRK	0,008 μM

Μοναδική Προσδέτες (Unique Binders)

	ΔΟΜΗ	PDB	BACE-1
30.		3FKT	2,8 μM
31.		4FM7	0,1 μM

Κυκλικές Βασικές Αμίνες (Cyclic Basic Amine)

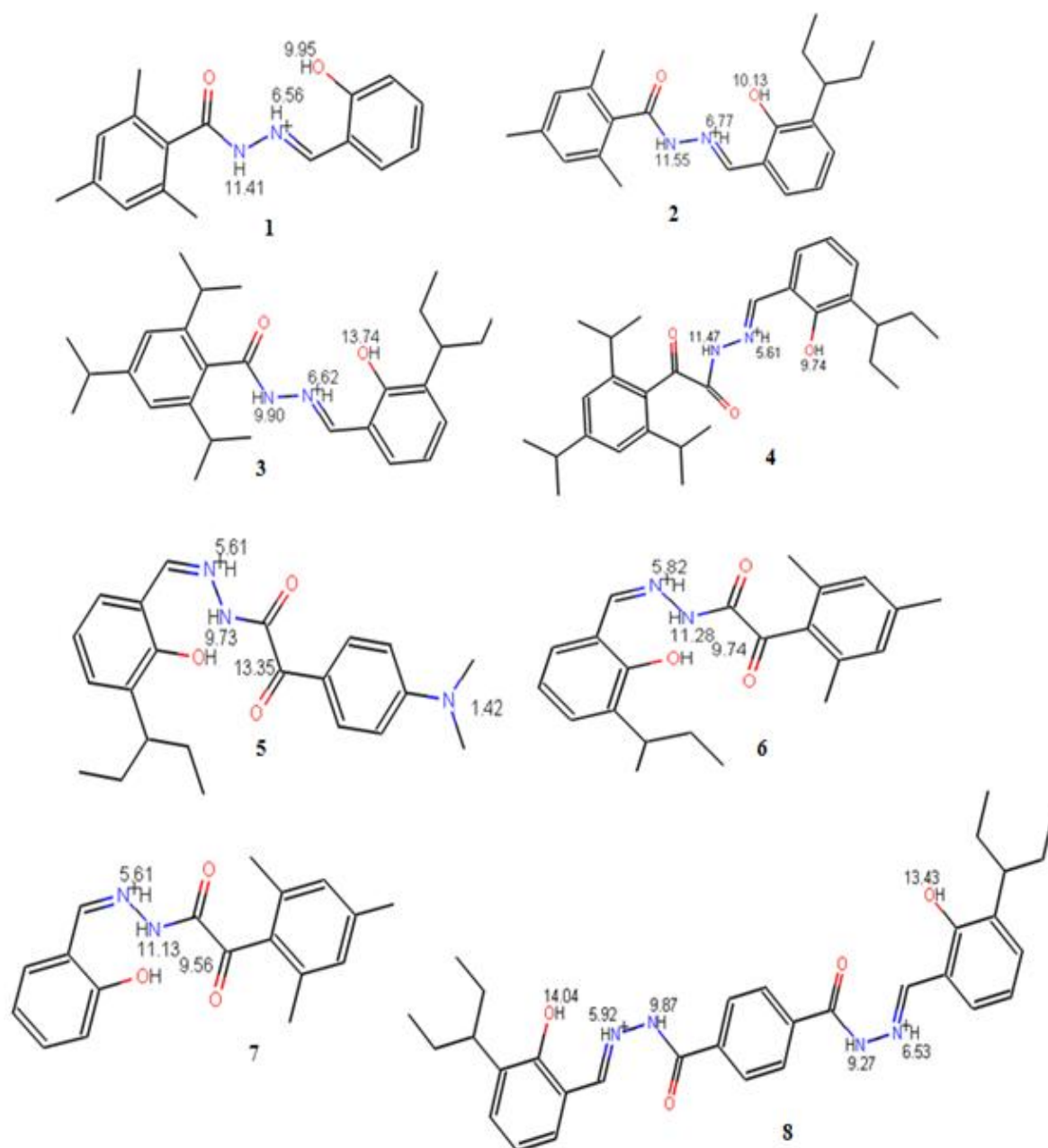
ΔΟΜΗ	PDB	BACE-1
------	-----	--------

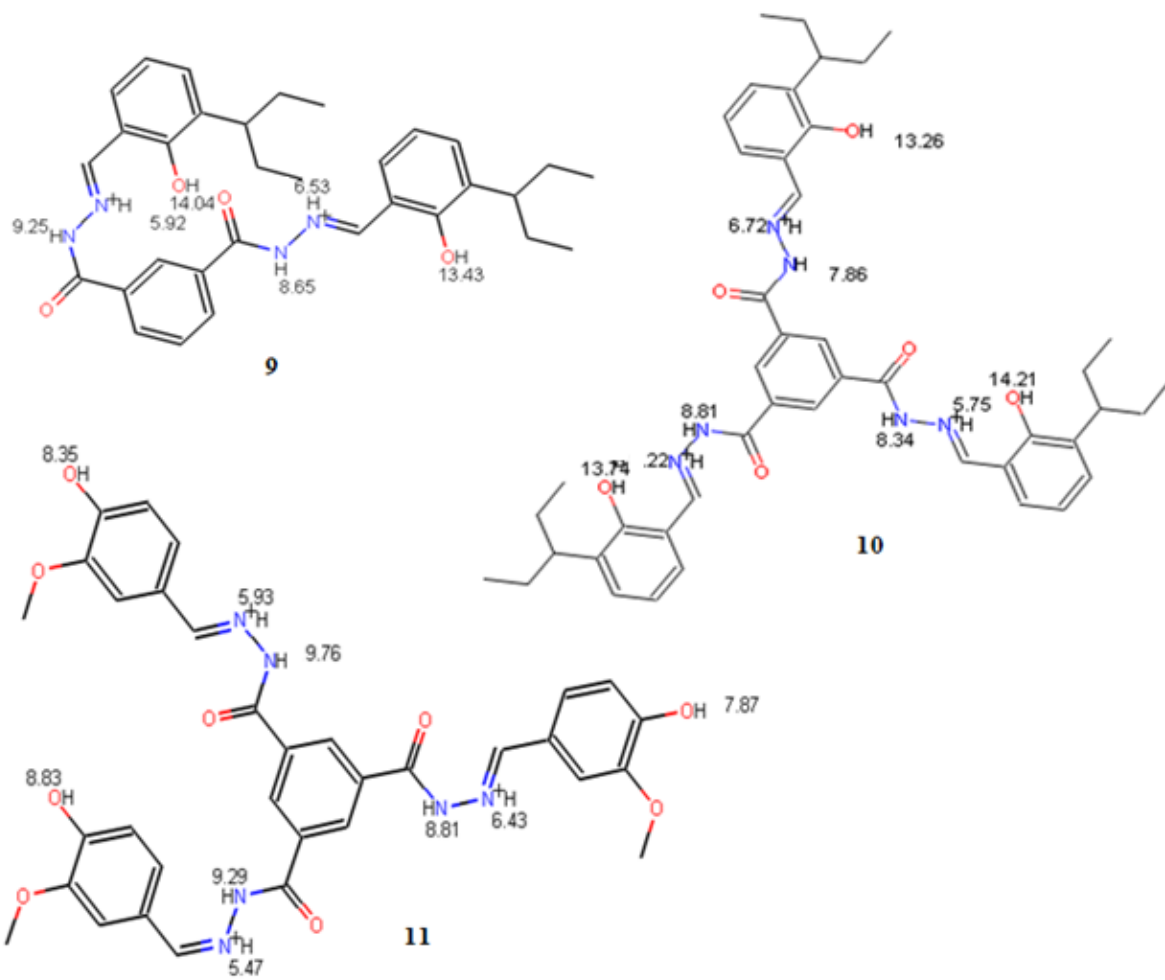
32.		3UDH	1100 μM
33.		3UFL	0,03 μM

^a Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα αναμένεται να αναρτηθούν στην ιστοσελίδα της βάσης κρυσταλλογραφικών δεδομένων των πρωτεϊνών: **Protein Data Bank**, PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ










Πίνακας 12: Τιμές pKa των ατόμων των παραγώγων της υδραζόνης σε pH = 4,5





ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Πίνακας 13. Επεξήγηση των χρωμάτων όλων των Σχημάτων που αφορούν στις μελέτες μοριακής πρόσδεσης

	Αμινοξύ φορτισμένο αρνητικά		Δεσμός υδρογόνου (πλευρική αλυσίδα)
	Αμινοξύ φορτισμένο θετικά		Δεσμός υδρογόνου (σκελετός)
	Πολικό αμινοξύ		π-π αλληλεπιδράσεις
	Υδρόφοβο αμινοξύ		Έκθεση στο διαλύτη
	Γλυκίνη		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV

- **Δημιουργία αρχείων που περιέχουν την τοπολογία (topology file) και τις παραμέτρους των προσδετών (coordinate file)**

Αρχικά δημιουργήθηκαν τα αρχεία **prmtop** and **inpcrd** του παραγώγου της ρεσβερατρόλης **14** με την εφαρμογή του προγράμματος **tleap**.

Ακολουθεί η πορεία των εντολών για τον προσδέτη **14**. Το αρχικό αρχείο **pdb** του προσδέτη **14** (**lig.pdb**) προέκυψε από τη μελέτη πρόσδεσής του στη **BACE-1**. Οι εντολές του προγράμματος σημειώνονται με κόκκινο χρώμα, ενώ τα αρχεία που λαμβάνονται με την εκτέλεση της εντολής και είναι χρήσιμα για τα επόμενα στάδια σημειώνονται με μπλε χρώμα.

- 1) Μετατροπή του **pdb** αρχείου σε **mol2** αρχείο

```
$antechamber -i lig.pdb -fi pdb -o lig.mol2 -fo mol2 -c bcc -s 2
```

- 2) Δημιουργία του αρχείου **frcmmod** (**lig.frcmmod**)

```
$parmchk -i lig.mol2 -f mol2 -o lig.frcmmod
```

3) Εκκίνηση του προγράμματος tleap

```
$tleap -f leaprc.ff99SB
```

```
>source leaprc.gaff
```

4) Εισαγωγή και μετονομασία του mol2 αρχείου με το όνομα του προσδέτη που εμφανίζεται στο αρχείο

```
>MOL = loadmol2 lig.mol2
```

5) Έλεγχος του αρχείου

```
>check MOL
```

6) Εισαγωγή του frcmod αρχείου

```
>loadamberparams lig.frcmod
```

7) Αποθήκευση της βιβλιοθήκης (lig.lib) και των αρχείων prmtop (lig.prmtop) και inpcrd (lig.inpcrd) του προσδέτη

```
>saveoff MOL lig.lib
```

```
>saveamberparm MOL lig.prmtop lig.inpcrd
```

▪ Δημιουργία αρχείων που περιέχουν την τοπολογία και τις παραμέτρους του συμπλεγμάτος ένζυμο/προσδέτη

1) Εισαγωγή του προγράμματος tleap

```
$tleap -f leaprc.ff99SB
```

```
>source leaprc.gaff
```

2) Εισαγωγή του αρχείου frcmod του προσδέτη (lig.frcmod) και της βιβλιοθήκης του (lig.lib)

```
>loadamberparams lig.frcmod
```

>loadoff lig.lib

- 3) Εισαγωγή του αρχείου pdb του συμπλέγματος και μετονομασία του σε μία πιο απλή ονομασία

>complex = loadpdb 1w51_lig.pdb

- 4) Αποθήκευση των αρχείων prmtop και inpcrd του συμπλέγματος

>saveamberparm complex **1w51_lig.prmtop 1w51_lig.inpcrd**

- 5) Αποθήκευση του τελικού pdb αρχείου του συμπλέγματος που προκύπτει

>savepdb complex **1w51_lig_final.pdb**

- 6) Έξοδος από το πρόγραμμα

>quit

- **Πορεία προσομοίωσης της Μοριακής Δυναμικής στο σύμπλεγμα ένζυμο/προσδέτη χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το νερό**

Αρχικά δημιουργήθηκε ένα πλέγμα μέσα στο οποίο τοποθετήθηκαν μόρια νερού γύρω από το σύμπλεγμα: παράγωγο της ρεσβερατρόλης 14/BACE-1.

- 1) Εκκίνηση του προγράμματος tleap

\$tleap -f leaprc.ff99SB

>source leaprc.gaff

- 2) Εισαγωγή του αρχείου frcmod του προσδέτη (lig.frcmod) και της βιβλιοθήκης του (lig.lib)

>loadamberparams lig.frcmod

>loadoff lig.lib

- 3) Εισαγωγή και μετονομασία του αρχείου pdb του συμπλέγματος (1w51_lig.pdb) σε μία πιο απλή ονομασία (a)

>a = loadpdb 1w51_lig.pdb

- 4) Δημιουργία του πλέγματος με την πρόσθεση των μορίων νερού

>solvatebox a TIP3PBOX 10.0

- 5) Έλεγχος φορτίων του συμπλέγματος

>charge a

- 6) Προσθήκη θετικών ιόντων

>addions2 a Na+ 0

- 7) Αποθήκευση των αρχείων **.top** και **.crd** του συμπλέγματος μετά την προσθήκη των μορίων νερού και των θετικών φορτίων

>saveamberparm complex **complex.top** **complex.crd**

- 8) Αποθήκευση του τελικού pdb αρχείου του συμπλέγματος που προκύπτει

>savepdb a complex.pdb

Τα αρχεία: **complex.top** και **complex.crd** που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια στο πρώτο στάδιο της μοριακής δυναμικής που είναι η ελαχιστοποίηση του συμπλέγματος. Σε όλα τα στάδια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PMEMD (pmemd.MPI) σε 4 παράλληλους επεξεργαστές (-np 4).

1) Ελαχιστοποίηση συμπλέγματος

```
>mpirun -np 4 ~/Programs/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i min.in -o min.out -p complex.top -c complex.crd -r min.rst
```

2) Θέρμανση συμπλέγματος

```
>mpirun -np 4 ~/Programs/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i heat.in -o heat.out -p complex.top -c min.rst -r heat.rst -x heat.crd
```

3) Πυκνότητα συμπλέγματος

```
mpirun -np 4 ~/Programs/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i density.in -o density.out -p complex.top -c heat.rst -r density.rst -x density.crd
```

4) Εξισορρόπηση συμπλέγματος

```
>mpirun -np 4 ~/Programs/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i eq.in -o eq.out -p complex.top -c density.rst -r eq.rst -x eq.crd
```

5) Προσομοίωση της κίνησης του συμπλέγματος σε καθορισμένο χρόνο

```
>mpirun -np 4 ~/Programs/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i md.in -o md.out -p complex.top -c eq.rst -r md.rst -x md.crd
```

- Αρχεία που χρησιμοποιήθηκαν ως “input” για την εφαρμογή των στάδιων της Μοριακής Δυναμικής

```
> min.in  
minimize  
&cntrl  
imin=1, maxcyc=5000, ncyc=2500,  
cut=20.0, ntb=1, ntp=100,  
/
```

- **imin:** Θέτοντας την τιμή **1** δίνεται εντολή για να διεκπεραιωθεί ελαχιστοποίηση ενέργειας.
- **maxcyc :** Μέγιστος αριθμός των κύκλων ελαχιστοποίησης.
- **ncyc:** Ο αριθμός των κύκλων μετά τον οποίο η μέθοδος ελαχιστοποίησης της ενέργειας αλλάζει από τον αλγόριθμο Απότομης Καταβύθισης στον αλγόριθμο Συζυγών Βαθμίδων (NTMIN = 1).
- **ntb:** Ο αριθμός καθορίζει την εφαρμογή σταθερού όγκου ή σταθερής πίεσης κατά τη διάρκεια της ελαχιστοποίησης. Δηλώνει τα όρια περιοδικότητας (periodic boundary). Θέτοντας την τιμή 0 δηλώνεται η μη εφαρμογή περιοδικότητας στο σύστημα και της μεθόδου PME (Particle Mesh Ewald).
- **ntpr:** Ορίζει τον αριθμό των βημάτων όπου καταγράφεται κάθε φορά η πληροφορία της ενέργειας στα αρχεία “mdout” και “mdinfo”, π.χ σε κάθε εκατό βήματα.
- **cut:** Η τιμή αυτή (σε Å) καθορίζει το όριο για την αποκοπή των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων (nonbonded cutoff).

➤ **heat.in**

```
heating of the system
&cntrl
imin=0, irest=0, ntx=1, ig=-1,
cut=10.0, ntb=1, ntr=0, ntpr=500,
    ntc=2, ntf=2,
    tempi=0, temp0=300.0,
    ntt=3, gamma_ln=2.0,
    nstlim=50000, dt=0.002,
    ntwr=500, ntwx=500, iwrap=1,
/end
```

- **irest:** Εντολή με την οποία ξαναρχίζει ο υπολογισμός. Θέτοντας την τιμή **0** δε δίνεται εντολή στο σύστημα να ξαναρχίσει τον υπολογισμό.
- **ntx:** Επιλογή με την οποία το πρόγραμμα λαμβάνει υπόψη τις αρχικές συντεταγμένες, ταχύτητες και το μέγεθος του πλέγματος από το αρχείο “crd”. Η τιμή **1** δηλώνει ότι λαμβάνει υπόψη μόνο τις αρχικές συντεταγμένες.

- **ig:** Τίθεται σε εφαρμογή η γεννήτρια παραγωγής ψευδοτυχαίων αριθμών. Η τιμή **-1** εκφράζει ότι η τυχαιότητα θα βασισθεί στον παρών χρόνο και ημερομηνία και επομένως θα είναι διαφορετική για κάθε διεξαγωγή του πειράματος.
- **ntb: 1** Χρήση των ορίων περιοδικότητας (periodic boundary) διατηρώντας τον όγκο σταθερό
- **ntr: 1** Τίθενται σε εφαρμογή οι καρτεσιανοί περιορισμοί.
- **ntc:** Επιλογή με την οποία επιτρέπεται στο σύστημα να χρησιμοποιήσει περιορισμό στο μήκος των δεσμών. Η τιμή **2** δηλώνει ότι ο περιορισμός αφορά δεσμούς που εμπλέκουν το υδρογόνο.
- **ntf:** Επιλογή με την οποία αξιολογείται η δύναμη. Η τιμή **2** δηλώνει ότι παραλείπονται οι αλληλεπιδράσεις δεσμών που εμπλέκουν υδρογόνα. Η τιμή αυτή χρησιμοποιείται όταν $ntc = 2$.
- **temp1:** Αρχική θερμοκρασία
- **temp0:** Θερμοκρασία αναφοράς του συστήματος, εάν $ntt > 0$
- **ntt:** Η τιμή **3** δηλώνει ότι η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή σε κανονικό σύνολο. Χρησιμοποιείται η δυναμική Langevin με τη συχνότητα κρούσης να δίνεται από τον όρο γ_{In}
- **gamma_In:** Η συχνότητα κρούσης γ εκφρασμένη σε ps^{-1} όταν $ntt = 3$.
- **nstim:** Αριθμός των βημάτων
- **dt:** Ο χρόνος βήματος (psec)
- **ntwr:** Ορίζει τον αριθμό των βημάτων όπου καταγράφεται το “restrt” αρχείο έτσι ώστε να διασφαλίζεται η διατήρηση των δεδομένων σε περίπτωση που το πρόγραμμα παρουσιάσει προβλήματα κατά τη λειτουργία του.
- **ntwx:** Ορίζει τον αριθμό των βημάτων όπου καταγράφεται κάθε φορά η πληροφορία των συντεταγμένων στο αρχείο “mdcrd”, π.χ σε κάθε πεντακόσια βήματα.
- **iwrap:** Εάν τεθεί τιμή **1** οι συντεταγμένες που γράφηκαν στο αρχείο εκκίνησης και τα αρχεία τροχιάς θα αποθηκεύονται στο αρχικό κιβώτιο.

➤ **density.in**

```
density of the system
&cntrl
imin=0, irest=1, ntx=5, ig=-1,
cut=10.0, ntb=2, pres0=1.0, ntp=1, taup=2.0, ntr=0, ntp=2000,
    ntc=2, ntf=2,
    tempi=300.0, temp0=300.0,
    ntt=3, gamma_ln=2.0,
    nstlim=50000, dt=0.002,
    ntwr=200, ntwx=200, iwrap=1,
/end
```

- **irest**: Εντολή με την οποία ξαναρχίζει ο υπολογισμός όταν η τιμή είναι 1.
- **ntx**: Η τιμή 5 δηλώνει ότι το πρόγραμμα λαμβάνει υπόψη τις αρχικές συντεταγμένες, τις ταχύτητες. Λαμβάνει υπόψη επίσης και το μέγεθος του πλέγματος εάν ntb >0.
- **ntp**: Επιλογή με την οποία η πίεση παραμένει σταθερή. Η τιμή 1 δηλώνει ότι ο υπολογισμός πραγματοποιείται με αλλαγή κλίμακας σύμφωνα με την ισοτροπική θέση.
- **pres0**: Πίεση αναφοράς (σε μονάδες bars, όπου 1 bar = 1atm)
- **taup**: Χρόνος εφησυχασμού πίεσης (ps), όταν ntp >0

➤ **eq.in**

```
equilibration of the system
&cntrl
imin=0, irest=1, ntx=5, ig=-1,
cut=10.0, ntb=2, pres0=1.0, ntp=1, taup=2.0, ntr=0, ntp=2000,
    ntc=2, ntf=2,
    tempi=300.0, temp0=300.0,
    ntt=3, gamma_ln=2.0,
    nstlim=50000, dt=0.002,
    ntwr=200, ntwx=200, iwrap=1,
/end
```

➤ **md.in**

```
Molecular Dynamics on whole system 3ns
&cntrl
```

```
imin=0, irest=1, ntx=5, ig=-1,  
cut=10.0, ntb=2, pres0=1.0, ntp=1, taup=2.0, ntr=0, ntp=50000,  
    ntc=2, ntf=2,  
    tempi=300.0, temp0=300.0,  
    ntt=3, gamma_ln=2.0,  
    nstlim=1500000, dt=0.002,  
    ntwr=5000, ntwx=5000, iwrap=1,  
/end
```

▪ Ανάλυση αποτελεσμάτων Μοριακής Δυναμικής

- Για τον υπολογισμό του RMSD της πρωτεΐνης:

```
>ptraj 1w51.prmtop ptraj.in rmsd_protein.out
```

Το αρχείο ptraj.in διαμορφώθηκε λαμβάνοντας υπόψη και τους 5 υπολογισμούς MD που πραγματοποιήθηκαν

```
➤ ptraj.in  
trajin md.crd  
trajin md1.crd  
trajin md2.crd  
trajin md3.crd  
trajin md4.crd
```

```
rms first mass out rmsd_protein.out @CA
```

- Για τον υπολογισμό του RMSD του προσδέτη:

```
>ptraj 1w51.prmtop ptraj_drug.in rmsd_drug.out
```

```
➤ ptraj_drug.in  
trajin md.crd  
trajin md1.crd  
trajin md2.crd  
trajin md3.crd  
trajin md4.crd
```

```
rms first mass out rmsd_drug.out :388
```

Ο προσδέτης στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη είχε τον αριθμό 388

Τα δύο αρχεία αναλύθηκαν στη συνέχεια με το πρόγραμμα xmgrace

- Για τον υπολογισμό των δεσμών υδρογόνου:

```
>ptraj 1w51.prmtop ptraj_hb.in > hb.out
```

Το αρχείο ptraj_hb.in διαμορφώθηκε λαμβάνοντας υπόψη και τους 5 υπολογισμούς MD που πραγματοποιήθηκαν:

➤ **ptraj_hb.in**

```
trajin md.crd
trajin md1.crd
trajin md2.crd
trajin md3.crd
trajin md4.crd
```

```
#-- Donors from standard amino acids
```

```
donor mask :GLN@OE1
donor mask :GLN@NE2
donor mask :ASN@OD1
donor mask :ASN@ND2
donor mask :TYR@OH
donor mask :ASP@OD1
donor mask :ASP@OD2
donor mask :ASH@OD2
donor mask :GLU@OE1
donor mask :GLU@OE2
donor mask :SER@OG
donor mask :THR@OG1
donor mask :HIS@ND1
donor mask :HIE@ND1
donor mask :HID@NE2
```

```
#-- Acceptors from standard amino acids
```

```
acceptor mask :ASN@ND2 :ASN@HD21
acceptor mask :ASN@ND2 :ASN@HD22
acceptor mask :TYR@OH :TYR@HH
acceptor mask :GLN@NE2 :GLN@HE21
acceptor mask :GLN@NE2 :GLN@HE22
acceptor mask :TRP@NE1 :TRP@HE1
acceptor mask :LYS@NZ :LYS@HZ1
acceptor mask :LYS@NZ :LYS@HZ2
acceptor mask :LYS@NZ :LYS@HZ3
acceptor mask :SER@OG :SER@HG
acceptor mask :THR@OG1 :THR@HG1
acceptor mask :ARG@NH2 :ARG@HH21
acceptor mask :ARG@NH2 :ARG@HH22
```

```
acceptor mask :ARG@NH1 :ARG@HH11
acceptor mask :ARG@NH1 :ARG@HH12
acceptor mask :ARG@NE :ARG@HE
acceptor mask :HIS@NE2 :HIS@HE2
acceptor mask :HIE@NE2 :HIE@HE2
acceptor mask :HID@ND1 :HID@HD1
acceptor mask :HIP@ND1,NE2 :HIP@HE2,HD1
acceptor mask :ASH@OD2 :ASH@HD2
```

```
#-- Backbone donors and acceptors for this particular molecule
# N-H for prolines do not exist so are not in the mask
#
donor mask @O
acceptor mask :2-24,27-45,47,49-71,73-89,91-92,94-130,132-
136,138-148,150-161,163-193,195-238,240-259,261-277,279-282,284-
303,305-309,311-374,376-387@N :2-387@H
```

```
#carol11 inside BACE-1
donor mask :388@O1
donor mask :388@O2
donor mask :388@O3
acceptor mask :388@O1 :388@H1
acceptor mask :388@O2 :388@H33
acceptor mask :388@O3 :388@H34
```

```
#-- series hbt is just a placeholder to ensure we get the full analysis. If
you don't
#have the word series you don't get a full analysis.
hbond distance 3.5 angle 120.0 print
```

- Υπολογισμός της ενέργειας σύνδεσης με τη μέθοδο MM-PBSA

Για τον υπολογισμό της ενέργειας σύνδεσης:

```
>mpirun -np 4 ~/Programs/amber11/exe/pmemd.MPI -O -i mmpbsa.in -o
RESULT.dat -sp 1w51.prmtop -cp complex.top -lp lig.top -rp prot.top
```

➤ **mmpbsa.in**

```

Input file for running PB and GB in serial
&general
  endframe=1500, keep_files=2,
/
&gb
  igb=2, saltcon=0.100,
/
&pb
  istrng=0.100,
/

```

- **PB:** Μέθοδος Polar Boltzmann
- **GB:** Μέθοδος Generalized Born
- **igb:** Η τιμή **2** δηλώνει ότι το πρόγραμμα χρησιμοποιεί ένα τροποποιημένο μοντέλο GB που ανέπτυξε ο Onufrien και οι συνεργάτες του.¹²⁹
- **saltcon:** Ορίζει τη συγκέντρωση (M) 1-1 κινητών αντισταθμιστικών ιόντων σε διάλυμα
- **istrng:** παράμετρος ιοντικής ισχύος (ion strength parameter).

Τα αρχεία complex.top, lig.top και prot.top προκύπτουν από το 1w51_final.pdb και με το πρόγραμμα tleap

Μετονομάζονται καθένα από τα αρχεία complex.pdb = a, lig.pdb = b, prot.pdb = c και φορτώνονται στο πρόγραμμα

```

$tleap
>a = loadpdb complex.pdb
>set default PBradii mbondi2
>b = loadpdb lig.pdb
>set default PBradii mbondi2
>c = loadpdb prot.pdb
>set default PBradii mbondi2

```


Αποθηκεύονται τα αρχεία **.top** και **.crd** για το καθένα από αυτά

>saveamberparm a complex.top complex.crd

>saveamberparm b lig.top lig.crd

>saveamberparm c prot.top prot.crd

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

▪ Δημοσιεύσεις σε ξένα περιοδικά:

1. C. *Koukoulitsa*, Villalonga-Barber C., Csonka R., Alexi X., Steele B.R., Belda, O. Micha-Screttas M., Dellis D., Leonis G., Alexis M.,N, Papadopoulos M., Mavromoustakos T. “Rational design and biological evaluation of novel resveratrol and glyoxylato-aroylhydrazone analogs against Alzheimer’s disease”, submitted to **J. Med. Chem.**

2. C. *Koukoulitsa*, X. Alexi, S. Durdagi, B. R. Steele, A. Tsantili-Kakoulidou, E. Siapi, M. M.-Screttas, T. Mavromoustakos, C.V.-Barber, M.N. Alexis, “Comparison of thermal effects of stilbenoid analogs in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular dynamics: Correlation of thermal effects and topographical position with antioxidant activity”, **Eur. J. Biophys.**, 2011, 40 (7), 865-875.

3. T. Mavromoustakos, S. Durdagi, C. *Koukoulitsa*, M. Simcic, M. G. Papadopoulos, M. Hodoscek, S. G. Grdadolnikc, “Strategies in the rational drug design” **Curr. Med. Chem.**, 2011, 18 (17), 2517-253.

4. G. Agelis, K. Kelaidonis, A. Resvani, D. Kalavrizioti, M.-E. Androutsou, P. Plotas, D. Vlahakos, C. *Koukoulitsa*, T. Tselios, T. Mavromoustakos, J. Matsoukas, “Facile and efficient syntheses of a series of N-Benzyl and N-Biphenylmethyl substituted imidazole derivatives based on (E)-Urocanic acid, as angiotensin II AT1 receptor blockers”, **Molecules**, 2013, 18, 7510-7532.

5. G. Agelis, A. Resvani, D. Ntountaniotis, P. Chatzigeorgiou, C. *Koukoulitsa*, M.E. Androutsou, P. Plotas, J. Matsoukas, T. Mavromoustakos, T. Čendak, T.

U. Godec, G. Mali, “Interactions of the potent synthetic AT1 antagonist analog BV6 with membrane bilayers and mesoporous silicate matrices”, **Biochim. Biophys. Acta**, 2013, 1828, 1846–1855.

6. G. Agelis, A. Resvani, C. *Koukoulitsa*, T. Tůmová, J. Slaninová, D. Kalavrizioti, K. Spyridaki, A. Afantitis, G. Melagraki, A. Siafaka, E. Gkini, G. Megariotis, S. G. Grdadolnik, M. G. Papadopoulos, D. Vlahakos, M. Maragoudakis, G. Liapakis, T. Mavromoustakos, J. Matsoukas, “Rational design, efficient syntheses and biological evaluation of N,N'-symmetrically bis-substituted butylimidazole analogs as a new class of potent Angiotensin II receptor blockers” **Eur. J. Med. Chem.** 2013, 62, 352-370.

▪ **Δημοσιεύσεις σε ελληνικά περιοδικά:**

1. *Αικ. Koukoulitsa*, Θ. Μαυρομούστακος, “Η ανάπτυξη αναστολέων β-σεκρετάσης για την καταπολέμηση της ασθένειας Alzheimer”, **Ιατρικά Νέα**, 2012, 48, 56-61.

2. *Αικ. Koukoulitsa*, T. Kellici, Θ. Μαυρομούστακος, “Οι Αναστολείς MAO ως Αντιπαρκινσονικά Φάρμακα”, **Ιατρικά Νέα**, 2012, 49, 50-56.

3. Θ. Μαυρομούστακος, Χ. Τζούπης, *Αικ. Koukoulitsa*, T. Kellici, Γ. Λεώνης, Μ. Γ. Παπαδόπουλος, Γ. Λιαπάκης, Δ. Λογοθέτης, “Νέα πολυστοχευμένα φάρμακα κατά των πολυπαραγοντικών ασθενειών”, **Ιατρικά Νέα**, 2012, 50, 48-50.

▪ **Προφορική ανακοίνωση σε συνέδρια:**

1. C. *Koukoulitsa*, Biological evaluation and Molecular Dynamics studies of novel resveratrol and glyoxylato-arylhidrazone analogs against Alzheimer’s disease, Drug Design Symposium, Istanbul, 21-23 March 2013.

▪ **Αναρτημένες ανακοινώσεις σε συνέδρια:**

1. C. Koukoulitsa, et al. “The use of VolSurf approach to explore IAM and HAS chromatographic indices”, 18th QSAR, 19-24 September, Rhodes, Greece.
2. C., Koukoulitsa, et al. “Structural elucidation of BV6 and its molecular docking at BACE-1” 12ο Συνέδριο Ιατρικής Χημείας, 12-15 Απριλίου 2011, Πάτρα.
3. C., Koukoulitsa, et al. “The effects of BV6 at lipid bilayers and the AT1 receptor site”, 12ο Συνέδριο Ιατρικής Χημείας, 12-15 Απριλίου 2011, Πάτρα.
4. C., Koukoulitsa, et al. “Structural elucidation, conformational properties and molecular docking study at BACE-1 of bioactive molecule BV6” 29th Trends in Drug Research, 2-7 October 2011, Cyprus.
5. C., Koukoulitsa, et al. “Rational design and biological evaluation of novel resveratrol and glyoxylato-aryylhydrazone analogs against Alzheimer disease”, 15ο Ελληνικό Συμπόσιο Ιατρικής Χημείας, 25-27 Μαΐου 2012, Αθήνα.
6. A. Resvani, C. Nikolis, G. Liapakis, D. Vlahakos, C. Koukoulitsa, et. al. Facile and Efficient Syntheses of Structurally Modified E-urocanic Acid Analogs as Potent Anagiotensin II Receptor Blockers, 32nd European Peptide Symposium, 2-7 September 2012, Athens. **J. Pep. Sci. Proceedings**, 358-360.
7. G. Agelis, A. Resvani, C. Koukoulitsa, et al. Rational Design, Efficient Synthesis, Biological Evaluation of New N,N '-bis-substituted Butylimidazole Analogs as Potent Angiotensin Receptor Blockers, 32nd European Peptide Symposium, 2-7 September 2012, Athens. **J. Pep.Sci. Proceedings**, 376-378.
8. C. Koukoulitsa, et al. Biological evaluation and molecular dynamics studies of novel resveratrol and glyoxylato-aryylhydrazone analogs against alzheimer

disease, 31st Camerino-Cyprus-Noordwijkerhout Symposium, "Receptor Chemistry Skyline", Camerino, May 19-23, 2013.

9. *Αικ. Κουκουλίτσα, Χ. Κοντογιώργης, Δ. Χατζηπαύλου, Θ. Μαυρομούστακος*, In Silico μελέτες 3-βενζυλοκουμαρινών ως MAO-B αναστολείς, 14^ο Συνέδριο Ιατρικής Χημείας, Πάτρα, 13-14 Μαΐου, 2013.

▪ **Συμμετοχή στην οργανωτική επιτροπή των συνεδρίων:**

1. 18th QSAR, 19-24 September 2010, Rhodes, Greece.

2. 29th Trends in Drug Research, 2-7 October, 2011, Cyprus.

▪ **Συνεπικούρηση στη διεκπεραίωση δύο διπλωματικών (Λ. Κοκκινάκης, Ν. Μουστάκας, και Μ. Τζίβα, Κ. Μόσχοβου) και μίας μεταπτυχιακής εργασίας (Χ. Νταλταγιάννη)**

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Alzheimer's Disease Facts and Figures. www.alz.org.
2. M. Citron, Strategies for disease modification in Alzheimer's disease, *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 5, no. 9, Sep. 2004, pp. 677-685.
3. J. Yuan, S. Venkatraman, V. Zheng, B.M. McKeever, L.W. Dillard, and S.B. Singh, Structure-based design of β -Site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 11, Jun 2012, pp. 4156-4180.
4. H. Shimizu, A. Tosaki, K. Kaneko, T. Hisano, T. Sakurai, and N. Nukina, Crystal structure of an active form of BACE1, an enzyme responsible for amyloid β protein production, *Mol. Cel. Biol.*, vol. 28, no. 11, Jun. 2008, pp. 3663-3671.
5. M. Brandt, Enzyme mechanisms. www.rose-hulman.edu/~brandt/Chem330/Enzyme_mech_examples.pdf.
6. J.M. Travins, M.G. Bursavich, D.F. Veber, and D.H. Rich, Aspartic protease inhibitors: Expedient synthesis of 2-substituted statines, *Org. Lett.*, vol. 3, no. 17, Aug. 2001, pp. 2725-2728.
7. L. Hong, G. Koelsch, X. Lin, S. Wu, S. Terzyan, A.K. Ghosh, X.C. Zhang, and J. Tang, Structure of the protease domain of memapsin 2 (β -secretase) complexed with inhibitor, *Science*, vol. 290, no. 5489, Oct. 2000, pp. 150-153.
8. F. Wångsell, K. Gustafsson, I. Kvarnström, N. Borkakoti, M. Edlund, K.Jansson, J. Lindberg, A. Hallberg, Å. Rosenquist, and B. Samuelson, Synthesis of potent BACE-1 inhibitors incorporating a hydroxyethylene isostere as central core, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 3, Mar. 2010, pp. 870-882.
9. C. Bjorklund, S. Oscarson, K. Benkestock, N. Borkakoti, K. Jansson, J. Lindberg, L. Vrang, A. Hallberg, A. Rosenquist, and B. Samuelsson, Design and synthesis of potent and selective BACE-1 inhibitors, *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 4, Feb. 2010, pp. 1458-1464.
10. F. Wångsell, P. Nordeman, J. Sävmarker, R. Emanuelsson, K. Jansson, J. Lindberg, Å. Rosenquist, B. Samuelson, and M. Larhed, Investigation of α -phenylnorstatine and α -benzylnorstatine as transition state isostere motifs in the search for new BACE-1 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 19, no. 1, Jan. 2011, pp. 145-155.
11. J.N. Freskos, Y.M. Fobian, T.E. Benson, M.J. Bienkowski, D.L. Brown, T.L. Emmons, R. Heintz, A. Laborde, J.J. McDonald, B.V. Mischke, J.M. Molyneaux, J.B. Moon, P.B. Mullins, D.B. Prince, D.J. Paddock, A.G. Tomasselli, and G. Winterrowd, Design of potent inhibitors of human β -secretase. Part 1., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 1, Jan. 2007, pp. 73-77.

12. J.N. Freskos, Y.M. Fobian, T.E. Benson, J.B. Moon, M.J. Bienkowski, D.L. Brown, T.L. Emmons, R. Heintz, A. Laborde, J.J. McDonald, B.V. Mischke, J.M. Molyneaux, P.B. Mullins, D.B. Prince, D.J. Paddock, A.G. Tomasselli, and G. Winterrowd, Design of potent inhibitors of human b-secretase. Part 2., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 1, Jan. 2007, pp. 78-81.
13. J.M. Sealy, A.P. Truong, L. Tso, G.D. Probst, J. Aquino, R.K. Hom, B.M. Jagodzinska, D. Dressen, D.W.G. Wone, L. Brogley, V. John, M.A. Tung, J. Pleiss, A. Tucker, A.W. Konradi, M.S. Dappen, G. Toth, H. Pan, L. Ruslim, J. Miller, M.P. Bova, S. Sinha, K.P. Quinn, and J.-M. Sauer, Design and synthesis of cell potent BACE-1 inhibitors: Structure–activity relationship of P1' substituents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 22, Nov. 2009, pp. 6386-6391.
14. H. Rueeger, J.-M. Rondeau, C. McCarthy, H. Möbitz, M. Tintelnot-Blomley, U. Neumann, and S. Desrayaud, Structure based design, synthesis and SAR of cyclic hydroxyethylamine (HEA) BACE-1 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 22, Nov. 2011, pp. 1942-1947.
15. D.C. Cole, J.R. Stock, R. Chopra, R. ECowling, J.W. Ilingboe, K.Y. Fan, B.L. Harrison, H. Yun, S. Jacobsen, L.D. Jennings, G. Jin, P.A. Lohse, M.S. Malamas, E.S. Manas, W.J. Moore, M.-M. O'Donnell, A.M. Olland, A.J. Robichaud, K. Svenson, J. Wu, E. Wagnerd, and J. Bardd, Acylguanidine inhibitors of β -secretase: Optimization of the pyrrole ring substituents extending into the S1 and S3 substrate binding pockets, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 3, Feb. 2008, pp. 1063-1066.
16. E.W. Baxter, K.A. Conway, L. Kennis, F. Bischoff, M.H. Mercken, H.L. Winter, C.H. Reynolds, B.A. Tounge, C. Luo, M.K. Scott, Y. Huang, M. Braeken, S.M. Pieters, D.J. Berthelot, S. Masure, W.D. Bruinzeel, A.D. Jordan, M.H. Parker, R.E. Boyd, J. Qu, R.S. Alexander, D.E. Brenneman, and A.B. Reitz, 2-Amino-3,4-dihydroquinazolines as inhibitors of BACE-1 (beta-Site APP cleaving enzyme): Use of structure based design to convert a micromolar hit into a nanomolar lead, *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 18, Sep. 2007, pp. 4261-4264.
17. B.-M. Swahn, J. Holenz, J. Kihlström, K. Kolmodin, J. Lindström, N. Plobeck, D. Rotticci, F. Sehgelmeble, M. Sundström, S. Berg, J. von Fälting, B. Georgievaska, S. Gustavsson, J. Neelissen, M. Ek, L.-L. Olsson, and S. Berg, Aminoimidazoles as BACE-1 inhibitors: The challenge to achieve in vivo brain efficacy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 5, Mar. 2012, pp. 1854–1859.
18. T.G. Steele, I.D. Hills, A.A. Nomland, P. León, T. Allison, G. McGaughey, D. Colussi, K. Tugusheva, S.J. Haugabook, P. Zuck, S.L. Graham, S.J. Stachel, and A.S. Espeseth, Identification of a small molecule b-secretase inhibitor that binds without catalytic aspartate engagement, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 1, Jan. 2009, pp. 17-20.

19. R. Silvestri, Boom in the development of non-peptidic beta-secretase (BACE1) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Med. Res. Rev.*, vol. 29, no. 2, Mar. 2009, pp. 295-338.
20. L.B. Salum, and N.F. Valadares, Fragment-guided approach to incorporating structural information into a CoMFA study: BACE-1 as an example, *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, vol. 24, no. 10, Oct. 2010, pp. 803-817.
21. M.M. Essa, R.K.Vijayan, G. Castellano-Gonzalez, M.A. Memon, N. Braidy, and G.J. Guillemin, Neuroprotective effect of natural products against Alzheimer's disease, *Neurochem. Res.*, vol. 37, no. 9, Sep. 2012, pp. 1829-1842.
22. Γ.Α.Τάγαρης, *Νόσος Πάρκινσον. Παθοφυσιολογία-Παθογένεια*. Εκδόσεις ΕΙΕ: p 181-193.
23. C. Binda, M. Li, F. Hubalek, N. Restelli, D.E. Edmondson, and A. Mattevi, Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures, *PNAS*, vol. 100, no. 17, Aug. 2003, pp. 9750-9755.
24. P. Riederer, and G. Laux, MAO-inhibitors in Parkinson's Disease, *Exp. Neurobiol.*, vol. 20, no. 1, Mar 2011, pp. 1-17
25. H.H. Fernandez, and J.J. Chen, Monamine oxidase inhibitors: Current and emerging agents for Parkinson disease, *Clin. Neuropharmacol.*, vol. 30, no. 3, May-Jun. 2007, pp. 150-168.
26. A.H.V. Schapira, Neurobiology and treatment of Parkinson's disease, *Trends Pharm. Sci.*, vol. 30, no. 1, Jan. 2009, pp. 41-47
27. C. Binda, P.N. Vinson, F. Hubalek, D.E. Edmondson, and A. Mattevi, Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders, *Struct. Biol.*, vol. 9, no. 1, Jan. 2002, pp. 22-26.
28. M.B.H. Youdim, D. Edmondson, and K.F. Tipton, The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors, *Nat. Rev.*, vol. 7, no. 4, Apr. 2006, pp. 295-309
29. L. De Collibus, M. Li, C. Binda, A. Lustig, D.E. Edmondson, and A. Mattevi, Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B, *PNAS*, vol. 102, no. 36, Sep. 2005, pp. 12684-12689.
30. S.Y. Son, J. MA, Y. Kondou, M. Yoshimura, E. Yamashita, and T. Tsukihara, Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors, *PNAS*, vol. 105, no. 15, Apr. 2008, pp. 5739-5744.
31. L. Pisani, G. Muncipinto, T.F. Miscioscia, O. Nicolotti, F. Leonetti, M. Catto, C. Caccia, P. Salvati, R.S. Otero, E.M. Alvarez, C. Passeleu, and A. Carotti, Discovery of a novel class of potent coumarin monoamine oxidase B inhibitors: Development and biopharmacological profiling of 7-[(3-chlorobenzyl)oxy]-4-[(methylamino)methyl]-2H-chromen-2-one

methanesulfonate (NW-1772) as a highly potent, selective, reversible, and orally active monoamine oxidase B inhibitor, *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 21, Nov. 2009, pp. 6685-6706.

32. F. Chimenti, E. Maccioni, D. Secci, A. Bolasco, P. Chimenti, A. Granese, O. Befani, P. Turini, S. Alcaro, F. Ortuso, M.C. Cardia, and S. Distinto, Selective inhibitory activity against MAO and molecular modeling studies of 2-thiazolylhydrazone derivatives *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 4, Feb. 2007, pp. 707-712.

33. F. Chimenti, R. Fioravanti, A. Bolasco, P. Chimenti, D. Secci, F. Rossi, M. Yanez, F. Orallo, F. Ortuso, S. Alcaro, R. Cirilli, R. Ferretti, and M.L. Sanna, A new series of flavones, thioflavones, and flavanones as selective monoamine oxidase-B inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, no. 3, Feb. 2010, pp. 1273-1279.

34. G. Vallejos, A. Fierro, M.C. Rezende, S.S. Boza, and M.R. Parada, Heteroarylisopropylamines as MAO inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 13, no. 15, Jul. 2005, pp. 4450-4457

35. *Designing Multi-Target Drugs*. RSC Publishing: Lilly Research Centre, Windlesham Research Centre, Surrey GU20 9PH, UK, 2012.

36. J.P. Petzer, N. Castagnoli, M.A. Schwarzschild, J.F. Chen, and C.J. Schyf, Dual-target-directed drugs that block Monoamine Oxidase B and Adenosine A2A receptors for Parkinson's disease, *Neurotherapeutics*, vol. 6, no. 1, Jan. 2009, pp. 141-151.

37. R. Salomon-Ferrer, D.A. Case, and R.C. Walkerand, An overview of the Amber biomolecular simulation package, *WIREs Comput Mol Sci.*, vol. 3, no. 2, Mar.-Apr. 2012, pp. 198-210.

38. Y. Feng, and X. Wang, Antioxidant therapies for Alzheimer's disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 17, Apr. 2012, pp. 17 pages.

39. P.H. Axelsen, H. Komatsu, and I.V.J. Murray, Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Physiol.*, vol. 26, no. 1, Feb. 2011, pp. 54-69.

40. D.Y. Choi, Y.J. Lee, J.T. Hong, H.J. Lee, Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease, *Brain Res. Bull.*, vol. 87, no. 2-3, Feb. 2012, pp. 144-153.

41. R.J. Williams, and J.P. Spencer, Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 52, no. 1, Jan. 2012, pp. 35-45.

42. T.S. Anekonda, Resveratrol-A boon for treating Alzheimer's disease?, *Brain Res. Rev.*, vol. 52, no. 2, Sep. 2006, pp. 316-326.

43. M. Fukui, H.J. Choi, and B.T. Zhu, Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death, *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 49, no. 5, Sep. 2010, pp. 800-813.

44. K. Mullane, and M. Williams, Alzheimer's therapeutics: Continued clinical failures question the validity of the amyloidhypothesis-butwhatliesbeyond?, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 85, no. 3, Feb. 2013, pp. 289-305.
45. Y.H. Choi, M.Y. Yoo, C.W. Choi, M.R. Cha, G.H. Yon, D.Y. Kwon, Y.S. Kim, W.K. Park, and S.Y. Ryu, A new specific BACE-1 inhibitor from the stembark extract of *Vitis vinifera*, *Planta Med.*, vol. 75, no. 5, Apr. 2009, pp. 537-540.
46. C.W. Choi, Y.H. Choi, M.R. Cha, Y.S. Kim, G.H. Yon, K.S Hong, W.K. Park, Y.H. Kim, and S.Y. Ryu, *In vitro* BACE-1 inhibitory activity of resveratrol oligomers from the seed extract of *paeonia lactiflora*, *Planta Med.*, vol. 77, no. 4, Mar. 2011, pp. 374-376.
47. G. Skrettas, A.K. Meligova, C. Villalonga-Barber, D.J. Mitsiou, M.N. Alexis, M. Micha-Screttas, B.R. Steele, C.G. Screttas, and D.W. Wood, Engineered chimeric enzymes as tools for drug discovery: Generating reliable bacterial screens for the detection, discovery, and assessment of estrogen receptor modulators, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 27, Jul. 2007, pp. 8443-8457.
48. C. Villalonga-Barber, A.K. Meligova, X. Alexi, B.R. Steele, C.E. Kouzinos, C.G. Screttas, E.S. Katsanou, M. Micha-Screttas, and M.N. Alexis, New hydroxystilbenoid derivatives endowed with neuroprotective activity and devoid of interference with estrogen and aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 19, no. 1, Jan. 2011, pp. 339-351.
49. C. Koukoulitsa, S. Durdagi, E. Siapi, C. Villalonga-Barber, X. Alexi, B.R. Steele, M. Micha-Screttas, M.N. Alexis, A. Tsantili-Kakoulidou, and T. Mavromoustakos, Comparison of thermal effects of stilbenoid analogs in lipid bilayers using differential scanning calorimetry and molecular dynamics: correlation of thermal effects and topographical position with antioxidant activity, *Eur. Biophys. J.*, vol. 40, no. 7, Jul. 2011, pp. 865-875.
50. M.G. Sarpietro, C. Spatafora, C. Tringali, D. Micieli, and F. Castelli, Interaction of resveratrol and its trimethyl and triacetyl derivatives with biomembrane models studied by differential scanning calorimetry, *J. Agr. Food Chem.*, vol. 55, no. 9, May 2007, pp. 3720-3728.
51. C. Fotakis, D. Christodouleas, P. Zoumpoulakis, A. Gili, E. Kritsi, N.-P. Benetis, M. Zervou, H. Reis, M. Papadopoulos, and T. Mavromoustakos, Comparative biophysical studies of sartan class drug molecules losartan and candesartan (CV-11974) with membrane bilayers, *J. Chem. Phys. B*, vol. 115, no. 19, May 2011, pp. 6180-6192.
52. T. Mavromoustakos, D. Yang, and A. Makriyannis, Topography of alphaxalone and Δ 16-alphaxalone in membrane bilayers containing cholesterol, *BBA-Biomembranes* vol. 1194, no. 1, Aug. 1994, pp. 69-74.
53. P. Zoumpoulakis, I. Daliani, M.Zervou, I. Kyrikou, E. Siapi, G. Lamprinidis, E. Mikros, and T. Mavromoustakos, Losartan's molecular basis of

interaction with membranes and AT 1 receptor, *Chem. Phys. Lipids* vol. 125, no. 1, Sep. 2003, pp. 13-25.

54. B.R. Steele, M. Micha-Screttas, and C.G. Screttas, Applications of novel sterically demanding aromatics in organometallic synthesis, *Appl. Organomet. Chem.*, vol. 16, no. 9, Sep. 2002, pp. 501-505.

55. R. Csonka, C. Villalonga-Barber, V. Psycharis, C.P. Raptopoulou, and B.R. Steele, Transition metal complexes of new glyoxylato-arylohydrazones and their role in L-ascorbic acid oxidation inhibition, *Polyhedron*, vol. 34, no. 1, Feb. 2012, pp. 181-187.

56. G. Cruciani, P. Crivori, P.-A. Carrupt, and B. Testa, Molecular fields in quantitative structure–permeation relationships: the VolSurf approach, *J. Mol. Str.: Theochem*, vol. 503, no. 1-2, May 2000, pp. 17-30.

57. P. Crivori, G. Cruciani, P.A. Carrupt, and B. Testa, Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure, *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 11, Jun. 2000, pp. 2204-2216.

58. F. Milletti, and A. Vulpetti, Tautomer preference in PDB complexes and its impact on structure-based drug discovery, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 50, no. 6, Jun. 2010, pp. 1062-1074.

59. S. Patel, L. Vuillard, A. Cleasby, C.W. Murray, and J. Yon, Apo and inhibitor complex structures of BACE (beta-secretase), *J. Mol. Biol.*, vol. 343, no. 2, Oct. 2004, pp. 407-416.

60. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, and P.E. Bourne, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, 2000, pp. 235-242.

61. *Small-Molecule Drug Discovery Suite 2012: Glide, version 5.8*, Schrödinger: LLC: New York, NY, 2012.

62. A. Barman, and R. Prabhakar, Protonation states of the catalytic dyad of β -secretase (BACE1) in the presence of chemically diverse inhibitors: A molecular docking study, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, no. 5, May 2012, pp. 1275–1287.

63. H. Park, and S. Lee, Determination of the active site protonation state of β -secretase from molecular dynamics simulation and docking experiment: implications for structure-based inhibitor design, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 52, Dec. 2003, pp. 16416-16422.

64. R. Rajamani, and C.H. Reynolds, Modeling the protonation states of the catalytic aspartates in β -secretase, *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 21, Oct. 2004, pp. 5159-5166.

65. N. Yu, S.A. Hayik, B. Wang, N. Liao, C.H. Reynolds, and K.M. Merz, Assigning the protonation states of the key aspartates in β -secretase using QM/MM X-ray structure refinement, *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 2, no. 4, 2006, pp. 1057-1069.

66. S. Lu, H. Wang, L. Zhou, Z. Yao, Precise location of proton of β -secretase for catalytic aspartates (Asp 32 and Asp 228) in Alzheimer's patients, *Neural. Regen. Res.*, vol. 5, no. 8, Apr. 2010, pp. 572-578.
67. J.L. Domínguez, T. Christopeit, M.C. Villaverde, T. Gossas, J.M. Otero, S. Nystrom, V. Baraznenok, E. Lindstrom, U.H. Danielson, and F. Sussman, Effect of the protonation state of the titratable residues on the inhibitor affinity to BACE-1, *Biochemistry*, vol. 49, no. 34, Aug. 2010, pp. 7255-7263.
68. F. Sussman, J.M. Otero, M.C. Villaverde, M. Castro, J.L. Domínguez, L. González-Louro, R.J. Estévez, and J.C. Estévez, On a possible neutral charge state for the catalytic dyad in β -secretase when bound to hydroxyethylene transition state analogue inhibitors, *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 8, Apr. 2011, pp. 3081-3085.
69. C. Gueto-Tettay, J.C. Drosos, and R. Vivas-Reyes, Quantum mechanics study of the hydroxyethylamines-BACE-1 active site interaction energies, *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, vol. 25, no. 6, Jun. 2011, pp. 583-597.
70. T. Polgár, and G.M. Keserü, Virtual screening for β -secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228, *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 11, Jan. 2005, pp. 3749-3755.
71. B.A. Tounge, R. Rajamani, E.W. Baxter, A.B. Reitz, and C.H. Reynolds, Linear interaction energy models for beta-secretase (BACE) inhibitors: Role of van der Waals, electrostatic, and continuum-solvation terms, *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 24, no. 6, May 2006, pp. 475-484.
72. R. Rajamani, and C.H. Reynolds, Modeling the protonation states of the catalytic aspartates in β -secretase, *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 21, Oct. 2004, pp. 5159-5166.
73. P. Kacker, M. Masetti, M. Mangold, G. Bottegoni, and A. Cavalli, Combining dyad protonation and active site plasticity in BACE-1 structure-based drug design, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, no. 5, May 2012, pp. 1079-1085.
74. D.C. Bas, D.M. Rogers, and J.H. Jensen, Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein-ligand complexes, *Proteins*, vol. 73, no. 3, Nov. 2008, pp. 765-783.
75. M.H.M. Olsson, C.R. Søndergard, M. Rostkowski, and J.H. Jensen, PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions, *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, no. 2, Jan. 2011, pp. 525-537.
76. F. Milletti, L. Storchi, G. Sforna, and G. Cruciani, New and original pKa prediction method using grid molecular interaction fields, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 47, no. 6, Nov.-Dec. 2007, pp. 2172-2181.
77. S. Bowers, Y.Z. Xu, S. Yuan, G.D. Probst, R.K. Hom, W. Chan, A.W. Konradi, H.L. Sham, Y.L. Zhu, P. Beroza, H. Pan, E. Brecht, N. Yao, J. Loughheed, D. Tam, Z. Ren, L. Ruslim, M.P. Bova, and D.R. Artis, Structure-based design of novel dihydroisoquinoline BACE-1 inhibitors that do not

engage the catalytic aspartates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 7, Apr. 2013, pp. 2181-2186.

78. S. Serra, G. Ferino, M.J. Matos, S.V. Rodriguez, G. Delogu, D. Viña, E. Cadoni, L. Santana, and E. Uriarte, Hydroxycoumarins as selective MAO-B inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 1, Jan. 2012, pp. 258-261.

79. G. Delogu, C. Picciau, G. Ferino, E. Quezada, G. Podda, E. Uriarte, and D. Viña, Synthesis, human monoamine oxidase inhibitory activity and molecular docking studies of 3-heteroaryl coumarin derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 4, Apr. 2011, pp. 1147-1152.

80. M.J. Matos, C. Teran, Y.P. Castillo, E. Uriarte, L. Santana, and D. Viña, Synthesis and study of a series of 3-aryl coumarins as potent and selective monoamine oxidase B inhibitors, *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 20, Oct. 2011, pp. 7127-7137.

81. F. Chimenti, D. Secci, A. Bolasco, P. Chimenti, B. Bizzarri, A. Granese, S. Carradori, M. Yanez, F. Orallo, F. Ortuso, and S.J. Alcaro, Synthesis, molecular modeling, and selective inhibitory activity against human monoamine oxidases of 3-carboxamido-7-substituted coumarins, *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 9, Apr. 2009, pp. 1935-1942.

82. C. Gnerre, M. Catto, F. Leonetti, P. Weber, P.A. Carrupt, C. Altomare, A. Carotti, and B. Testa, Inhibition of monoamine oxidases by functionalized coumarin derivatives: biological activities, QSARs, and 3D-QSARs, *J. Med. Chem.*, vol. 43, no. 25, Dec. 2000, pp. 4747-4758.

83. M.B. Rendenbach, R. Schlecker, M. Traut, and H. Weifenbachs, Synthesis of coumarins as subtype-selective inhibitors of monoamine oxidase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 4, no. 10, May 1994, pp. 1195-1198.

84. D. Secci, S. Carradori, A. Bolasco, P. Chimenti, M. Yáñez, F. Ortuso, and S. Alcaro, Synthesis and selective human monoamine oxidase inhibition of 3-carbonyl, 3-acyl, and 3-carboxyhydrazido coumarin derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 10, Oct. 2011, pp. 4846-4852.

85. D.T. Huong, N.T. Dat, C.V. Mminh, J.S. Kang, Y.H. Kim, Monoamine oxidase inhibitors from *Aquilaria agallocha*, *Nat. Prod. Sci.*, vol. 8, no. 1, 2002, pp. 30-33.

86. H.J. Seon, H.H. Xiang, S.H. Seong, J.S. Hwang, J.H. Hwang, L. Dongho, K.L. Myung, S.R. Jai, and Y.H. Bang, Monoamine oxidase inhibitory coumarins from the aerial parts of *Dictamnus albus*, *Arch. Pharm. Res.*, vol. 29, no. 12, Dec. 2006, pp. 1119-1124.

87. S.J. Lee, H.Y. Chung, K. Lee, S.U. Oh, and I.D. Yoo, Phenolics with inhibitory activity on mouse brain monoamine oxidase (MAO) from whole parts of *Artemisia vulgaris* L. (Mugwort), *Food Sci. Biotechnol.*, vol. 9, no. 3, 2000, pp. 179-182.

88. Y.S. Jo, D.T. Huong, K. Bae, M.K. Lee, and Y.H. Kim, Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*, *Plant. Med.*, vol. 68, no. 1, Jan. 2002, pp. 84-85.

89. P.O. Patil, S.B. Bari, S.D. Firke, P.K. Deshmukh, S.T. Donda, and D.A. Patil, A comprehensive review on synthesis and designing aspects of coumarin derivatives as monoamine oxidase inhibitors for depression and Alzheimer's disease, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 21, no. 9, May 2013, pp. 2434-2450.
90. C. Binda, J. Wang, L. Pisani, C. Caccia, A. Carotti, P. Salvati, D.E. Edmondson, and A. Mattevi, Structures of human monoamine oxidase B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs, *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 23, Nov. 2007, pp. 5848-5852.
91. D. Viña, M.J. Matos, G. Ferino, E. Cadoni, R. Laguna, F. Borges, E. Uriarte, and L. Santana, 8-Substituted 3-aryl coumarins as potent and selective MAO-B inhibitors: synthesis, pharmacological evaluation, and docking studies, *ChemMedChem.*, vol. 7, no. 3, Mar. 2012, pp. 464-470.
92. A. Bergmann, Method for the identification of patients in need of therapy having minor cognitive disorders and the treatment of such patients, US 00393432011
93. G. Agelis, A. Resvani, C. Koukoulitsa, T. Tůmová, J. Slaninová, D. Kalavrizioti, K. Spyridaki, A. Afantitis, G. Melagraki, A. Siafaka, E. Gkini, G. Megariotis, S.G. Grdadolnik, M.G. Papadopoulos, D. Vlahakos, M. Maragoudakis, G. Liapakis, T. Mavromoustakos, and J. Matsoukas, Rational design, efficient syntheses and biological evaluation of N,N'-symmetrically bis-substituted butylimidazole analogs as a new class of potent Angiotensin II receptor blockers, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 62, Apr. 2013, pp. 352-370.
94. T. Mavromoustakos, A. Kolocouris, M. Zervou, P. Roumelioti, J. Matsoukas, and R. Weisemann, An effort to understand the molecular basis of hypertension through the study of conformational analysis of losartan and sarmesin using a combination of nuclear magnetic resonance spectroscopy and theoretical calculations, *J. Med. Chem.*, vol. 42, no. 10, May 1999, pp. 1714-1722.
95. C. Potamitis, M. Zervou, V. Katsiaras, P. Zoumpoulakis, S. Durdagi, M. Papadopoulos, J. Hayes, S. Grdadolnik, I. Kyrikou, D. Argyropoulos, G. Vatougia, and T. Mavromoustakos, Antihypertensive drug valsartan in solution and at the AT1 receptor: Conformational analysis, dynamic NMR spectroscopy, in silico docking, and molecular dynamics simulations, *J. Chem. Inf. Mod.*, vol. 49, no. 3, Mar. 2009, pp. 726-739.
96. P. Zoumpoulakis, S.G. Grdadolnik, J. Matsoukas, and T. Mavromoustakos, Structure elucidation and conformational properties of eprosartan a non peptide Angiotensin II AT1 antagonist, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, vol. 28, no. 1, Apr. 2002, pp. 125-135.
97. P. Zoumpoulakis, A. Politi, S.G. Grdadolnik, J. Matsoukas, and T. Mavromoustakos, Structure elucidation and conformational study of V8: A novel synthetic non peptide AT1 antagonist, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, vol. 40, no. 5, Mar. 2006, pp. 1097-1104.

98. G. Agelis, P. Roumelioti, A. Resvani, S. Durdagi, M. Androutsou, E.K. Kelaidonis, T. Mavromoustakos, and J. Matsoukas, An efficient synthesis of a rationally designed 1,5 disubstituted imidazole AT1 Angiotensin II receptor antagonist: Reorientation of imidazole pharmacophore groups in losartan reserves high receptor affinity and confirms docking studies, *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, vol. 24, no. 9, Sep. 2010, pp. 749-758.
99. D. Ntountaniotis, G. Mali, G.S. Grdadolnik, M. Halabalaki, A.L. Skaltsounis, C. Potamitis, E. Siapi, P. Chatzigeorgiou, M. Rappolt, and T. Mavromoustakos, Thermal, dynamic and structural properties of drug AT 1 antagonist olmesartan in lipid bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* vol. 1808, no. 12, Dec. 2011, pp. 2995-3006.
100. A. Hodzic, P. Zoumpoulakis, G. Pabst, T. Mavromoustakos, and M. Rappolt, Losartan's affinity to fluid bilayers modulates lipid-cholesterol interactions, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 14, no. 14, Apr. 2012, pp. 4780-4788.
101. C. Potamitis, P. Chatzigeorgiou, E. Siapi, T. Mavromoustakos, A. Hodzic, F. Cacho-Nerin, P. Laggner, and M. Rappolt, Interactions of the AT1 antagonist valsartan with dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1808, no. 6, Feb. 2011, pp. 1753-1763.
102. I.V. Tetko, and P. Bruneau, Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house database, *J. Pharm. Sci.*, vol. 582, no. 12, Dec. 2004, pp. 3103-3110.
103. Δ. Ντουντανιώτης, Διδακτορική Διατριβή. Διαμορφωτική μελέτη αντιυπερτασικών φαρμάκων και αλληλεπιδράσεις τους με λιποειδείς διπλοστιβάδες με χρήση φυσικοχημικών μεθόδων, Πάτρα, 2012.
104. G. Agelis, A. Resvani, D. Ntountaniotis, P. Chatzigeorgiou, C. Koukoulitsa, M.E. Androutsou, P. Plotas, J. Matsoukas, T. Mavromoustakos, T. Čendak, T. Ukmar Godec, and G. Mali, Interactions of the potent synthetic AT1 antagonist analog BV6 with membrane bilayers and mesoporous silicate matrices, *BBA*, vol. 1828, no. 8, Aug. 2013, pp. 1846-1855.
105. Π. Χατζηγεωργίου, Φυσικοχημική μελέτη αλληλεπιδράσεων βιοδραστικών μορίων σε λιπιδικές μεμβράνες, Αθήνα, 2012.
106. *Sybyl, Version 8.0*, TRIPOS Associates Inc.: St. Louis, MO, 2008.
107. J.G. Vinter, A. Davis, and M.R. Saunders, Strategic approaches to drug design. I. An integrated software framework for molecular modelling *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 1, no. 1, Apr. 1987, pp. 31-51.
108. R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, and D.T. Mainz, Extra precision Glide: docking and scoring Incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes, *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 21, Oct. 2006, pp. 6177-6196.
109. *Glide, Small-Molecule Drug Discovery Suite*: Schrödinger, LLC: New York, NY., 2012.

110. M.H.M. Olsson, C.R. Søndergard, M. Rostkowski, and J.H. Jensen, PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions, *J. Chem. Theory. Comput.*, vol. 7, no. 2, Jan. 2011, pp. 525-537.
111. F. Milletti, L. Storchi, G. Sforna, G. Cruciani, New and original pKa prediction method using Grid Molecular Interaction Fields, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 47 no. 6, Nov.-Dec. 2007, pp. 2172-2181.
112. V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, and C. Simmerling, Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters, *Proteins*, vol. 65, no. 3, Nov. 2006, pp. 712-725.
113. J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, and D.A. Case, Development and testing of a general Amber forcefield, *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 1, Aug. 2004, pp. 1157-1174.
114. W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, and M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulationg liquid water, *J. Chem. Phys.*, vol. 79, no. 2, Jul. 1983, pp. 926-935.
115. T. Darden, D. York, and L. Pedersen, Particle mesh Ewald: an $N \cdot \text{Log}(N)$ method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.*, vol. 98, Apr. 1993, pp. 10089-10092.
116. J.A. Izaguirre, D.P. Catarello, J.M. Wozniak, and R.D. Skeel, Langevin stabilization of molecular dynamics, *J. Chem. Phys.*, vol. 114, no. 5, 2001, pp. 2090-2098.
117. J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, and H.J.C. Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes *J. Comput. Phys.*, vol. 23, no. 3, Mar. 1977, pp. 327-341.
118. F. Fogolari, A. Brigo, and H. Molinari, Protocol for MM/PBSA molecular dynamics simulations of proteins, *Biophys. J.*, vol. 85, no. 1, Jul. 2003, pp. 159-166.
119. P.A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D.A. Case, and T.E. Cheatham, 3rd., Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models, *Acc. Chem. Res.*, vol. 33, no. 12, Dec. 2000, pp. 889-897.
120. X. Alexi, K.M. Kasiotis, N. Fokialakis, G. Lambrinidis, A.K. Meligova, E. Mikros, S.A. Haroutounian, and M.N. Alexis, Differential estrogen receptor subtype modulators: assessment of estrogen receptor subtype-binding selectivity and transcription-regulating properties of new cycloalkyl pyrazoles, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 117, no. 4-5, Nov. 2009, pp. 159-167.
121. B. Honig, and A. Nicholls, Classical electrostatics in biology and chemistry, *Science*, vol. 268, no. 5214, May 1995, pp. 1144-1149.

122. M.F. Sanner, A.J. Olson, and J.C. Spohner, Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces, *Biopolymers.*, vol. 38, no. 3, Mar. 1996, pp. 305-320.
123. I. Stoica, S.K. Sadiq, and P.V. Coveney, Rapid and accurate prediction of binding free energies for saquinavir-bound HIV-1 proteases, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 8, Feb. 2008, pp. 2639-2648.
124. J. Weiser, P.S. Shenkin, and W.C. Still, Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO), *J. Comput. Chem.*, vol. 20, no. 2, Jan. 1999, pp. 217-230.
125. W. Wang, O. Donini, C.M. Reyes, and P.A. Kollman, 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.*, vol. 30, Jun. 2001, pp. 211-243.
126. T. Tuccinardi, V. Calderone, S. Rapposelli, and A. Martinelli, Proposal of a new binding orientation for non-peptide AT1 antagonists: homology modeling, docking and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis, *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 14, Jul. 2006, pp. 4305-4316.
127. R. Farid, T. Day, R.A. Friesner, and R.A. Pearlstein, New insights about HERG blockade obtained from protein modeling, potential energy mapping, and docking studies, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 14, no. 9, May 2006, pp. 3160-3173.
128. W. Sherman, T. Day, M.P. Jacobson, R.A. Friesner, and R. Farid, Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects, *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 2, Jan. 2006, pp. 534-553.
129. A. Onufriev, D. Bashford, and D.A. Case, Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model, *Proteins*, vol. 55, no. 2, May 2004, pp. 383-394.