



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Φαρμακευτικής

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών Τμήματος Φαρμακευτικής

Ειδίκευση «Συνθετική Φαρμακευτική Χημεία»

Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης

Αλχημικοί υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης και μετρήσεις
συγγένειας σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών με τον
διαμεμβρανικό πόρο της πρωτεΐνης influenza A/M2.

Εφαρμογή στον *in silico* σχεδιασμό και τη σύνθεση δραστικών
αμινοαδαμαντανικών παραγώγων

Αντώνιος Δρακόπουλος

Φαρμακοποιός

Αθήνα 2015

A.M.: 120405

Επιβλέπων:

Αντώνιος Κολοκούρης
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Αντώνιος Κολοκούρης,
Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Εμμανουήλ Μικρός,
Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ανδρέας Τσοτίνης,
Καθηγητής Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ημερομηνία εξέτασης: Πέμπτη 4 Ιουνίου 2015

Abstract

Adamantane derivatives, such as amantadine and rimantadine, have been reported to block the M2 membrane protein of influenza A virus (A/M2TM), but their use has been discontinued due to reported resistance in humans. Understanding the mechanism of action of amantadine derivatives could assist in the development of novel potent inhibitors that overcome A/M2TM resistance.

In this dissertation we validate that free energy calculations using the FEP scheme and the Bennett acceptance ratio method is valuable for determining the relative binding potency of M2 inhibitors of the aminoadamantane type, in accordance to previous studies. Furthermore, we prove that using DMPC to mimic membrane environment yields a computational model with a better correlation between theoretical and experimental values, compared to DPPC -tested in a previous reference study.

The further integration and optimization of the computational model ($R^2 = 0.66$, $PI = 0.97$), encouraged its use for computer aided drug design. We applied FEP/MD calculations to design and synthesize three bulkier rimantadine analogues. Their binding affinities were measured using ITC against the M2TM tetramer at its closed form at pH 8, while their potency was studied with antiviral assays. One of the compounds proved to be a nanomolar inhibitor stronger than rimantadine against S31 WSN/33 *influenza A*, a sensitive strain against the pore blocking effect of adamantanamines, and also a micromolar inhibitor against the mutated viral strain A/PR/8/34.

The computational model retains its reliability after the calculations of the new compounds ($R^2 = 0.61$, $PI = 0.83$). We also proceeded in an evaluation and commentary of the thermodynamic profile of all the aminoadamantane ligands included in the model according to their experimental values, which were derived from ITC measurements.

In addition, in the present dissertation an adamantane compound was studied using low-temperature Dynamic NMR Spectroscopy. Also, one-flask approaches were applied for the synthesis of α,α,α -trisubstituted primary amines using as a substrate a tertiary nitrile (1-adamantanecarbonitrile), mediated through Ti complexes; a case which –to our knowledge- has not been studied in literature so far.

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Σύνθεσης Φαρμάκων και Υπολογιστικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια του πανεπιστημιακού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Συνθετική Φαρμακευτική Χημεία» .

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Αντώνιο Κολοκούρη για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, την επιστημονική υποστήριξή του και τη μέριμνά του να καταρτιστώ περαιτέρω σε θέματα μοριακών προσομοιώσεων μέσα από την υποτροφία ΙΚΥΔΑ 2013.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους Καθηγητές Εμμανουήλ Μικρό και Ανδρέα Τσοτίνη για τις πολύτιμες επισημάνσεις τους στο κείμενο της εργασίας. Ακόμη, ευχαριστώ όλα τα μέλη ΔΕΠ του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν καθόλη τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Günter Gauglitz, από το Ινστιτούτο Φυσικοχημείας και Θεωρητικής Χημείας του Πανεπιστημίου του Tübingen στη Γερμανία, ιδιαιτέρως τους Δρ. Felix Kolarov, Δρ. Alexander Le Blanc και την υποψήφια Δρ. Kathrin Freudenberger, για τις μετρήσεις Ισοθερμικής Θερμοδομετρίας Τιτλοδότησης. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τις ερευνητικές ομάδες των Καθηγητών David Busath και Brent Johnson από το πανεπιστήμιο Brigham Young University (BYU) της Utah, ΗΠΑ, καθώς επίσης και την ερευνητική ομάδα της Δρος Michaela Schmidtke από την Πανεπιστημιακή Κλινική της Ιένας στη Γερμανία, ιδιαιτέρως την υποψήφια Δρ. Anja Hoffmann, για τον αντικό έλεγχο των ενώσεων. Επίσης ευχαριστώ την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Andrea Mazzanti από το Πανεπιστήμιο της Μπολόνια στην Ιταλία, για τη συνεργασία του στη μελέτη Δυναμικής Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χαμηλών θερμοκρασιών. Τέλος ευχαριστώ την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Holger Gohlke από το Πανεπιστήμιο του Düsseldorf στη Γερμανία για τη φιλοξενία της, στα πλαίσια της υποτροφίας ΙΚΥΔΑ 2013.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς τους συναδέλφους της ερευνητικής μου ομάδας, την υποψήφια Δρ. Χριστίνα Τζιτζογλάκη, και τον υποψήφιο Δρ. Χαράλαμπο Ιωαννίδη για όλη τους τη βοήθεια και την εκπαίδευση (σε συνθετική και υπολογιστική χημεία αντίστοιχα). Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους συναδέλφους και φίλους από το Τμήμα Φαρμακευτικής, που μου προσέφεραν απλόχερα τη βοήθειά τους όποτε την είχα ανάγκη.

Περιεχόμενα

1	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ INFLUENZA ..	6
1.1	Γενικά χαρακτηριστικά του ιού influenza	6
1.2	Ταξινόμηση του ιού influenza	7
1.3	Εμφάνιση μεταλλάξεων και ανθεκτικότητας.....	9
1.4	Η πρωτεΐνη M2.....	10
1.5	Δομή του συμπλόκου Am-M2T.....	13
1.5.1	Μελέτες από την ερευνητική ομάδα του Cross.....	13
1.5.2	Το μοντέλο της ερευνητικής ομάδας του Chou - Φασματοσκοπία NMR σε διάλυμα μικυλλίων 14	
1.5.3	Μελέτη της ερευνητικής ομάδας του DeGrado - Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.....	17
1.5.4	Μελέτη της ερευνητικής ομάδας της Mei Hong - Φασματοσκοπία ssNMR.....	19
1.6	Μηχανισμός αγωγιμότητας πρωτονίων.....	21
1.6.1	Ο ρόλος των πολικών αμινοξέων στην αγωγιμότητα πρωτονίων από το διάλυο A/M2TM	21
1.6.2	Ο ρόλος των μη πολικών αμινοξέων στην αγωγιμότητα πρωτονίων από το διάλυο A/M2TM 22	
1.6.3	Μηχανισμός της αγωγιμότητας των πρωτονίων: Ο Ρόλος της H37, W41	23
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ	25
3.1	Γενικά.....	25
3.2	Βασικές θερμοδυναμικές εξισώσεις και περιγραφή φαινομένων σύνδεσης	26
3.3	Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης – Περιγραφή της μεθόδου.....	28
3.4	Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης – Μαθηματική θεμελίωση.....	29
3.5	Προσδιορισμός ποσοτήτων με την τεχνική ITC.....	31
3.6	Εφαρμογή της θερμοδυναμικής στο σχεδιασμό φαρμακομορίων	34
4	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ	38
4.1	Γενικά.....	38
4.2	Μοριακή μηχανική - Πεδίο δυνάμεων.....	38
4.2.1	Γενικά.....	38
4.2.2	Πεδίο δυνάμεων.....	39
4.3	Ελαχιστοποίηση Ενέργειας ή Βελτιστοποίηση Γεωμετρίας.....	42
4.4	Βασικά χαρακτηριστικά προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής.....	43
4.4.1	Χώρος φάσης και τροχιά - Μέσες τιμές	43

4.4.2	Υπολογισμός της τροχιάς	45
4.4.3	Υπολογισμός απλών θερμοδυναμικών ιδιοτήτων	47
4.4.4	Προετοιμασία και εκτέλεση προσομοίωσης μοριακής δυναμικής	48
4.5	Ρυθμίσεις κατά την προσομοίωση χημικών φαινομένων	51
4.5.1	Συνοριακές Συνθήκες και Αποστάσεις Αποκοπής	51
4.6	Σύγκλιση προσομοίωσης με βάση τον υπολογισμό της τιμής RMSD	58
5	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ-ΥΠΟΔΟΧΕΑ.....	61
5.1	Γενικά.....	61
5.2	Μέθοδος Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας	61
5.3	Αλχημικός Μετασχηματισμός	64
5.3.1	Περιγραφή της μεθοδολογίας.....	64
5.3.2	Συνδυαστικό δυναμικό με μεταβλητή σύζευξης λ – Πραγματοποίηση της σταδιοποίησης Υπολογισμού Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας	66
5.4	Διατάραξη Ελεύθερης Ενέργειας με χρήση Θερμοδυναμικού Κύκλου	68
5.5	Περιορισμοί, τεχνικά χαρακτηριστικά και αστοχίες των Υπολογισμών Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας.....	70
5.6	Εμπειρικές προσεγγίσεις υπολογισμού ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης - Υπολογισμοί ελλιμενισμού	73
5.6.1	Γενικά.....	73
5.6.2	Βασικές αρχές μοριακού ελλιμενισμού	74
5.6.3	Αλγόριθμοι μοριακού ελλιμενισμού	75
5.6.4	Συναρτήσεις βαθμολογίας	78
6	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ	84
6.1	Γενικά.....	84
6.2	Θερμοδυναμικές και κινητικές παράμετροι	86
6.3	Χημική ανταλλαγή	88
6.4	Κλίμακα χρόνου NMR και αλλαγές σχήματος φασματικών κορυφών	89
6.4.1	Γενικά.....	89
6.4.2	Περιοχή βραδείας ανταλλαγής	89
6.4.3	Περιοχή ενδιάμεσης ανταλλαγής.....	91
6.4.4	Περιοχή ταχείας ανταλλαγής	92
6.4.5	Μορφή φασματικών γραμμών και παρακολούθηση της ανταλλαγής.....	93
6.5	Ασύμμετρη ανταλλαγή.....	93

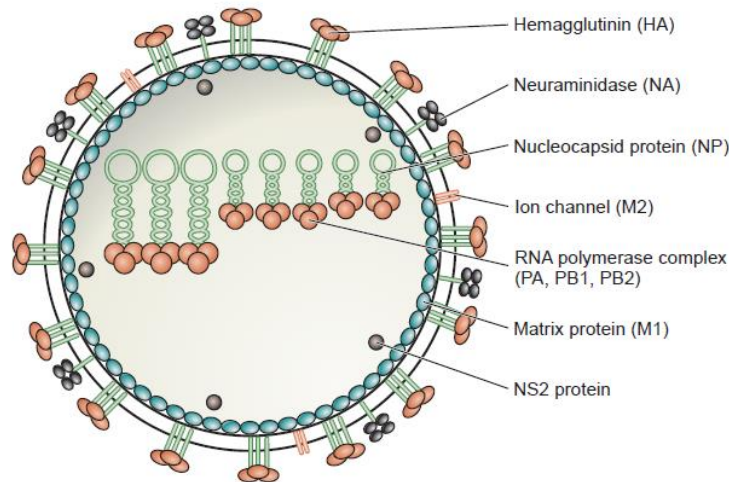
6.6	Παρακολούθηση διαμορφωτικών αλλαγών με φασματοσκοπία DNMR	94
6.6.1	Γενικά.....	94
6.6.2	Περιστροφή γύρω από απλούς δεσμούς.....	94
6.6.3	Διαμορφωτικές μελέτες αδαμαντανικών παραγώγων με DNMR.....	94
7	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ: ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A – ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	98
7.1	Υπολογισμοί μοριακού ελλιμενισμού	98
7.1.1	Γενικά.....	98
7.1.2	Η σημασία των μορίων νερού στους υπολογισμούς μοριακού ελλιμενισμού	98
7.1.3	Προετοιμασία πρωτεϊνών	99
7.1.4	Προετοιμασία και εκτέλεση υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού	100
7.1.5	Παρουσίαση αποτελεσμάτων υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού	100
7.2	Υπολογισμοί FEP/MD για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς που αφορούν τα σύμπλοκα προσδέτη – πρωτεΐνης και τους προσδέτες σε διάλυμα	101
7.2.1	Γενικά.....	101
7.2.2	Προετοιμασία πρωτεϊνών	103
7.2.3	Υπολογισμοί FEP/MD	103
7.2.4	Πρωτόκολλο για τις προσομοιώσεις FEP/MD σε σύμπλοκο και σε διάλυμα.....	104
7.2.5	Αλχημικοί μετασχηματισμοί πολλαπλών βημάτων (Multistage FEP).....	105
7.3	Παρουσίαση αποτελεσμάτων επικύρωσης και βελτιστοποίησης του υπολογιστικού μοντέλου..	106
7.3.1	Γενικά.....	106
7.3.2	Αξιολόγηση των υπολογισμών FEP/MD - Συσχέτιση με τις σταθερές διάστασης των συμπλόκων M2TM-προσδέτη που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ITC	106
7.4	Σχεδιασμός νέων αμινοαδαμαντανικών ενώσεων	110
8	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΟΓΔΟΟ: ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΝΕΩΝ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	114
8.1	Δομές των νέων ενώσεων	114
8.2	Σύνθεση των νέων ενώσεων	114
8.2.1	Σύνθεση των νέων αμινοαδαμαντανίων μέσω αναγωγής <i>tert</i> -αλκυλαζιδίων	114
8.2.2	Σύνθεση των νέων αμινοαδαμαντανίων μέσω τροποποιημένης αντίδρασης Ritter και μέσω προσθήκης σε σουλφινίμη	120
8.2.3	Σύνθεση των νέων αμινοαδαμαντανίων μέσω αντίδρασης οργανομεταλλικού αντιδραστήριου και νιτριλίου παρουσία τετραϊσοπροπύλοξυτιτανίου.....	122
8.2.4	Σύνθεση άλλων ενώσεων.....	128
9	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΑΤΟ: ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΩΝ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΜΕ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ.....	130

9.1	Γενικά.....	130
9.2	Μελέτη της 3-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1. ^{3,7}]δεκυλ)-3-πεντανόλης 23 με Δυναμική Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	130
9.2.1	Περιγραφή και σχολιασμός του φάσματος ¹³ C DNMR	130
9.2.2	Υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας περιστροφής	132
10	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΚΑΤΟ: ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ Μ2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM) ΜΕ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ.....	134
10.1	Γενικά.....	134
10.2	Περιγραφή του θερμιδόμετρου	134
10.3	Προετοιμασία πειράματος.....	136
10.4	Αποτελέσματα μετρήσεων της σύνδεσης των νέων αμινοαδαμαντανικών προσδετών 15-17 στην A/M2TM σε pH 8 με ITC – Συσχέτιση μεταξύ υπολογιστικών (FEP/MD) και πειραματικών (ITC) τιμών $\Delta\Delta G_{bind}$ 137	
10.5	Αξιολόγηση του θερμοδυναμικού προφίλ των προσδετών 1-17	141
11	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΔΕΚΑΤΟ: ΑΝΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	145
11.1	Γενικά.....	145
11.2	Αποτελέσματα αντικού ελέγχου έναντι του ιού Influenza A - Προσδιορισμός τιμών EC ₅₀ και κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα MDCK των νέων αμινοαδαμαντανικών παραγώγων 15-17	145
12	ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΩΔΕΚΑΤΟ: ΣΥΝΟΨΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	148
13	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	149
14	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	160
14.1	Παράρτημα Α: Μέτρηση σταθερών σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών με το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 του ιού της influenza A (A/M2TM) με Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης.....	160
14.2	Παράρτημα Β: Υπολογισμοί Μοριακού Ελλιμενισμού στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 του ιού της influenza A (A/M2TM).....	161
14.3	Παράρτημα Γ: Υπολογισμοί Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας σε συνδυασμό με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (FEP/MD) για το σύμπλοκο αμινοαδαμαντανικού προσδέτη με το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 του ιού influenza A (A/M2TM)	163
14.3.1	Θεωρητική Διαμόρφωση.....	163
14.3.2	Σύγκλιση FEP/MD (FEP/MD Convergence).....	164
14.4	Παράρτημα Δ: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) των νέων αμινοαδαμαντανικών ενώσεων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία και των ενδιάμεσων αυτών ..	169
14.4.1	Φάσματα ¹ H NMR.....	169
14.4.2	Φάσματα ¹³ C NMR.....	177
14.5	Παράρτημα Ε: Φάσματα Δυναμικού Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (DNMR)	185

14.6	Παράρτημα ΣΤ: Φάσματα Μάζας.....	189
15	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	192

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΙΟ INFLUENZA

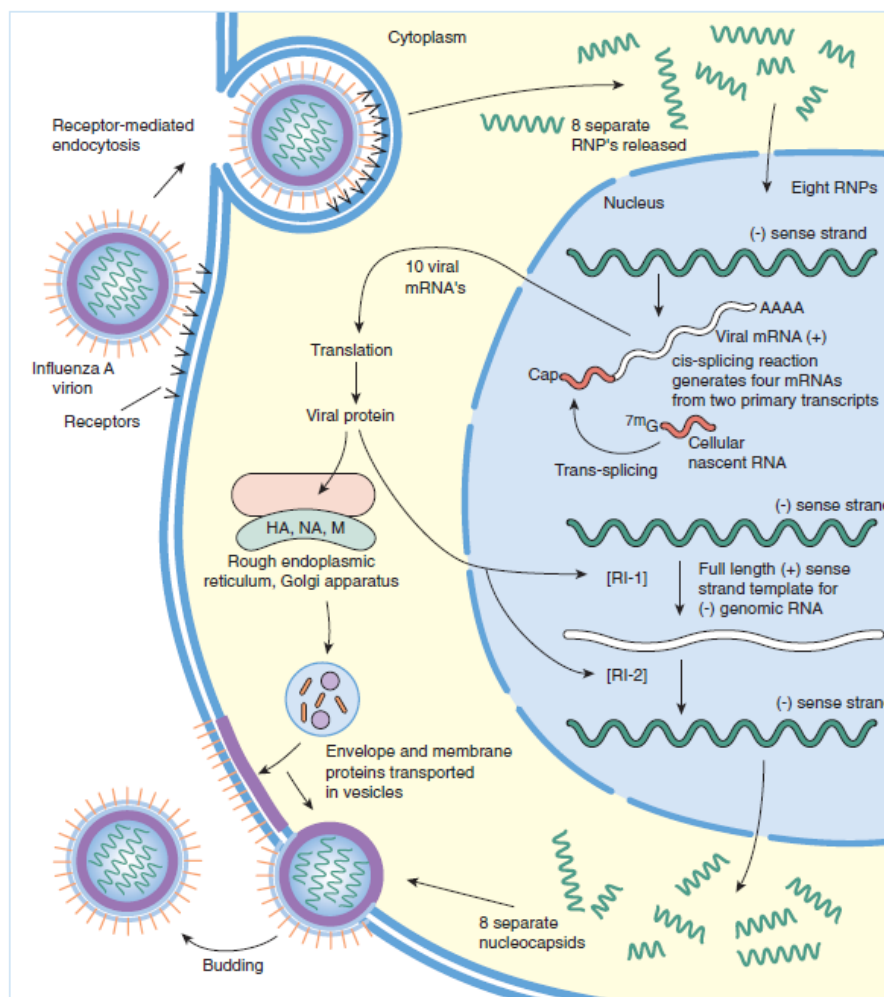
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά του ιού influenza



Σχήμα 1.1¹: Ο ιός influenza A.

Ο ιός *influenza A*, ανήκει στην οικογένεια των ορθομυξοϊών και είναι ιός (-)RNA. Όπως φαίνεται στο σχήμα 1.1, το εξωτερικό του βιρίου αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστιβάδα στην οποία βρίσκονται οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αιματογλουτίνη (HA ή H), νευραμινιδάση (NA ή N), M1 και ο πρωτεϊνικός διάυλος ιόντων M2, συγκεκριμένα H^+ . Στο εσωτερικό του βιρίου βρίσκεται το νουκλεοκαψίδιο το οποίο αποτελείται από το RNA του ιού που είναι συνδεδεμένο με τη νουκλεοπρωτεΐνη (NP), βρίσκεται δηλαδή ως σύμπλοκο RNP (σχ. 1.1). Η νουκλεοπρωτεΐνη NP συνδέεται με τρεις μικρές πρωτεΐνες τις PB1, PB2 και PA, ενώ στο εσωτερικό του βιρίου βρίσκεται σε μικρή ποσότητα και η πρωτεΐνη NS2. Οι πρωτεΐνες HA και NA είναι τα επιφανειακά αντιγόνα του ιού¹⁻³. Κατά τη μόλυνση, μόλις το βίριο του ιού *influenza A* ενωθεί με το σιαλικό οξύ, που βρίσκεται στην επιφάνεια των υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων της αναπνευστικής οδού του ξενιστή, το σύμπλεγμα ιού-υποδοχέα εισέρχεται στο εσωτερικό των κυττάρων με ενδοκύτωση (σχ. 1.2). Καθώς τα ενδοσωματικά κυστίδια, που περιέχουν τα ιικά σωματίδια, μετακινούνται προς τον πυρήνα, το pH τους μειώνεται. Όταν το pH του ενδοσώματος φτάσει το 5.0 (α) η HA υπόκειται σε μια διαμορφωτική αναδιάταξη που έχει ως αποτέλεσμα τη σύντηξη της ιικής μεμβράνης με την κυτταροπλασματική και (β) το άνοιγμα του διαύλου H^+ της M2, το οποίο συνεπάγεται την εισροή πρωτονίων στο εσωτερικό του ιού⁴. Η οξίνιση καθιστά ασθενέστερη την ηλεκτροστατική σύνδεση μεταξύ της πρωτεΐνης M1 και του συμπλόκου RNP με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται οι

πρωτεΐνες RNP στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Στο κυτταρόπλασμα οι πρωτεΐνες RNP μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή όπου συντίθενται τα mRNA και vRNA⁵ και ο πολλαπλασιασμός του ιού μέσω με τη βοήθεια των σχετικών ενζύμων και πολυμερασών του κυττάρου (σχ. 1.2).



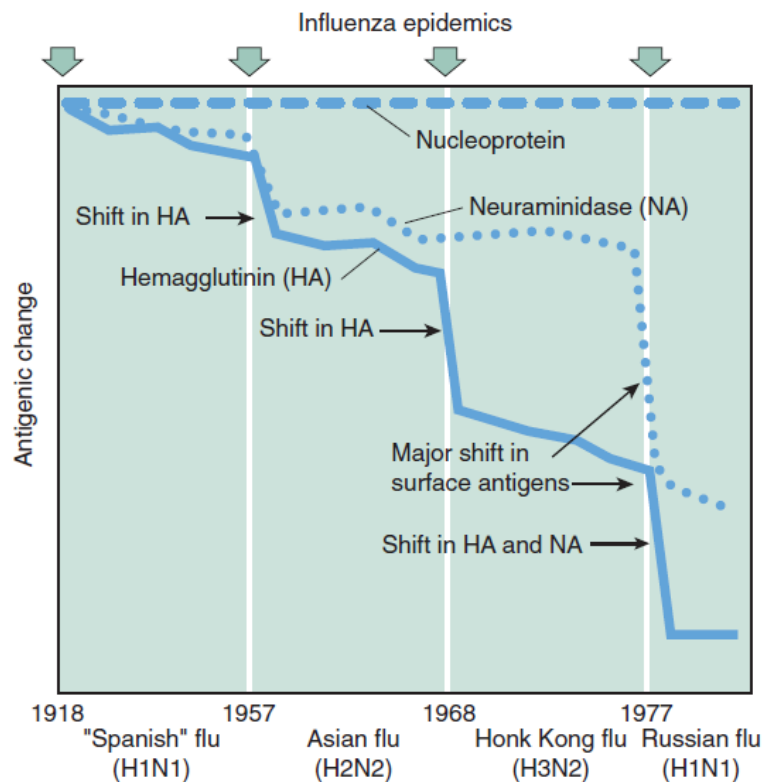
Σχήμα 1.2⁶: Αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του ιού influenza A.

1.2 Ταξινόμηση του ιού influenza

Ο ιός influenza ή ιός της γρίπης διακρίνεται σε τρεις τύπους, τους ιούς influenza A, B και C. Ο τύπος A προσβάλλει πολλά είδη θηλαστικών, όπως άλογα, χοίρους, πτηνά (πάπιες, κοτόπουλα) και ανθρώπους. Ο τύπος A είναι υπεύθυνος για τις επιδημίες και πανδημίες γρίπης. Ο τύπος B προσβάλλει αποκλειστικά τον άνθρωπο και προκαλεί ασθένεια, χωρίς όμως τις σοβαρές επιπλοκές του τύπου A. Ο τύπος C μολύνει τον άνθρωπο και το χοίρο, χωρίς όμως να προκαλεί ασθένεια.

Επομένως, από τους παραπάνω τύπους του ιού influenza, ο τύπος Α είναι αυτός που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον^{1,6}.

Χαρακτηριστικό του ιού influenza Α είναι η ικανότητα να μεταλλάσσεται, κυρίως ως προς τις πρωτεΐνες HA και NA. Ως αποτέλεσμα μεγάλων μεταλλάξεων (αντιγονικών μεταβολών) είναι η ύπαρξη διαφορετικών υποτύπων ιών με μεγάλες αλλαγές στην αλληλουχία της αιματογλουτινίνης (σχ. 1.3). Παραδείγματος χάριν, στους ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο βρίσκονται οι μορφές αιματογλουτινίνης H1, H2, H3 και νευραμινιδάσης N1 και N2, ενώ στους ιούς που προσβάλλουν ζώα βρίσκονται και άλλες μορφές H και N. Ο κάθε υπότυπος χαρακτηρίζεται από τις συγκεκριμένες μορφές των παραπάνω πρωτεϊνών, για παράδειγμα οι υποτύποι H1N1, H2N2 και H3N2 που προσβάλλουν τον άνθρωπο, ο υποτύπος H7N7 που προσβάλλει τα κοτόπουλα κλπ. Για κάθε υποτύπο υπάρχουν παραπάνω από ένα στελέχη, εξαιτίας των μικρών σημειακών μεταλλάξεων (αντιγονικών μετατοπίσεων) που υφίστανται οι πρωτεΐνες αιματογλουτινίνη και νευραμινιδάση. Η αντιγονική μετατόπιση αντιστοιχεί σε μικρές αλλαγές (σημειακές μεταλλάξεις) των επιφανειακών αντιγόνων H και N και έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός νέου στελέχους που προκαλεί επιδημία. Κάθε νέο στέλεχος χαρακτηρίζεται από τον τόπο και τον χρόνο απομόνωσης⁷ (σχ. 1.3).



Σχήμα 1.3⁶: Στελέχη του ιού που προκάλεσαν πανδημίες, και η αντιγονική μετατόπιση στην αιματογλουτινίνη και τη νευραμινιδάση.

Η γρίπη που προκαλείται από τον ιό *influenza A* είναι ένα λοιμώδες νόσημα που εκδηλώνεται με εποχιακές επιδημίες, κατά προτίμηση το χειμώνα (κοινή γρίπη) και με τους διάφορους υποτύπους (subtypes) του (H3N2, H1N1, κ.λπ.) προκαλεί σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα στους ανθρώπους δημιουργώντας, για το άμεσο μέλλον, μια αναπόφευκτη απειλή νέων πανδημιών στις οποίες οι μεταβολές στις πρωτεΐνες HA, NA είναι μεγάλες^{8,9}.

1.3 Εμφάνιση μεταλλάξεων και ανθεκτικότητας

Ο ιός *influenza A* προκάλεσε πανδημία λόγω ανεπαρκών επιλογών θεραπείας το 1918, 1957, 1968 και πιο πρόσφατα το 2009. Ανεπάρκεια θεραπείας προκαλείται λόγω της ανθεκτικότητας του ιού σε εμβόλια και σε αντικαταστάσιμα φάρμακα αλλά και σε εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η ανθεκτικότητα μπορεί να οφείλεται στην ανάπτυξη μεταλλάξεων σε μόρια ή πρωτεΐνες που επιτρέπουν την είσοδο του ιού (π.χ. τα επιφανειακά αντιγόνα του ιού δηλαδή οι πρωτεΐνες H, N) και την μόλυνση του κυττάρου ξενιστή. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν μεγάλες μεταλλάξεις γονιδίων (αντιγονικές μεταβολές) και πανδημίες κάθε περίπου 20 με 30 χρόνια (σχ. 1.3) αυξάνοντας την ανάγκη για αποτελεσματικά φάρμακα τουλάχιστον έναντι των ήδη υπαρχόντων μεταλλαγμένων επιδημικών ιών. Τα φάρμακα αυτά πιθανώς να είναι δραστικά και έναντι μελλοντικών που προέρχονται από μεγάλες μεταλλάξεις στα παλιότερα στελέχη^{10,11}.

Λόγω μεγάλων μεταλλάξεων στα διάφορα στελέχη του ιού *influenza* οι εποχικές επιδημίες έχουν εξελιχθεί σε πανδημίες προκαλώντας υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας. Όπως αναφέρθηκε, αυτό συμβαίνει επειδή η αιματογλουτινίνη του νέου στελέχους διαφέρει ουσιωδώς από την αιματογλουτινίνη των εποχικών ιών *influenza A* με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού να στερείται ανοσολογικής προστασίας¹². Σύμφωνα με το CDC (Center for Disease Control and Prevention) στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, η γρίπη και οι επιπλοκές της εξακολουθούν να αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για την υγεία, να προκαλούν φθορές στην οικονομία (λόγω των νοσούντων και απόντων από την εργασία τους), αλλά και την κύρια αιτία θανάτου έναντι οποιασδήποτε μολυσματικής ασθένειας.

Ένας από τους κύριους στόχους αντικαταστάσιμων φαρμάκων για την αντιμετώπιση λοιμώξεων από τον ιό *influenza A* είναι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη M2. Είναι ένας διάυλος ιόντων H⁺ που περιλαμβάνει ένα ομοτετραμερές διαμεμβρανικό συγκρότημα από α-έλικες που σχηματίζουν έναν ιοντικό πόρο^{13,14}. Φάρμακα όπως η αμανταδίνη (Am) και η ριμανταδίνη (Rim) (σχ. 1.4) είχαν ευρεία εφαρμογή μέχρι και την προηγούμενη δεκαετία με μηχανισμό δράσης τον φραγμό του πόρου πλησίον των αμινοξέων S31, V27, Ala30, G34¹⁵. Όμως, με το ξέσπασμα (outbreak) της νόσου της

γρίπης των πτηνών το 2005 (H5N1), μέχρι το 2006 πάνω από το 92% των στελεχών στις ΗΠΑ εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην αμανταδίνη και ριμανταδίνη¹⁶. Ακολούθησε η γρίπη των χοίρων το 2009 (H1N1) με ανθεκτικότητα επίσης στην αμανταδίνη¹⁷. Είναι γνωστό ότι και το στέλεχος H3N2 της ανθρώπινης γρίπης εμφάνισε ανθεκτικότητα και διαδόθηκε ταχύτατα από το 2005 και μέχρι σήμερα ξεπερνάει το 90% στις ΗΠΑ και τις Ασιατικές χώρες¹⁸. Τρεις πιο σημαντικές μεταλλάξεις αμινοξέων έχουν παρατηρηθεί ότι εμφανίζονται στον πόρο της πρωτεΐνης M2 και προκαλούν την ανθεκτικότητα στην αμανταδίνη. Εμφανίζονται είτε καθεμία ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους. Οι πιο σημαντικές μεταλλάξεις είναι οι V27A, L26F, S31N και όλες επηρεάζουν την πρόσδεση της αμανταδίνης και ριμανταδίνης στον πόρο, με την S31N να είναι η πλέον διαδεδομένη προκαλώντας ανθεκτικότητα σε αυτά τα φάρμακα σε ποσοστό 90% των υποτύπων του ιού *influenza A* μέχρι το 2011¹⁹ (τα αμινοξέα S31 και V27 κατευθύνονται προς το κέντρο του πόρου του ιοντικού διαύλου M2TM ενώ το αμινοξύ L26 έχει πλευρική αλυσίδα βρίσκεται στον χώρο μεταξύ δύο α-ελίκων). Η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του ιού στα φάρμακα αμανταδίνη και ριμανταδίνη, δημιούργησε νέα επιτακτική ανάγκη ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Σήμερα οι διάφοροι υποτύποι έχουν κατά 99% την μετάλλαξη S31N²⁰⁻²², μεταξύ των οποίων ο επιδημικός ιός H3N2²³⁻²⁵ αλλά και ο σοβαρότερος για την υγεία H1N1^{22,26,27} και η αμανταδίνη δεν είναι πλέον εμπορικό φάρμακο. Πρέπει να σημειωθεί ότι η σφοδρότητα και η διάδοση της νόσου της γρίπης που προκαλείται από διαφορετικούς υποτύπους είναι διαφορετική αλλά και διαφορετική μεταξύ στελεχών του ίδιου υποτύπου.

1.4 Η πρωτεΐνη M2

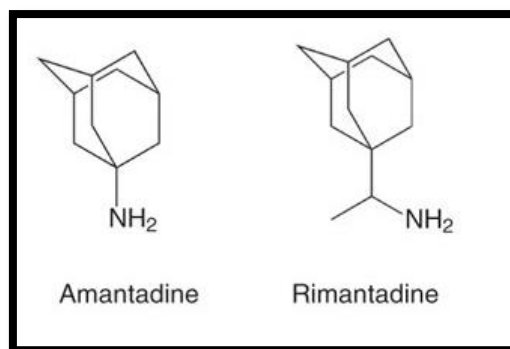
Η πρωτεΐνη M2 είναι μια ομοτετραμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη 97 αμινοξέων που σχηματίζει έναν εκλεκτικό διάυλο πρωτονίων H⁺ με σημαντικό ρόλο στη μολυσματικότητα του ιού. Ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο του ξενιστή με ενδοκύτωση. Αμέσως μετά την οξίνιση του ενδοσώματος λαμβάνουν χώρα δύο διαδικασίες όπως αναφέρθηκε: η συγχώνευση της ιικής μεμβράνης και το άνοιγμα του διαύλου της M2, με συνέπεια την εισροή πρωτονίων στο εσωτερικό ιού σωματιδίου ή βιρίου. Αυτή η οξίνιση του εσωτερικού του βιρίου, μέσω της πρωτεΐνης M2, προκαλεί την απελευθέρωση του γενετικού υλικού του ιού (RNA). Επίσης κατά την έξοδο του ιού από το κύτταρο (μεταφορά από τα ενδοσώματα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη) η πρωτεΐνη M2 μεταφέρει πρωτόνια εκτός του βιρίου διατηρώντας την αιματογλουτινίνη στη φυσική της διαμόρφωση που είναι απαραίτητη για την εκκόλαψη (budding) του ιού σωματιδίου από το κύτταρο. Η κατεύθυνση μεταφοράς H⁺ από την πρωτεΐνη M2 είναι από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο¹³.

Η πρωτεΐνη M2 αποτελείται από την εξωκυττάρια περιοχή 23 αμινοξέων (N-τελικό άκρο), τη διαμεμβρανική περιοχή 25 αμινοξέων (Transmembrane M2, M2TM ή Transmembrane M2 Protein, M2TMP) και την ενδοκυττάρια περιοχή 49 αμινοξέων (C-τελικό άκρο). Η διαμεμβρανική περιοχή, η αλληλουχία αμινοξέων της οποίας είναι SSDPLVVAASIIIGILHLILWILDRL, σχηματίζει έναν ομοτετραμερή πόρο, που δρα ως διάυλος πρωτονίων και κάθε μονομερές έχει δομή αριστερόστροφης α-έλικας. Πειραματικές μελέτες της λειτουργικότητας του διαύλου και υπολογιστικές μελέτες έχουν δείξει ότι σημαντικά για την ενεργοποίηση του διαύλου είναι τα αμινοξέα ιστιδίνη-37 (H37) και τρυπτοφάνη-41 (W41) της διαμεμβρανικής περιοχής²⁸⁻³². Η H37 δρα ως φίλτρο ή ανιχνευτής (sensor) πρωτονίων και η W41 ως πύλη που ανοίγει με την πρωτονίωση της H37 κατά τη μεταφορά H^+ μέσω του πόρου και κλείνει σε ουδέτερο pH οπότε ο πόρος είναι κλειστός.

Η πρωτεΐνη A/M2 ως διάυλος πρωτονίων μπορεί να βρεθεί σε δύο καταστάσεις ανάλογα με το pH. Σε αλκαλικό περιβάλλον ($pH > 7.5$), ο πόρος του ιοντικού διαύλου M2 βρίσκεται στην κλειστή κατάσταση και δεν επιτρέπει τη διέλευση πρωτονίων. Σε όξινο περιβάλλον ($pH < 5$) οι πλευρικές αλυσίδες των H37 του τετραμερούς πρωτονιώνονται και λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης των θετικά φορτισμένων ιμιδαζολίων ο πόρος του ιοντικού διαύλου M2 βρίσκεται σε ανοικτή κατάσταση.

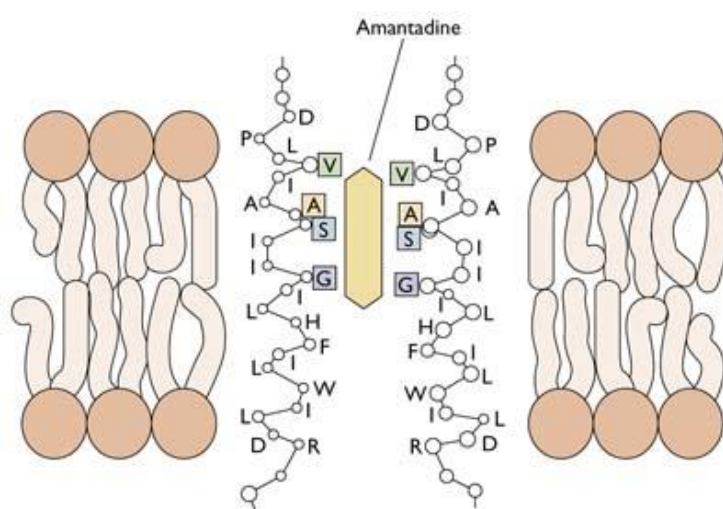
Η κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης M2 παίζει κρίσιμο ρόλο στη συναρμολόγηση του ιού. Με αφαίρεση ή μετάλλαξη της κυτταροπλασματικής περιοχής προκαλείται ελαττωματική συναρμολόγηση και εκκόλαψη του ιού που μπορεί να οφείλεται στη διακοπή αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης A/M2 με την A/M1³³. Αντίστοιχα, με την ολόκληρη την πρωτεΐνη, το διαμεμβρανικό της τμήμα σχηματίζει μια τετραμερή δέσμη που προσδένει την αμανταδίνη^{34,35} και λειτουργεί ως διάυλος πρωτονίων³⁶.

Η έρευνα γύρω από την πρωτεΐνη M2 και τον πρωτεϊνικό διάυλο της TM προήλθε από την προσπάθεια εξήγησης του τρόπου αναστολής της πρωτεΐνης A/M2 από τα αντικά φάρμακα αμανταδίνη και ριμανταδίνη.⁴



Σχήμα 1.4: Τα μόρια αμανταδίνη και ριμανταδίνη είναι τα πρώτα αντικά φάρμακα στα οποία ο ιός της γρίπης τύπου Α έχει εμφανίσει ανθεκτικότητα.

Ήδη από το 1993, με προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής από την ερευνητική ομάδα του Sansom³⁷, προτάθηκε ότι μια πιθανή θέση σύνδεσης της αμανταδίνης βρίσκεται στο εσωτερικό του πόρου του ιοντικού διαύλου στην περιοχή που ορίζουν τα αμινοξέα V27, A30, S31 και G34 (σχ. 1.5). Όμως, παρόλο που μέχρι το 2008 είχαν προταθεί μοντέλα του συμπλόκου M2TM-Am με μεταλλαξογένεση (mutations studies), προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (MD) και έμμεσες φασματοσκοπικές μελέτες ssNMR (μελέτη της μεταβολής των χημικών μετατόπισεων των αμινοξέων κατά τη σύνδεση της αμανταδίνης με πιο σημαντική μεταβολή στη χημική μετατόπιση της Ser31), δεν ήταν διαθέσιμες κρυσταλλογραφικές δομές υψηλής ανάλυσης ή δομές από φασματοσκοπία NMR. Στα επόμενα εδάφια αναλύονται οι δομές του συμπλόκου M2TM-Am ή M2TM-Rim, όπως προέκυψαν πειραματικά.



Σχήμα 1.5³⁸: Σχηματική αναπαράσταση της αμανταδίνης (κίτρινο) ως αποκλειστής του διαύλου της Α/M2TM, με περιοχή σύνδεσης τα αμινοξέα V27, A30, S31 και G34. Στο σχήμα διακρίνεται η λιπιδική μεμβράνη και το διαμεμβρανικό τμήμα (TM) της πρωτεΐνης M2.

1.5 Δομή του συμπλόκου Am-M2T

1.5.1 Μελέτες από την ερευνητική ομάδα του Cross

Η ερευνητική ομάδα του Cross επί σειρά ετών έχει δημοσιεύσει μια σειρά μελετών που αφορούσαν στη μελέτη του πρωτεϊνικού διαύλου της M2TM και του συμπλόκου M2TM - Am εφαρμόζοντας φασματοσκοπία NMR σε στερεά κατάσταση (solid state NMR, ssNMR). Είναι η πρώτη ομάδα που μελέτησε το διάυλο M2TM με ssNMR.

Το 1997, μελέτησε την M2TM του ιού της γρίπης τύπου A σε ενυδατωμένη λιπιδική μεμβράνη DPMC (1,2-διμυριστοϋλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη)³⁹ χρησιμοποιώντας τις χημικές μετατοπίσεις επισημασμένων δειγμάτων με ¹⁵N. Κάθε πεπτίδιο έχει δομή αριστερόστροφης α-έλικας, που σχηματίζει γωνία ως προς το κάθετο επίπεδο της διπλοστιβάδας (*tilt*) ίση με 33±3°. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το πακετάρισμα της τετραμερούς πρωτεΐνης περιγράφεται με μια αριστερόστροφη δέσμη τεσσάρων ελίκων. Μόνο με μια τόσο μεγάλη κλίση τα υδρόφιλα αμινοξέα ευθυγραμμίζονται στον άξονα του διαύλου.

Σε μια άλλη μελέτη το 2007³⁴ βρέθηκε ότι η δομή της M2TM σε αλκαλικό pH χωρίς αμανταδίνη είναι περισσότερο δυναμική και δομικά ετερογενής (ισορροπία πολλών διαμορφώσεων) σε σύγκριση με τη δομή που προσλαμβάνει όταν προσδένεται η αμανταδίνη. Φαίνεται ότι αυτή η δομική πλαστικότητα και δυναμική της M2TM είναι απαραίτητες για το άνοιγμα του διαύλου και για την αγωγιμότητα των H⁺ τόσο για την απομονωμένη δομή της M2TM όσο και για ολόκληρη την πρωτεΐνη M2.

Επίσης, η πρόσδεση της αμανταδίνης ελαττώνει την τιμή της πρώτης pKa της H37 κατά τρεις τάξεις μεγέθους σε σύγκριση με την πρώτη pKa της H37 απουσία της αμανταδίνης στον διάυλο. Έτσι, η επίδραση της αμανταδίνης στις φυσικοχημικές ιδιότητες της H37 συνιστούσε ένα νέο μηχανισμό αποκλεισμού της αγωγιμότητας πρωτονίων διαμέσου του διαύλου M2TM παρουσία της αμανταδίνης. Όχι μόνο μεταβάλλονται δραματικά οι τιμές των pKa παρουσία της αμανταδίνης, αλλά επίσης δεν είναι δυνατός και ο σχηματισμός ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου χαμηλής ενέργειας διότι το ιμιδαζόλιο δεν πρωτονιώνεται εύκολα (χαμηλή pKa). Το τελευταίο σημαίνει ότι ο μηχανισμός με τον οποίο η αμανταδίνη εμποδίζει την αγωγιμότητα πρωτονίων μπορεί να μην οφείλεται στο φραγμό (αποκλεισμό) του πόρου από τον λιπόφιλο σκελετό της αμανταδίνης, αλλά να προκαλείται μέσω ενός μηχανισμού που να εμποδίζει τη συμμετοχή των ιστιδινών στο σχηματισμό δικτύων δεσμών υδρογόνου με τα μόρια νερού μέσω των οποίων είναι δυνατή η μεταφορά πρωτονίων (οξονίων) στον πόρο.

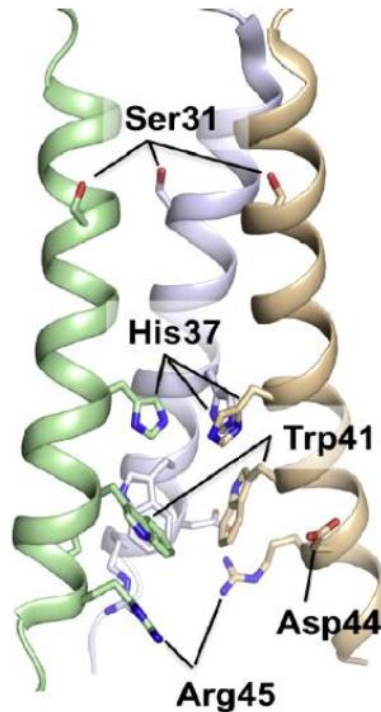
Τέλος, σε μια άλλη μελέτη⁴⁰ παρουσιάστηκε η δομή της M2TM αποκλεισμένη από την αμανταδίνη, χρησιμοποιώντας περιορισμούς προσανατολισμού σε πειράματα ssNMR αναστροφής πόλωσης ανταλλαγής spin της μαγικής γωνίας. Τα δεδομένα έδειξαν μια κάμψη ή γωνίωση (*kink*) της αλυσίδας του μονομερούς πεπτιδίου στη Gly34 ενώ η γωνία μεταξύ του άξονα του τετραμερούς και του κάθετου επιπέδου στη μεμβράνη [πιο συγκεκριμένα του κανονικού διανύσματος (normal) του επιπέδου της διπλοστοιβάδας (άξονας z)] (tilt) βρέθηκε 20 – 31°. Η δομή αυτή χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή ενός συνεπούς με τα πειραματικά δεδομένα μοντέλου του τετραμερούς M2TM-Am. Από τα φάσματα, παρατηρήθηκε, επίσης, η επίδραση της πρόσδεσης της αμανταδίνης.

1.5.2 Το μοντέλο της ερευνητικής ομάδας του Chou - Φασματοσκοπία NMR σε διάλυμα μικυλλίων

Για 2-3 χρόνια υπήρξε μεγάλη φιλονικία για τη θέση σύνδεσης του αμινοαδαμαντανικού προσδέτη (Am ή Rim), δηλαδή αν βρίσκεται εντός ή εκτός του πόρου κατά τη σύνδεση και αναστολή της μεταφοράς πρωτονίων του πόρου M2TM. Η δομή του κλειστού διαύλου πρωτονίων A/M2TM (22-61) προσδιορίστηκε το 2008⁴¹ με NMR σε διάλυμα M2TM και Rim 1:100 σε μικύλλια DHPC (διεπτανουόλοφωσφατιδυλοχολίνη) και σε pH 7.5. Το αλκαλικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα τα ιμιδαζόλια των H37 του τετραμερούς να είναι αφόρτιστα, οπότε το τετραμερές να βρίσκεται σε κλειστή κατάσταση, συμπλεγμένη με ριμανταδίνη. Η αλληλουχία της M2 που μελετήθηκε, ήταν λίγο μεγαλύτερη από ό,τι συνήθως, δηλαδή περιείχε τη TM (22 – 46) και 15 αμινοξέα του C-τελικού άκρου ώστε η δομή του πόρου του διαύλου να σχηματιστεί καλύτερα.

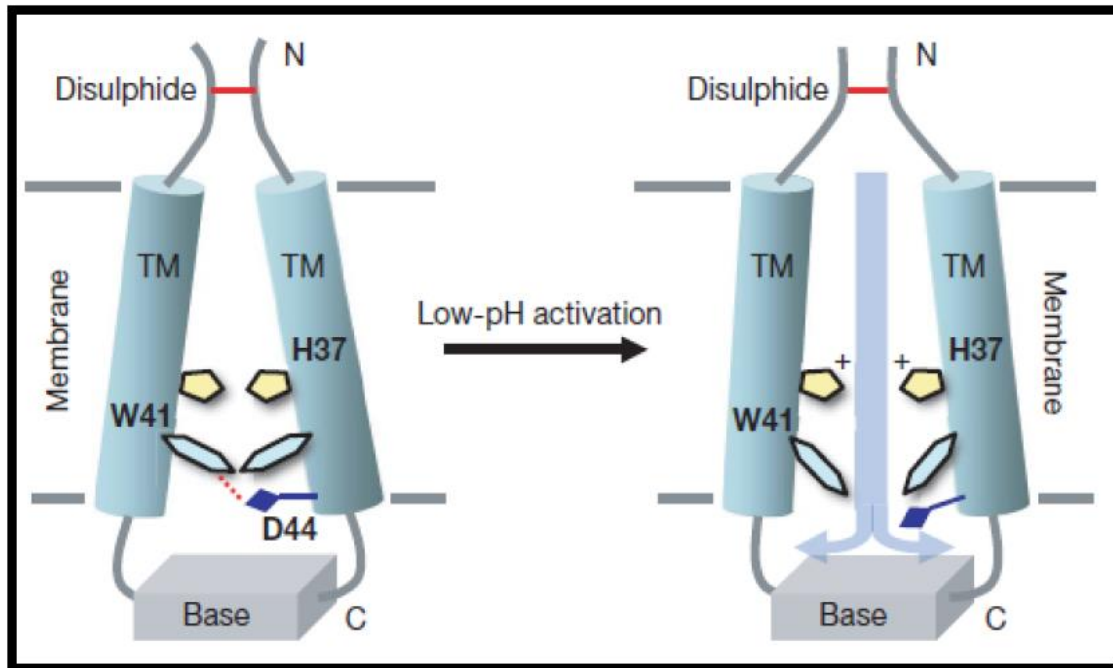
Η δομή του διαύλου της M2 αποκαλύπτει μια απλή, αλλά αποτελεσματική πύλη (σχ. 1.6). Οι διαμεμβρανικές έλικες σχηματίζουν μια αριστερόστροφη δέσμη τεσσάρων ελίκων, που σχηματίζουν γωνία ~ 23° με τον κάθετο άξονα ως προς το επίπεδο της μεμβράνης. Οι α-έλικες σχηματίζουν έναν άρτιο διάυλο ιόντων. Οι πλευρικές αλυσίδες (μεθύλια) της Val27 σχηματίζουν ένα δακτύλιο που περιορίζει την εσωτερική διάμετρο του N-τελικού άκρου του πόρου στα ~ 3.1 Å. Σε συμφωνία με τις πειραματικές μετρήσεις⁴², οι H37 και οι W41 βρίσκονται εντός του πόρου. Οι ινδολικοί δακτύλιοι της W41 συνωστίζονται σε απόσταση περίπου ίση με το άθροισμα των ακτίνων van der Waals των πλησιέστερων ατόμων τους, απαγορεύοντας τη διέλευση νερού ή πρωτονίων. Επιπλέον, η αμινομάδα του ινδολίου της W41 της μιας υπομονάδας είναι σε απόσταση σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με την καρβοξυλομάδα (COO-) του D44 (ασπαρτικού οξέος) της απέναντι υπομονάδας. Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου συμβάλλουν στη σταθεροποίηση της κλειστής πύλης της W41. Τέλος, οι πλευρικές αλυσίδες της R45 (αργινίνη) συμμετέχουν σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις με το D44. Χαμηλώνοντας το pH λαμβάνει χώρα πρωτονίωση των H37, αποσταθεροποίηση του

πακεταρίσματος των μονομερών ελίκων λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ ιμιδαζολίων. Αυτή η διαμορφωτική αναδιάταξη καταστρέφει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της W41 και του D44 και επιτρέπει τη διάνοιξη της πύλης του διαύλου.



Σχήμα 1.6: Δίαυλος M2TM

Το C-τελικό άκρο του πόρου M2TM εκτείνεται σε ένα μικρό βρόγχο (αμινοξέα 47 – 50) που συνδέει τη TM με την C-τελική αμφιπαθική έλικα της πρωτεΐνης M2. Οι αμφιπαθικές έλικες σχηματίζουν ένα ξεχωριστό τετραμερές με δεξιόστροφη κατεύθυνση ως βάση του διαύλου της πρωτεΐνης M2. Ο προσανατολισμός και ο αμφιπαθικός χαρακτήρας των ελίκων M2TM βοηθούν ώστε η C-τελική βάση να αγγίξει την επιφάνεια της μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα σταθεροποιώντας τη δομή της M2 (σχ. 1.7).



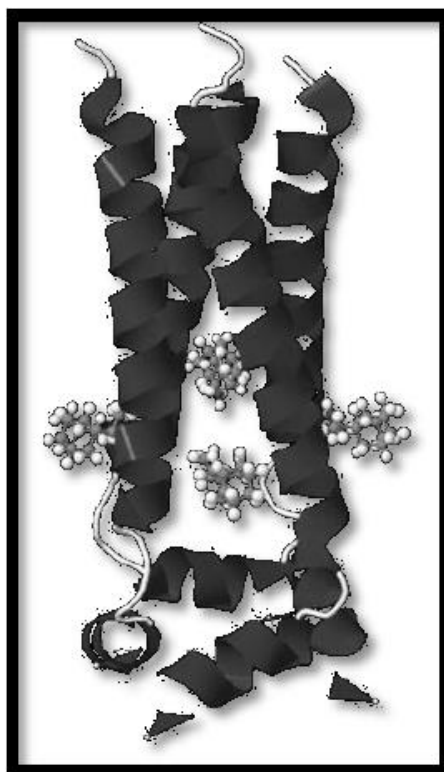
Σχήμα 1.7⁴¹: Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης του διαύλου M2. Σε υψηλό pH, οι διαμεμβρανικές έλικες συγκατοούνται σφικτά και η πύλη τρυπτοφάνης είναι κλειστή εξαιτίας ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων με το D44. Σε χαμηλό pH, η πρωτονίωση των ιμιδαζολίων της H37 αποσταθεροποιεί το πακετάρισμα των ελίκων, επιτρέποντας την ενυδάτωση του πόρου και την εισροή πρωτονίων. Για λόγους ευκρίνειας φαίνονται μόνο δύο από τις τέσσερις έλικες

Ένα ζευγάρι κυστεϊνών στο *N*-τελικό άκρο, που διατηρείται σε πολλές αλληλουχίες M2 πολλών στελεχών του ιού, έχει δειχθεί ότι σχηματίζει ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς *in vivo*. Ως εκ τούτου, οι διαμεμβρανικές έλικες M2TM είναι δεμένες μεταξύ τους σε ένα μεγάλο μόριο από τους δισουλφιδικούς δεσμούς στο *N*-τελικό άκρο και από την αμφιπαθική δέσμη δεξιόστροφων ελίκων στο *C*-τελικό άκρο. Έτσι διασφαλίζεται ότι η αποσταθεροποίηση της δέσμης των ελίκων που λαμβάνει χώρα κατά την ενεργοποίηση του διαύλου δεν προκαλεί τη διάσπαση του τετραμερούς (σχ. 1.7). Αντίθετα αυτό συμβαίνει σε μελέτες όπου χρησιμοποιείται μόνο το πεπτίδιο M2TM ως μοντέλο του πόρου του ιοντικού διαύλου. Αυτό σε βασικό pH παρουσία μικυλλίων (π.χ. *n*-δωδεκυλφωσφοχολίνη - DPC) σχηματίζει αυθόρμητα το τετραμερές που διασπάται σε μονομερή σε όξινο pH.

Στη μελέτη αυτή της ερευνητικής ομάδας του Chou⁴¹ η αμινομάδα της ριμανταδίνης φάνηκε να συνδέεται εκτός των της περιοχής του πόρου του διαύλου του τετραμερούς M2TM και να αλληλεπιδρά με την πλευρική αλυσίδα του D44 (σχ. 1.8) μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ($\text{COO}^- \cdots \text{NH}_3^+$), στις οποίες πιθανώς συμμετέχει και η R45. Υποστηρίχθηκε ότι μολονότι και το μοντέλο δεν υποστηρίζει τις μεταλλάξεις αμινοξέων στο εσωτερικό του πόρου, αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι οι μεταλλάξεις αυτές μπορεί αλλοστερικά να επηρεάζουν, μέσω κάποιας προκαλούμενης αλλαγής διαμόρφωσης, τη σύνδεση Rim-Asp44 Προτάθηκε δηλαδή ότι οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που φέρουν μεταλλάξεις αποσταθεροποιούν την κλειστή κατάσταση του

πόρου επιτρέποντας τη διάνοιξη του διαύλου. Μεγάλο μειονέκτημα της αξιοπιστίας αυτού του μοντέλου ήταν η χρήση εκτατονταπλάσιας περίσειας Rim, και όχι ισομοριακής, που μπορεί να οδηγεί πολύ πιθανώς σε μη ειδική σύνθεση της Rim (non-specific binding).

Τελικά το μοντέλο αυτό πρότεινε ότι τα αντικά φάρμακα Am και Rim δε δρουν ως αποκλειστές διαύλου, αλλά δρουν σε αλλοστερική θέση στο D44 σταθεροποιώντας την κλειστή δομή της M2 και κάνοντας το διάυλο πιο δύσκολο στο να βρεθεί στην ανοικτή του δομή.



Σχήμα 1.8⁴¹: Αναπαράσταση με κορδέλες της M2TM δείχνοντας το αριστερόστροφο πακετάρισμα των ελίκων της διαμεμβρανικής περιοχής M2TM και το δεξιόστροφο πακετάρισμα των αμφιπαθών ελίκων (50-61) και το φάρμακο ριμανταδίνη προσδεμένο σε αλλοστερική θέση κοντά στο D44

1.5.3 Μελέτη της ερευνητικής ομάδας του DeGrado - Κρυσταλλογραφία ακτίνων X

Ταυτόχρονα με τη μελέτη της ομάδας του Chou⁴¹, η ερευνητική ομάδα του DeGrado ήρθε να δώσει μια ακόμη δομή της περιοχής M2TM σε σύμπλοκο με την αμανταδίνη⁴³. Στη μελέτη αυτή μετρήθηκαν δύο κρύσταλλοι. Ο πρώτος κρύσταλλος μετρήθηκε με ανάλυση 2.0 Å και αφορούσε το πεπτίδιο της M2TM στο οποίο η I33 (ισολευκίνη) είχε μεταλλαχθεί σε σελενομεθειονίνη (I33SeM), σε pH 7.3, απουσία αμανταδίνης (σχήμα 1.8) (3BKD.pdb). Το πεπτίδιο κρυστάλλωσε με έξι μόρια οκτυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτη, που σχηματίζουν περιβάλλον ανάλογο της λιπιδικής μεμβράνης, στο

οποίο τα τετραμερή της M2TM ήταν ενσωματωμένα. Ο δεύτερος κρύσταλλος, με μικρότερη ανάλυση 3.5 Å, αφορούσε ένα πεπτίδιο που φέρει τη μετάλλαξη G34A και κρυσταλλώθηκε σε χαμηλότερο pH = 5.3, παρουσία αμανταδίνης (3C9J.pdb). Οι δομές αυτές βρέθηκαν παρόμοιες και εμφανίζουν κάποιες διαφορές στη C-τελική περιοχή των ελίκων.

Αναλύονται καταρχήν τα γενικά χαρακτηριστικά του διαύλου M2TM με βάση τη δομή υψηλότερης ανάλυσης 3BKD απουσία αμανταδίνης. Τα τετραμερή της M2TM σχηματίζουν μια αριστερόστροφη δέσμη, που μοιάζει-με κόλουρο κώνο, με το στενό N-τελικό άκρο να έχει κατεύθυνση προς το εξωτερικό του ιικού φακέλου. Κάθε έλικα αρχίζει στο N-τελικό άκρο από την πολική αλληλουχία που διατηρείται σε όλα τα στελέχη των ιών της influenza A, S-S-D. Τέσσερα αντίγραφα κάθε μονομερούς (22-46) σχηματίζουν έναν στενό πόρο γεμάτο διαλύτη, στον οποίο ευθυγραμμίζονται τα υδροξύλια των σερινών και τα καρβονύλια της κύριας αλυσίδας, μέσω του οποίου περνούν τα πρωτόνια. Το ήμισυ του N-τελικού τετραμερούς του διαύλου έχει ακριβώς περιστροφική συμμετρία ως προς C4 άξονα, με τις έλικες να σχηματίζουν γωνία $\sim 35 \pm 2^\circ$ ως προς τον επιμήκη άξονα του πόρου. Ο πόρος είναι πιο στενός στην περιοχή της V27, ενώ μετά το σημείο αυτό ανοίγει δημιουργώντας μια κοιλότητα γεμάτη από μόρια νερού που περικλείεται από τις πλευρικές αλυσίδες των μικρών αμινοξέων A30, S31 και G34 και έχει διάμετρο 10 Å στην περιοχή της G34, κοντά στο κέντρο της μεμβράνης. Μετά τη G34 η διάμετρος του πόρου αρχίζει πάλι να μειώνεται (kink) προς την κατεύθυνση της περιοχής των αμινοξέων H37 και W41 που συνιστούν την πύλη του ιοντικού πόρου.

Πρέπει να σημειωθεί ότι το μεγάλο άνοιγμα του διαύλου στο C-τελικό άκρο δεν είναι καθόλου συνεπές με το γεγονός ότι η δομή προσδιορίστηκε σε pH 7.3, η οποία αντιστοιχεί στην κλειστή διαμόρφωση. Μια πιθανή εξήγηση για το μεγάλο άνοιγμα κοντά στο C-τελικό άκρο είναι ότι το πεπτίδιο που χρησιμοποιήθηκε για αυτήν τη μελέτη δεν περιείχε τη C-τελική περιοχή (47 – 60), που είναι απαραίτητη για ένα σταθερότερο τετραμερές, μέσω του οποίου γίνεται η ροή πρωτονίων. Επίσης, το μη ρεαλιστικό πλάτος των TM ελίκων μπορεί να οφείλεται στον τρόπο πακεταρίσματος των κρυστάλλων ή και σε συνδυασμό και των δύο.

Η πρωτεΐνη M2 αναστέλλεται παρουσία αμανταδίνης και ριμανταδίνης⁴⁴. Στην πρωτεΐνη συνδέεται ένα μόριο φαρμάκου ανά τετραμερές, δηλαδή σε αναλογία 4:1.²⁸ Στην κρυσταλλογραφική δομή 3C9J το φάρμακο περιβάλλεται από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων V27, A30, S31 και G34 (σχ. 1.9).

Μειονέκτημα της κρυσταλλογραφικής δομής 3C9J είναι η χαμηλή της διαχωριστικότητα (resolution) που επέτρεψε να προσδιοριστεί προσεγγιστικά η θέση της αμανταδίνης εντός του πόρου μόνο από

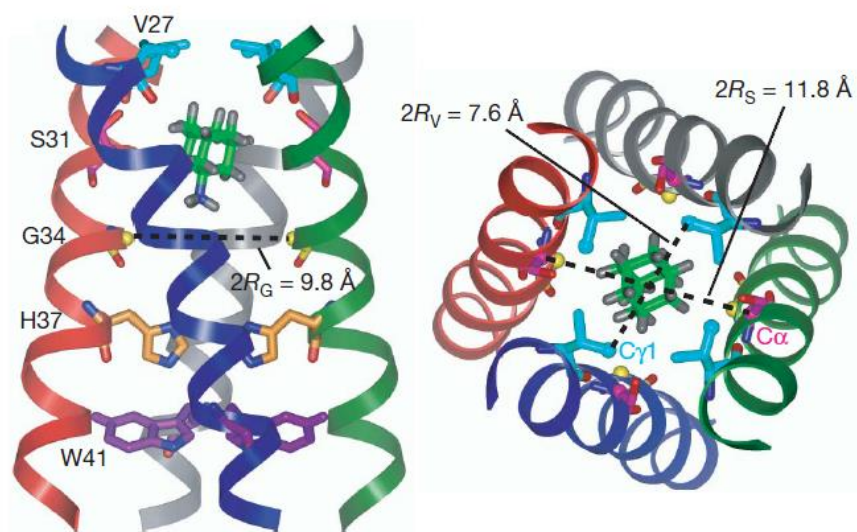
κάποια αυξημένη ηλεκτρονική πυκνότητα στην σχετική περιοχή μεταξύ Val27 και His37. Γι' αυτό η δομή αμφισβητήθηκε από την ομάδα του Chou όπως και γιατί χρησιμοποιήθηκε μικρότερη περιοχή (22-46) συγκριτικά με αυτή στη μελέτη NMR σε διάλυμα (22-61). Επίσης, λόγω της χαμηλής διαχωριστικότητας δεν ήταν δυνατός ο προσδιορισμός του προσανατολισμού της αμινομάδας της αμανταδίνης. Δύο είναι οι πιθανοί προσανατολισμοί του φαρμάκου είτε η αμινομάδα να κατευθύνεται προς το εξωτερικό του ιού (N-τελικό άκρο της M2TM) είτε εσωτερικά (C-τελικό άκρο της M2TM), όπου και δύναται να ενυδατωθεί από τον ενυδατωμένο πόρο επειδή το C-τελικό άκρο είναι ευρύτερο και πιο πλούσιο με μόρια νερού. Από τη μελέτη αυτή δεν έγινε τελικά γνωστός ο προσανατολισμός της αμινομάδας. Αυτό επιτεύχθηκε από τις μελέτες της ομάδας της Mei Hong όπως θα περιγραφεί στη συνέχεια.

Η δομή (3C9J.pdb) που δείχνει ότι ο πόρος είναι πολύ στενός στο N-άκρο³⁶ είναι σε πλήρη συμφωνία με ηλεκτροφυσιολογικές μελέτες ολόκληρης της πρωτεΐνης M2, που έχουν δείξει ότι η πρόσβαση του μορίου της αμανταδίνης εντός του πόρου είναι περίπου εκατό χιλιάδες φορές πιο αργή από ό,τι ήταν αναμενόμενο για τη διάχυση ενός μικρού μορίου σε ένα διάυλο με τέτοιο εξωκυτταρικό άνοιγμα στο N-τελικό άκρο της M2. Η πολύ στενή περιοχή του N-τελικού άκρου εξηγεί την αργή κινητική της εισόδου του φαρμάκου, που εισέρχεται στο κανάλι μέσω διαμορφωτικών αλλαγών ή πλευρικά από τη μεμβρανική φάση^{43,44}.

1.5.4 Μελέτη της ερευνητικής ομάδας της Mei Hong - Φασματοσκοπία ssNMR

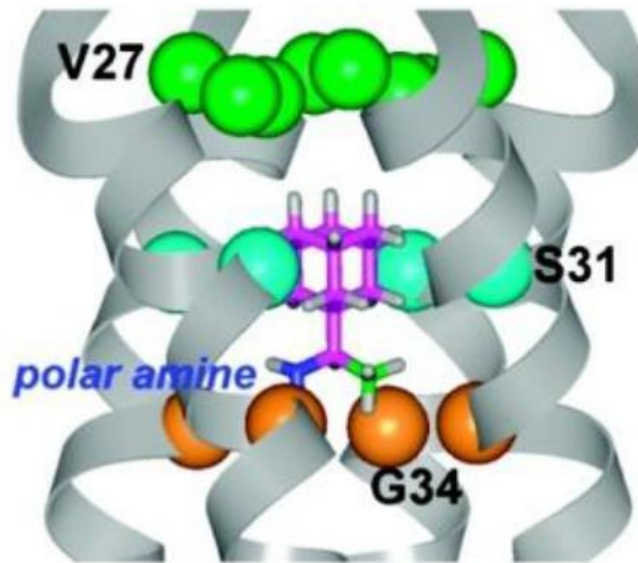
Παρά τις προηγούμενες μελέτες η θέση σύνδεσης της αμανταδίνης επί της M2TM δεν είχε βρεθεί αδιαμφισβήτητα. Οι ερευνητικές ομάδες των Mei-Hong και DeGrado σε μια μελέτη δομής με ssNMR κοντά σε ουδέτερο pH, μέτρησαν αποστάσεις μεταξύ υπερδευτεριωμένης αμανταδίνης και επισημασμένης ¹³C-Ala του πεπτιδίου M2TM. Η δομή που προσδιορίστηκε είχε ανάλυση 0.3 Å (2KQT.pdb). Από τις μετρήσεις βρέθηκε ότι υπάρχουν δύο περιοχές πρόσδεσης της αμανταδίνης στην ενσωματωμένη σε λιπιδικές μεμβράνες πρωτεΐνη M2, όπως είχε βρεθεί στα προηγούμενα μοντέλα¹⁵. Όμως η μία από αυτές ήταν η περιοχή της ειδικής σύνδεσης, που καταλαμβάνεται από ένα μόνο μόριο αμανταδίνης που, και βρίσκεται στην περιοχή του N-τελικού άκρου και περιβάλλεται από τα αμινοξέα Val27, Ala30 που μεταλλάσσονται σε ιούς ανθεκτικούς στην αμανταδίνη. Η δεύτερη, περιοχή μη ειδικής σύνδεσης παρατηρήθηκε στην επιφάνεια του C-τελικού άκρου κοντά στη D44, αλλά μόνον όταν το φάρμακο βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση (φτάνει τη μέγιστη συγκέντρωσή του στη διπλοστιβάδα). Η θέση και η δυναμική του φαρμάκου είναι διακριτά και στις δύο περιοχές, όπως φαίνεται από τις μελέτες 2H NMR. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι

η αμανταδίνη φράσσει όντως τον διάυλο της M2, ανοίγοντας τον δρόμο για την ανάπτυξη νέων αντικών φαρμάκων ενάντια στους ιούς της γρίπης.



Σχήμα 1.9⁴⁵: Αναπαράσταση με κορδέλες της M2TM, όπως προσδιορίστηκε σε σύμπλοκο με την αμανταδίνη από κρυσταλλογραφικές μελέτες της ερευνητικής ομάδας της Mei Hong.

Τέλος, δεν είχε ακόμη προσδιοριστεί ο ακριβής προσανατολισμός της αμινομάδας, δηλαδή αν αυτή δείχνει προς το N- ή το C- τελικό άκρο του διαύλου. Η διευκρίνιση της κατεύθυνσης της πολικής ομάδας θα δώσει φως στο μηχανισμό με τον οποίο η πρόσδεση του φαρμάκου αναστέλλει το διάυλο πρωτονίων και θα διευκολύνει τον ορθολογικό σχεδιασμό νέων αναστολέων. Σε μελέτη των Mei-Hong και DeGrado⁴⁶ προσδιορίστηκε η κατεύθυνση της πολικής αμινομάδας χρησιμοποιώντας M2TM σε λιπιδικές μεμβράνες, καθώς επίσης και σε μικκύλια DPC (δωδεκυλοφωσφοχολίνη). Πειράματα NMR διπλού συντονισμού $^{13}\text{C} - ^2\text{H}$ επισημασμένου με ^{13}C M2TM και μεθυλοδευτεριωμένης (CD_3) ριμανταδίνης σε λιπιδικές μεμβράνες έδειξαν ότι η πολική αμινομάδα προσανατολίζεται προς το C-τελικό άκρο του διαύλου με το μεθύλιο να βρίσκεται κοντά στην περιοχή της G34 (σχ. 1.10). Πειράματα NMR σε διάλυμα M2TM (22-46) σε μικκύλια DPC έδειξαν ότι η πρόσδεση του φαρμάκου προκαλεί σημαντικές αλλαγές των χημικών μετατοπίσεων της πρωτεΐνης που είναι παρόμοιες με εκείνες που έχουν βρεθεί για την M2TM (18 – 60) σε λιπιδικό περιβάλλον επομένως η δομή της M2TM δεν διαφέρει από τη δομή του Chou. Ο τελευταίος υποστήριξε ότι το μοντέλο αποκλεισμού του διαύλου του DeGrado που υποστήριξε με την κρυσταλλογραφική δομή προερχόταν από τη μεγαλύτερη διεύρυνση του πόρου ειδικά στην περιοχή του C-τελικού άκρου λόγω χρήσης της συντετμημένης περιοχής M2TM (22-46) που χρησιμοποίησε στα πειράματα του συγκριτικά με το μεγαλύτερο τμήμα M2TM (22-61) που χρησιμοποίησε εκείνος.



Σχήμα 1.10⁴⁶: Αναπαράσταση του προσανατολισμού της πολικής αμινομάδας της CD3-Rim προς το C-τελικό άκρο του πρωτεϊνικού διαύλου. Το μεθύλιο της ριμανταδίνης βρίσκεται κοντά στην περιοχή της G34.

1.6 Μηχανισμός αγωγιμότητας πρωτονίων

Τα πρωτόνια ξεχωρίζουν σε σχέση με άλλα ιόντα σε βιολογικά συστήματα διότι βρίσκονται σε δυναμική ανταλλαγή με το νερό οπότε απαντώνται σε ρυθμιστικά διαλύματα, τιτλοδοτούμενες ομάδες λιπιδίων, πρωτεϊνών και άλλων κυτταρικών μορίων. Η κινητικότητα πρωτονίων σε υδατικά διαλύματα είναι περίπου πέντε φορές μεγαλύτερη από εκείνη μονοσθενών κατιόντων παρόμοιου μεγέθους με το ιόν οξωνίου^{47,48}. Έχει προταθεί ότι τα πρωτόνια μπορούν να κινούνται στο νερό περνώντας από το ένα μόριο νερού στο άλλο κατά μήκος δικτύων μορίων νερού. Κάθε δίκτυο μορίων νερού είναι μια αλυσίδα μορίων νερού που συνδέονται με δεσμούς υδρογόνου. Ο μηχανισμός σχηματισμού δικτύου νερού αναφέρεται συνήθως ως μοντέλο Grotthuss⁴⁹. Συνεπώς, η κίνηση πρωτονίων κατά μήκος λιπιδικών μεμβρανών μέσω ιοντικών διαύλων αποτελεί έναν ιδιαίτερο και ξεχωριστό μηχανισμό.

1.6.1 Ο ρόλος των πολικών αμινοξέων στην αγωγιμότητα πρωτονίων από το διάυλο A/M2TM

Εξαιτίας της πρωτονίωσης των ιμιδαζολίων της H37, όπως έχει ήδη αναφερθεί, προκαλείται το άνοιγμα του διαύλου μέσω ηλεκτροστατικής άπωσης. Προτείνεται ότι ο διάυλος ανοίγει και η κατάσταση αγωγιμότητας πρωτονίων ενεργοποιείται μετά την πρωτονίωση του τρίτου ιμιδαζολίου. Με την πρωτονίωση των H37 ο δακτύλιος που σχηματίζεται από τα ινδόλια των αμινοξέων W41 διευρύνεται και τα ιόντα οξωνίου περνούν προς το C-τελικό άκρο. Θεωρείται ότι οι H37 συνιστούν

τους αισθητήρες του διαύλου και η W41 την πύλη του. Τα ινδόλια της W41 σχηματίζουν ένα δακτύλιο ακτίνας 1.4 Å στην κλειστή κατάσταση του διαύλου σε βασικό pH που αποτρέπει τα μόρια νερού να εισέλθουν από το C-τελικό άκρο του πόρου M2TM και να έλθουν σε επαφή με τις H37. Η αλληλουχία HXXXW διατηρείται μεταξύ των διαφόρων πρωτεϊνών M2 των τύπων influenza A, B.

Η A/M2 έχει και άλλα πολικά αμινοξέα κατά μήκος του πόρου του διαύλου. Αυτά τα αμινοξέα παίρνουν μέρος στην ενυδάτωση του διαύλου ως προϋπόθεση για τη μεταφορά των πρωτονίων. Μετάλλαξη αυτών των αμινοξέων με πιο υδρόφοβα οδηγεί σε χαμηλότερο ρυθμό ροής πρωτονίων⁵⁰. Οι μεταλλάξεις των αμινοξέων που δεν προκαλούν αναστολή της αμανταδίνης^{29,51} βρίσκονται σε θέσεις πιο απομακρυσμένες από την περιοχή πρόσδεσης, δηλαδή στην περιοχή του C-τελικού άκρου, όπου οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων βρίσκονται σε μεγαλύτερη επαφή με τη μεμβράνη (περιοχή L38 – D44). Η A/M2 έχει τέσσερα αμινοξέα στο διαμεμβρανικό της τμήμα ικανά να συμβάλλουν στη μεταφορά πρωτονίων, τη S31, την H37, το D44 και την R45. Η μετάλλαξη S31A οδηγεί σε μέτρια ελάττωση του ρυθμού ροής των πρωτονίων. Ωστόσο, η μετάλλαξη D44A μειώνει δραστικά το ρυθμό ροής των πρωτονίων, αφού το D44 διευκολύνει την έξοδο των πρωτονίων⁵². Η δομή NMR του κλειστού διαύλου δείχνει ότι η περιοχή του C-τελικού άκρου μετά την περιοχή της W41 είναι πυκνά πακεταρισμένη με υδρόφοβες φαινυλαλανίνες, οι οποίες σφραγίζουν το δίαυλο σε εκείνη την περιοχή. Το D44 και η R45 είναι τα μόνα πολικά αμινοξέα στο υδρόφοβο αυτό κομμάτι του διαύλου. Συνεπώς, είναι πιθανό να βοηθούν την έξοδο των πρωτονίων δεχόμενα τα πρωτόνια ή τα οξόνια και να τα απελευθερώνουν στην υδρόφιλη περιοχή της μεμβράνης. Επίσης το άνοιγμα της πύλης W41 μπορεί να ευνοείται από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα ινδόλια της W41 σε όξινο pH. Το D44 διατηρείται στους διάφορους μεταλλαγμένους ιούς σχεδόν πάντοτε, ενώ η R45 πάντοτε.

1.6.2 Ο ρόλος των μη πολικών αμινοξέων στην αγωγιμότητα πρωτονίων από το δίαυλο A/M2TM

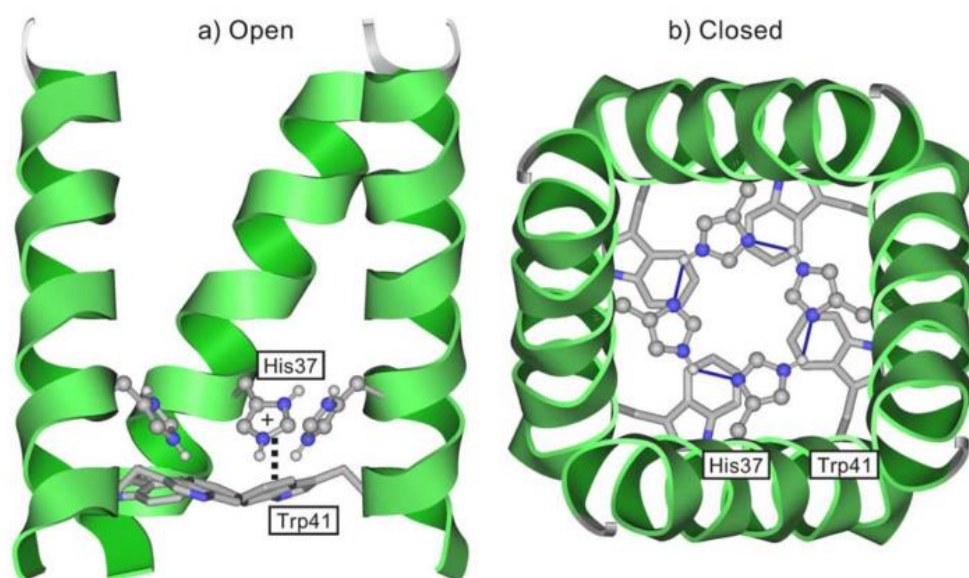
Στο N-τελικό άκρο που είναι στενότερο οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες της V27 δρουν ως πρώτη πύλη για την είσοδο πρωτονίων εντός του πόρου³².

Επειδή ο πόρος έχει σχήμα κολουρου κώνου η πρωτονίωση των His37 κλείνει την πύλη της Val27 σπρώχνοντας οξόνια προς το C-τελικό άκρο και η αποπρωτονίωση στενεύει το C-τελικό άκρο ανοίγοντας την πύλη της Val27 ώστε να περάσουν μόρια νερού έτοιμα να διοχετεύσουν οξόνια προς το C-τελικό άκρο με την πρωτονίωση των His37.

1.6.3 Μηχανισμός της αγωγιμότητας των πρωτονίων: Ο Ρόλος της H37, W41

Η ροή πρωτονίων της A/M2 οδηγείται από το δυναμικό πρωτονίων (διαφορά δυναμικού λόγω περίσσειας πρωτονίων στο N-άκρο) και γίνεται μόνο με κατεύθυνση από το N- προς το C-τελικό άκρο. Στο N-τελικό άκρο που είναι στενότερο οι υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες της V27 δρουν ως πρώτη πύλη για την είσοδο πρωτονίων εντός του πόρου³². Όπως αναφέρθηκε, τα πολικά αμινοξέα στο εσωτερικό του διαύλου διευκολύνουν την ενυδάτωσή του επιτρέποντας στα πρωτόνια να φτάσουν τις H37. Με την πρωτονίωση τα ιμιδαζόλια των ιστοιδινών φορτίζονται θετικά και ο πόρος «ανοίγει» λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων.

Η ανοικτή κατάσταση του διαύλου φαίνεται να σταθεροποιείται μέσω ευνοϊκής αλληλεπίδρασης π -δεσμών μεταξύ των κατιόντων ιμιδαζολίου της H37 και του ινδολίου της W41 (σχ. 1.11). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές π -κατιόντος αναγνωρίζονται από τις κύριες μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις που είναι σημαντικές για τη σταθεροποίηση της δομής των πρωτεϊνών και από ενεργειακής πλευράς είναι ισότιμες ή και ισχυρότερες από ένα συνήθη δεσμό υδρογόνου. Στην κλειστή κατάσταση του διαύλου τα ιμιδαζόλια των H37 είναι ουδέτερα και σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου φράζοντας τον πόρο (σχ. 1.11).

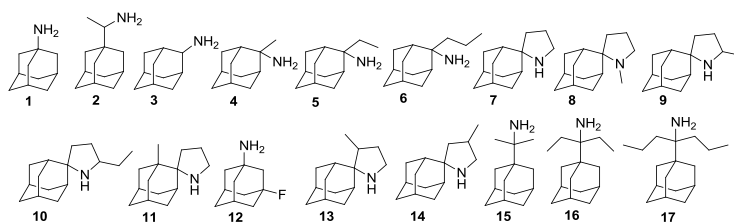


Σχήμα 1.11³²: Ο ρόλος των H37, W41 στην ανοικτή και κλειστή κατάσταση του διαύλου. Με στικτή γραμμή συμβολίζεται η αλληλεπίδραση π -δεσμών της πρωτονιωμένης ιστοιδίνης (κατιόν ιμιδαζολίου) με το ινδόλιο της τρυπτοφάνης της γειτονικής αλυσίδας. Με λεπτή κυανή γραμμή συμβολίζονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ιμιδαζολίων.

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία επιδιώκει να προσεγγίσει τη διαδικασία ανάπτυξης νέων δραστικών φαρμακομορίων αποκλειστών της πρωτεΐνης influenza A/M2, τόσο μέσω της σύνθεσης νέων φαρμακομορίων, όσο και εφαρμόζοντας μεθόδους υπολογιστικής φαρμακοχημείας. Στόχοι της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι:

1. Έγινε επικύρωση, περαιτέρω συμπλήρωση και βελτιστοποίηση του υπολογιστικού μοντέλου προσδιορισμού της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών **1-14** με τη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης M2, που έχει προταθεί από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας^{53,54}. Εφαρμόστηκαν (α) υπολογισμοί ελλιμενισμού και (β) διαταραχής ελεύθερης ενέργειας σε συνδυασμό με μοριακή δυναμική (Free Energy Perturbation/Molecular Dynamics, FEP/MD) σε αληθινούς μετασηματισμούς υπολογίζοντας τη σχετική ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης με τη μέθοδο Bennett Acceptance Ratio (BAR). Στους υπολογισμούς FEP δοκιμάστηκε λιπιδική στιβάδα DMPC συγκριτικά με την DPPC που είχε δοκιμαστεί παλιότερα.
2. Το παραπάνω μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό τριών νέων παραγώγων (**15-17**). Ακολούθησε η σύνθεση και η μελέτη της σύνδεσης των νέων αμινοαδαμαντανικών προσδετών με τη διαμεμβρανική περιοχή A/M2TM (22-46) με θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης. Πραγματοποιήθηκε ο αντικός έλεγχος *in vitro* έναντι διαφόρων στελεχών του ιού influenza A, τόσο του νέου επιδημικού S31N που είναι ανθεκτικός στην αμανταδίνη αλλά και του παλιότερου N31S. Έγινε μια προσπάθεια ανάλυσης του θερμοδυναμικού προφίλ των αμινοαδαμαντανικών ενώσεων **1-17**.
3. Πραγματοποιήθηκαν κάποιες αρχικές μελέτες για τη σύνθεση των α,α,α-τρισυποκατεστημένων πρωτοταγών αμινών, παραγώγων της ριμανταδίνης **15-17**, μέσω πορείας μιας φιάλης. Οι μελέτες θα συμπληρωθούν σε επόμενη διδακτορική διατριβή.
4. Πραγματοποιήθηκε η μελέτη διαμορφωτικών ιδιοτήτων ενός αδαμαντανικού παραγώγου με φασματοσκοπία DNMR χαμηλών θερμοκρασιών.



Σχήμα 2.1: Αμινοαδαμαντανικοί προσδέτες που μελετώνται στην παρούσα εργασία

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

3.1 Γενικά

Η βιολογική θερμιδομετρία μπορεί να χρονολογηθεί από τη δεκαετία του 1780, όταν οι Lavoisier και Laplace χρησιμοποίησαν το θερμιδόμετρο πάγου για να μετρήσουν τη θερμότητα μεταβολισμού ζωντανών πειραματόζωων.^{55,56} Μέχρι το σχετικά πρόσφατο παρελθόν, η χρήση της θερμιδομετρίας στη Βιοφυσική και τη Μοριακή Βιολογία έμενε περιορισμένη σε λίγα εξειδικευμένα εργαστήρια με εξοπλισμό δικής τους κατασκευής. Πλέον η κατάσταση έχει αλλάξει, καθώς υψηλής ευαισθησίας μικροθερμιδόμετρα, ειδικά για βιοφυσικές εφαρμογές, είναι εμπορικά διαθέσιμα, πράγμα που οδήγησε σε ευρύτερη χρήση θερμιδομετρικών μεθόδων στη Βιοφυσική και τη Μοριακή Βιολογία.⁵⁷

Ο σχεδιασμός φαρμακομορίων με βάση τη δομή υποδοχέα (structure-based drug design) αποτελεί την αιχμή του δόρατος στη σύγχρονη έρευνα για ανακάλυψη νέων φαρμακομορίων (drug discovery). Οι νέες ενώσεις-οδηγοί (lead compounds) σχεδιάζονται με βάση το κατά πόσο ταιριάζουν οι προτεινόμενες δομές τους με τις συμπληρωματικές δομές των ενεργών κέντρων των αντίστοιχων υποδοχέων, οι οποίες έχουν επιλυθεί με περίθλαση ακτίνων X ή Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).⁵⁸ Σήμερα υπάρχουν μεγάλες βάσεις δεδομένων που περιγράφουν τη συμπληρωματικότητα των περιοχών των μορίων που αλληλεπιδρούν και τον ακριβή προσανατολισμό των ομάδων των μορίων που αλληλεπιδρούν (πχ RCSB Protein Data Bank⁵⁹), όπως επίσης και βάσεις δεδομένων που διαθέτουν μεγάλο αριθμό βιοδραστικών ενώσεων (μοριακές βιβλιοθήκες / χημειοθήκες – πχ ZINC⁶⁰). Η συνδυασμένη χρήση των παραπάνω μέσω κατάλληλων προγραμμάτων έφερε επανάσταση στο σχεδιασμό φαρμακομορίων με τη χρήση της εικονικής δοκιμής (virtual screening).

Μέσω αυτών των λεπτομερειών γίνεται γνωστό το πώς αλληλεπιδρούν τα μόρια, αλλά δεν γνωστοποιείται καλά το γιατί, αφού οι δομές αυτές των βιομοριακών συμπλόκων είναι στατικές (στιγμιότυπα, συνήθως ελάχιστα ενός μεγάλου διαμορφωτικού χώρου).^{61,62} Για αυτό το λόγο οι θερμοδυναμικές μελέτες αποτελούν απαραίτητο και ουσιαστικό συμπλήρωμα των δομικών μελετών στο σχεδιασμό φαρμακομορίων.⁵⁸ Η θερμοδυναμική μελέτη παρέχει ποσοτικά δεδομένα που είναι χρήσιμα για την αποσαφήνιση των κινητήριων δυνάμεων σχηματισμού βιολογικών συμπλόκων, και για τη βαθύτερη κατανόηση της επίδρασης που έχουν οι αλλαγές στον προσδέτη στην συγγένεια πρόσδεσής του με τον υποδοχέα.⁶³

3.2 Βασικές θερμοδυναμικές εξισώσεις και περιγραφή φαινομένων σύνδεσης

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs (ισοθερμικό-ισοβαρές στατιστικό σύνολο ή στατιστικό σύνολο NPT), ΔG , μιας αντίδρασης σύνδεσης εξαρτάται από τη θερμοκρασία και περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3.1)$$

Οι μεταβολές της ενθαλπίας (ΔH) και της εντροπίας (ΔS) εξαρτώνται από τη θερμοκρασία (T), σύμφωνα με την εξίσωση της μεταβολής της θερμοχωρητικότητας (ΔC_p):

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta H)}{dT} - T \frac{d(\Delta S)}{dT} \quad (3.2)$$

όπου $C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{N,P}$.

Η παραπάνω έκφραση μπορεί να γραφεί:

$$\Delta C_p = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T}\right)_{N,P} - \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial \ln T}\right)_{N,P} \quad (3.3)$$

Βάσει των παραπάνω σχέσεων, η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά τη μεταβολή της θερμοκρασίας από μια κατάλληλη θερμοκρασία αναφοράς T_{ref} σε μια τυχαία θερμοκρασία T , μπορεί να γραφεί:

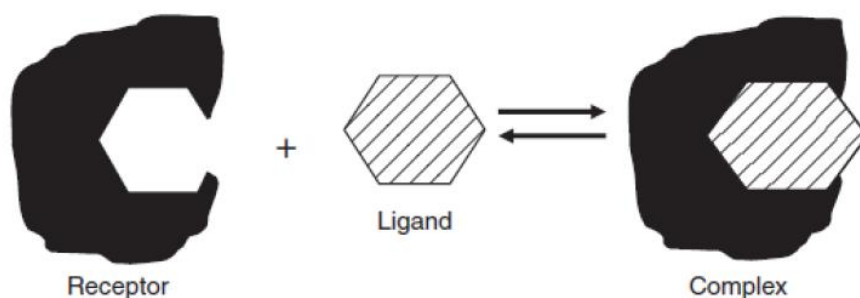
$$\Delta G = \Delta H_{ref} + \int_{T_{ref}}^T \Delta C_p dT - T\Delta S_{ref} - T \int_{T_{ref}}^T \Delta C_p d \ln T \quad (3.4)$$

Εάν υποθεθεί ότι η ΔC_p είναι ανεξάρτητη της θερμοκρασίας στο διάστημα ενδιαφέροντος, τότε η εξίσωση απλοποιείται στην παρακάτω έκφραση:

$$\Delta G = \Delta H_{ref} - T\Delta S_{ref} + \Delta C_p [(T - T_{ref}) - T \ln(T/T_{ref})] \quad (3.5)$$

Οι εξισώσεις (3.4) και (3.5) δείχνουν ότι η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης έχει μια ενθαλπική και μια εντροπική συνιστώσα. Για το θερμοδυναμικό χαρακτηρισμό μιας αντίδρασης σύνδεσης, πρέπει να προσδιοριστούν οι μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας, της ενθαλπίας και της εντροπίας, καθώς επίσης να προσδιοριστεί η μεταβολή των τριών αυτών μεγεθών με τη θερμοκρασία ώστε να ληφθεί η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας.

Στο σχήμα 3.1 αναπαρίσταται μια τυπική ισορροπία πρόσδεσης μεταξύ ενός προσδέτη και ενός υποδοχέα.⁶⁴



Σχήμα 3.1⁶⁴: Απλουστευμένο μοντέλο αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός υποδοχέα (receptor) και ενός προσδέτη (ligand) προς σχηματισμό του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη (receptor-ligand complex). Ο προσδέτης σε αυτήν την αναπαράσταση ταιριάζει με τη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα ώστε να προκαλέσει μια συγκεκριμένη αλληλεπίδραση πρόσδεσης.

Γενικά, ο προσδέτης μπορεί να είναι π.χ. αναστολέας, φάρμακο, συνένζυμο, μεταλλικό ιόν, πρωτεΐνη, πολυπεπτίδιο, ολιγονουκλεοτίδιο, νουκλεϊκό οξύ, κ.λπ., που μπορεί να αλληλεπιδράσει μη ομοιοπολικά με συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα, συνήθως πρωτεΐνης ή νουκλεϊκού οξέος. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 2.1 στην ισορροπία στο διάλυμα συμμετέχουν τρία είδη, ο υποδοχέας, ο προσδέτης και το σχηματιζόμενο σύμπλοκο. Για την κατανόηση, λοιπόν, της εικονιζόμενης αντίδρασης, αρχικά, είναι απαραίτητη η σταθερά ισορροπίας, K_a , και η στοιχειομετρία n , πόσοι δηλαδή προσδέτες προσδένονται στο μακρομόριο όταν αυτό βρίσκεται σε κορεσμό. Ωστόσο, για τη βαθύτερη κατανόηση του σχήματος 3.1 απαιτείται η γνώση των συνεισφορών της ενθαλπίας (ΔH) και της μεταβολής της εντροπίας (ΔS) στο σχηματισμό του συμπλόκου.

Συμβολίζοντας τον υποδοχέα (R, receptor), τον προσδέτη (L, ligand) και το σύμπλοκό τους (RL), η σχηματική αναπαράσταση του σχήματος 4.1 μπορεί να αποδοθεί με την παρακάτω ισορροπία:



η σταθερά σύνδεσης ή σχηματισμού του συμπλόκου K_a για την αντίδραση (3.6) δίνεται από τη σχέση

$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} \quad (3.7)$$

και η κανονική μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs, ΔG° , σχετίζεται με τη σταθερά σύνδεσης ή σχηματισμού K_a σύμφωνα με τη σχέση

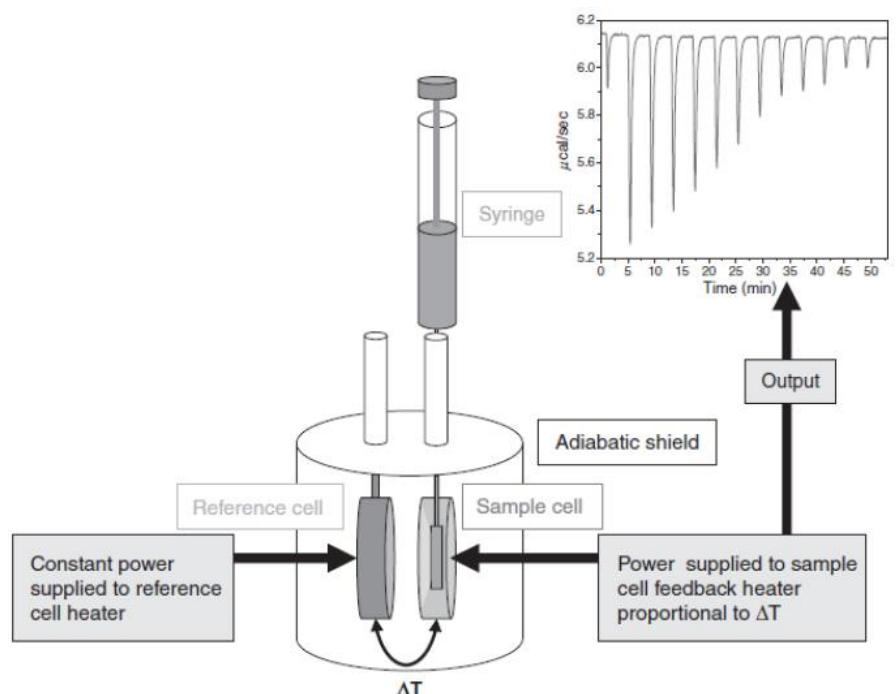
$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K_a \quad (3.8)$$

όπου R η παγκόσμια σταθερά των ιδανικών αερίων και ίση με $R = 8.314 \text{ J/K}$ και T η απόλυτη θερμοκρασία σε Kelvin (K).

3.3 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης – Περιγραφή της μεθόδου

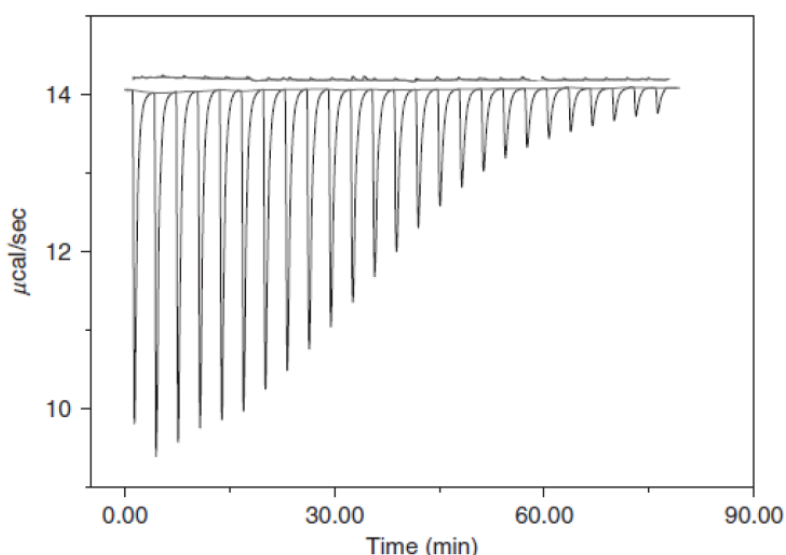
Η Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry – ITC) αποτελεί μία από τις δύο μεθόδους, που είναι κατάλληλες για τον άμεσο προσδιορισμό της ΔH , με την άλλη να είναι η Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry – DSC). Η ITC αποτελεί την πιο άμεση μέθοδο για τη μέτρηση της θερμότητας κατά το σχηματισμό ενός συμπλόκου σε σταθερή θερμοκρασία. Έτσι, με την τιτλοδότηση ενός προσδέτη L σε διάλυμα του υποδοχέα R προσδιορίζονται η σταθερά σύνδεσης K_a καθώς και η στοιχειομετρία του συμπλόκου n . Είναι επίσης δυνατός ο προσδιορισμός της ΔS° . Επιπλέον είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ΔC_p , σύμφωνα με την εξίσωση (2.3), με θερμιδομετρία τιτλοδότησης, με πειράματα που διενεργούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Η τιτλοδότηση του διαλύματος του υποδοχέα R με το διάλυμα του προσδέτη L πραγματοποιείται στο κελί του δείγματος και σε σταθερή θερμοκρασία (ισοθερμική τιτλοδότηση), όπως φαίνεται στο σχήμα 3.2.⁶⁴



Σχήμα 3.2⁶⁴: Αντιπροσωπευτική αναπαράσταση ενός θερμιδόμετρου ITC. Διακρίνονται τα κελιά του δείγματος (*sample cell*) και αναφοράς (*reference cell*), η σύριγγα (*syringe*) με την οποία προστίθεται ο τιτλοδότης και το αδιαβατικό τοίχωμα (*adiabatic shield*). Το διάγραμμα (*output*) δείχνει μια υπεραπλούστευση του πώς μετράται η θερμότητα, που εκλύεται ή απορροφάται από το όργανο για να διατηρήσει σταθερή τη θερμοκρασία μεταξύ των κελιών του δείγματος και αναφοράς, και καταγράφεται ως σήμα του οργάνου.

Μετά από κάθε προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος προσδέτη L στο διάλυμα του υποδοχέα R, μετράται η θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται στο κελί του δείγματος σε σχέση με ένα κελί αναφοράς που είναι γεμάτο με ρυθμιστικό διάλυμα. Το κελί του δείγματος και το κελί αναφοράς είναι τοποθετημένα σε δοχείο με αδιαβατικό περίβλημα. Ο προσδέτης προστίθεται στο διάλυμα του μακρομοριακού υποδοχέα με τη χρήση σύριγγας ακριβείας, που οδηγείται από έναν κινητήρα βήματος που ελέγχεται από H/Y, ενώ ταυτόχρονα το σχηματιζόμενο διάλυμα αναδεύεται για πιο γρήγορη ανάμιξη των αντιδρώντων. Τέλος, κατά τη σταδιακή προσθήκη του προσδέτη λαμβάνεται το γράφημα του σχήματος 2.3, με κάθε κορυφή να αντιστοιχεί στη θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται σε κάθε προσθήκη του προσδέτη στον υποδοχέα. Όπως φαίνεται από το σχήμα 3.3, καθώς προχωράει η τιτλοδότηση η ποσότητα υποδοχέα που παραμένει ελεύθερη για αντίδραση με τον προσδέτη μικραίνει και επίσης η θερμότητα που εκλύεται ελαττώνεται προοδευτικά.



Σχήμα 3.3⁶⁴: Θερμιδογράφημα στο οποίο φαίνεται η μεταβολή της θερμότητας ως συνάρτηση του χρόνου.

3.4 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης – Μαθηματική θεμελίωση

Η μεταβολή της θερμότητας εκφράζεται ως η ηλεκτρική ισχύς (J/s) που απαιτείται για τη διατήρηση σε σταθερή τιμή της μικρής διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του κελιού του δείγματος και του κελιού αναφοράς (σχήμα 3.3).⁶⁴ Με ολοκλήρωση του διαφορικού σήματος ισχύος ως προς το χρόνο, προκύπτει η μεταβολή της θερμότητας $\Delta q_{i,app}$ μεταξύ της προσθήκης για $i - 1$ και i , η οποία δίνεται από τη σχέση (3.9)

$$\Delta q_{i,app} = q_i - q_{i-1} \quad (3.9)$$

Το $\Delta q_{i,app}$ είναι ανάλογο της συνολικής ποσότητας του σχηματιζόμενου συμπλόκου $\Delta[RL_i]$ ή $\Delta[L_i]_{bound}$, του όγκου του θερμομετρικού κελιού V_{cell} , καθώς και της αντίστοιχης ενθαλπίας σύνδεσης ΔH_{app} , όπως φαίνεται στη σχέση (3.10)

$$\Delta q_{i,app} = \Delta q_i + \Delta q_{i,dil} + \Delta q_{i,ns} = \Delta[L_i]_{bound} \cdot V_{cell} \cdot \Delta H_{app} \quad (3.10)$$

Αν η K_a είναι μεγάλη και η ποσότητα του προσδέτη L στην αρχή της τιτλοδότησης είναι μικρή, τότε στην πραγματικότητα όλος ο προσδέτης είναι συνδεδεμένος στον υποδοχέα και οι επιφάνειες των κορυφών είναι παρόμοιες. Καθώς ο τμηματικός κορεσμός αυξάνεται, το $\Delta q_{i,app}$ σταδιακά ελαττώνεται όπως αναφέρθηκε (σχήμα 3.3). Στο τέλος όλα τα σημεία του υποδοχέα έχουν κορεστεί. Όπως φαίνεται από την εξίσωση (3.10), στην ποσότητα $\Delta q_{i,app}$ εμπεριέχονται μικρές μεταβολές θερμότητας που προκαλούνται από την αραιώση του διαλύματος στο κελί τιτλοδότησης $q_{i,dil}$ και από άλλα μη ειδικά φαινόμενα (non-specific effects) υπεύθυνα για τη θερμότητα $q_{i,ns}$.

Για μια αντίδραση στοιχειομετρίας 1:1 ($n=1$), σαν κι αυτή που περιγράφηκε στην ενότητα 3.2, η ισορροπία σύνδεσης περιγράφεται από τις εξισώσεις (3.11) και (3.12)

$$[L]_{tot} = [L] + [RL] \quad (3.11)$$

$$[R]_{tot} = [RL] + [R] = [RL] + \frac{[RL]}{K_a[L]} \quad (3.12)$$

όπως προκύπτει από τη σχέση (3.7).

Αν η εξίσωση (3.11) λυθεί ως προς [L] και αντικαθιστώντας στην εξίσωση (3.12) προκύπτει το πολυώνυμο δευτέρου βαθμού (3.13)

$$[RL]^2 + [RL] \left(-[R]_{tot} - [L]_{tot} - \frac{1}{K_a} \right) + [R]_{tot}[L]_{tot} = 0 \quad (3.13)$$

με μοναδική λύση την

$$[RL] = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4c}}{2} \quad (3.14)$$

με

$$b = -[R]_{tot} - [L]_{tot} - \frac{1}{K_a} \quad (3.15)$$

$$c = [R]_{tot}[L]_{tot}$$

Δηλαδή η εξίσωση (3.13) περιλαμβάνει δυο αδιάστατες μεταβλητές b , c που εξαρτώνται από την ολική συγκέντρωση του προσδέτη $[L]_{tot}$ και την ολική συγκέντρωση του μακρομορίου $[R]_{tot}$.

Παραγωγίζοντας τη σχέση (3.14) ως προς $[L]_{tot}$ λαμβάνεται η έκφραση (3.16)

$$\frac{d[RL]}{d[L]_{tot}} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r-[L]_r}{2}}{[L]_r^2 - 2[L]_r(1-r) + \sqrt{(1+r)^2}} \quad (3.16)$$

όπου $r = 1/(K_a[R]_{tot})$ και $[L]_r = [L]_{tot}/[R]_{tot}$.

Η αλλαγή στη συγκέντρωση $[RL]$ σχετίζεται με τη μεταβολή της θερμότητας (διαφορικό) σε κανονικές συνθήκες, σύμφωνα με τη σχέση (3.17), όπως προκύπτει από την εξίσωση (3.10)

$$dq = d[RL] \cdot \Delta H^\circ \cdot V_{cell} \quad (3.17)$$

με ΔH° να συμβολίζει τη μοριακή ενθαλπία σύνδεσης και V_{cell} τον όγκο του κελιού.

Αντικαθιστώντας στην εξίσωση (3.17) την εξίσωση (3.16) προκύπτει η τελική εξίσωση (3.18)

$$\frac{dq}{d[L]_{tot}} = \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1+r-[L]_r}{2}}{[L]_r^2 - 2[L]_r(1-r) + \sqrt{(1+r)^2}} \right] \cdot \Delta H^\circ \cdot V_{cell} \quad (3.18)$$

Η εξίσωση (3.18) περιλαμβάνει δυο παραμέτρους χωρίς μονάδες που εξαρτώνται από την ολική συγκέντρωση του προσδέτη $[L]_{tot}$ και την ολική συγκέντρωση του μακρομορίου $[R]_{tot}$.

$$[L]_r = \frac{[L]_{tot}}{[R]_{tot}} \quad (3.19)$$

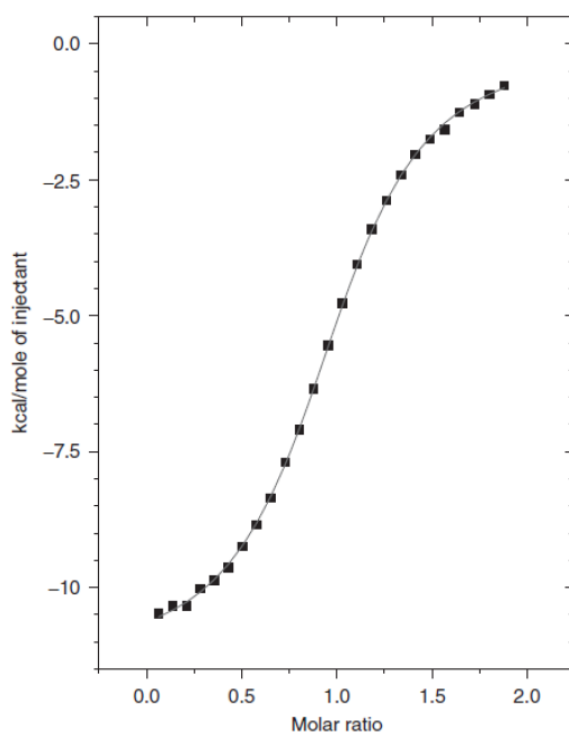
$$1/r = c = [R]_{tot}K_a \quad (3.20)$$

3.5 Προσδιορισμός ποσοτήτων με την τεχνική ITC

Η πειραματική παράμετρος που προσδιορίζεται από τη θερμιδομετρία τιτλοδότησης (σχήμα 3.4) είναι η διαφορική θερμότητα $dq/d[L]_{tot}$ και δεν εξαρτάται από την απόλυτη τιμή $[R]_{tot}$, όπως

φαίνεται από τις εξισώσεις (3.19) και (3.20), παρά μόνο από την τιμή της σε σχέση με την K_a και σε σχέση με την $[L]_{\text{tot}}$.

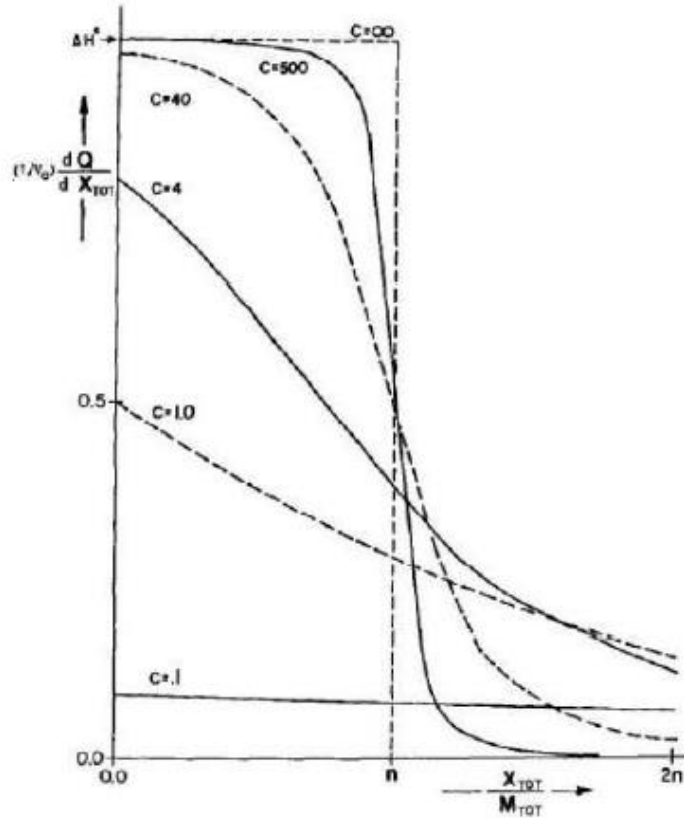
Το σχήμα 3.4 προκύπτει από την ολοκλήρωση του γραφήματος 3.3 και αναπαριστά την «ολοκληρωμένη» (*integrated*) μορφή του γραφήματος του σχήματος 3.3. Από τις δύο καμπύλες λαμβάνονται τα ΔH , K_a και n για ένα πείραμα ITC.



Σχήμα 3.4⁶⁴: «Ολοκληρωμένη» μορφή διαφορικού σήματος ως προς το χρόνο. Τα δεδομένα του γραφήματος αυτού έχουν υποστεί μη-γραμμική προσαρμογή.

Μετά τη λήψη των δεδομένων γίνεται μη γραμμική προσαρμογή (*non-linear regression*) με συγκεκριμένο μοντέλο σιγμοειδούς καμπύλης τιτλοδότησης, όπως προκύπτει από την εξίσωση (3.18). Από την προσαρμογή αυτή μπορούν να προσδιοριστούν οι τιμές ΔH , K_a και n από ένα και μόνο πείραμα τιτλοδότησης.

Στο διάγραμμα του σχήματος 3.5 φαίνονται οι καμπύλες τιτλοδότησης, όπως προκύπτουν από την εξίσωση (3.18) για τις διάφορες τιμές των παραμέτρων $dq/d[L]_{\text{tot}}$ και $[L]_r$ (στο σχήμα 3.5 χρησιμοποιείται ο συμβολισμός X_{tot} αντί $[L]_{\text{tot}}$ και dQ/dX_{tot} αντί $dq/d[L]_{\text{tot}}$).



Σχήμα 3.5⁶⁵: Καμπύλες σύνδεσης για τις διάφορες τιμές των παραμέτρων $\frac{dq}{d[L]_{\text{tot}}}$ ($\frac{dQ}{dX_{\text{tot}}}$) και $[L]_r$ (ή X_r), $c = [R]_{\text{tot}}K_a$.

Ο υπολογιστής του οργάνου διαθέτει λογισμικό που προσπαθεί να βρει την ιδανική καμπύλη για τα πειραματικά σημεία $\frac{dq}{d[L]_{\text{tot}}}$ και $[L]_r$ της τιτλοδότησης. Για πολύ ισχυρή σύνδεση ($r^{-1} = \infty$) όλος ο προσδέτης είναι συνδεδεμένος μέχρι να επέλθει κορεσμός κι έτσι προκύπτει η καμπύλη με μορφή παραλληλογράμμου με ύψος ΔH° . Για μέτριας ισχύος σύνδεση με τιμές r^{-1} μεταξύ 1 και 1000 το σχήμα των ισόθερμων σύνδεσης είναι πολύ ευαίσθητο σε μικρές αλλαγές του r^{-1} . Η τομή των καμπυλών αυτών στον άξονα $\frac{dq}{d[L]_{\text{tot}}}$ δεν είναι πλέον ίση με ΔH° , αλλά η παράμετρος αυτή προκύπτει εύκολα από το συνολικό εμβαδό κάτω από την καμπύλη και το σχήμα της. Για πολύ ασθενή σύνδεση (π.χ. $r^{-1} = 0.1$) λαμβάνεται μια οριζόντια γραμμή, από την οποία όπως και με την πολύ ισχυρή σύνδεση, προκύπτει λίγη πληροφορία για την ακριβή τιμή της K_a .

Έτσι, μόνο για τιμές r^{-1} στην περιοχή 1 – 1000 οι ισόθερμες μπορούν να αναλυθούν ώστε να δώσουν ακριβείς τιμές της σταθεράς σύνδεσης K_a . Είναι φανερό ότι από τη σχέση $r^{-1} = K_a[R]_{\text{tot}}$, συνδέσεις πρωτεΐνης – προσδέτη με μεγάλο K_a μπορούν να μελετηθούν σε χαμηλές συγκεντρώσεις $[R]_{\text{tot}}$, ενώ αυτές με μικρό K_a χρειάζονται μεγάλες σχετικά συγκεντρώσεις, ώστε η τιμή $K_a[R]_{\text{tot}}$ να βρίσκεται εντός του παραθύρου 1 – 1000.

3.6 Εφαρμογή της θερμοδυναμικής στο σχεδιασμό φαρμακομορίων

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά Gibbs ΔG αποτελεί καθοριστική ποσότητα για την περιγραφή μιας αντίδρασης, καθώς η τιμή της για δεδομένες συγκεντρώσεις των αντιδρώντων υπαγορεύει την κατεύθυνση της βιομοριακής ισορροπίας. Εάν $\Delta G < 0$, η αντίδραση σύνδεσης φαρμακομορίου-υποδοχέα ή η αλλαγή διαμόρφωσης θα προχωρήσει αυθόρμητα σε βαθμό που καθορίζεται από την τιμή του ΔG . Εάν $\Delta G > 0$, η τιμή του ΔG προσδιορίζει την ενέργεια που απαιτείται για να κατευθυνθεί η αντίδραση προς την πλευρά των προϊόντων, δηλαδή του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα. Η σύνδεση συμβαίνει μόνον όταν η *συνολική* ελεύθερη ενέργεια του συστήματος ελαττώνεται. Κατά τη σύνδεση αυτή οι αλληλεπιδράσεις με τον διαλύτη (νερό) είναι εξίσου σημαντικές.

Η τιμή της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας προκύπτει ως συγκερασμός των σχετικών τιμών ενθαλπίας και εντροπίας. Η μεταβολή της ενθαλπίας, ΔH , αντανακλά την ποσότητα θερμικής ενέργειας που απαιτείται για να επιτευχθεί ένα στάδιο της αντίδρασης, και η μεταβολή της εντροπίας ΔS μετρά το πόσο εύκολα η ενέργεια αυτή μπορεί να διανεμηθεί μεταξύ πολλών μοριακών ενεργειακών καταστάσεων. Σε αντιδράσεις σύνδεσης συνήθως ισχύει $\Delta H < 0$, αντανακλώντας την τάση του συστήματος για μετάπτωση σε καταστάσεις χαμηλότερης ενέργειας με το σχηματισμό δεσμών. Αντίθετα για την εντροπία συνήθως ισχύει $\Delta S > 0$, γεγονός που αντικατοπτρίζει τη φυσική τάση για διατάραξη της τάξης, η οποία στις αντιδράσεις σύνδεσης συνήθως προκύπτει από τη διαταραχή των αλληλεπιδράσεων επιδιαλύτωσης και τη συνακόλουθη απελευθέρωση των συνδεδεμένων μορίων ύδατος, διαδικασία που ευνοείται συνήθως εντροπικά αλλά όχι ενθαλπικά.^{57,61,62,66}

Όλες οι αντιδράσεις σύνδεσης αντιμετωπίζουν αναπόφευκτες εντροπικές ποινές (entropic penalties). Αυτό συμβαίνει επειδή συμβαίνουν φαινόμενα με $\Delta S < 0$ οπότε τα φαινόμενα αυτά κάνουν πιο θετική τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας. Η πρώτη εντροπική ποινή είναι αποτέλεσμα της απώλειας βαθμών ελευθερίας της μοριακής περιστροφής και μετατόπισης, καθώς προσδέτης και υποδοχέας προσεγγίζονται για να γίνει σύμπλεξη. Τουλάχιστον έξι βαθμοί ελευθερίας χάνονται κατά το σχηματισμό του βιομοριακού συμπλόκου, λόγω περιορισμού κινήσεων μετατόπισης και περιστροφής. Αυτή η ποινή μπορεί να οδηγήσει σε κόστος ενέργειας έως +15 kcal/mol.⁶⁷⁻⁷³ Η δεύτερη εντροπική ποινή προέρχεται από τον περιορισμό της περιστροφής απλών δεσμών κατά το σχηματισμό του βιομοριακού συμπλόκου, για παράδειγμα όταν ένα φαρμακομόριο «κλειδώνει» σε μία συγκεκριμένη διαμόρφωση αφότου προσδεθεί στην κατάλληλη θέση του υποδοχέα. Το

ενεργειακό κόστος για τον περιορισμό της περιστροφής απλών δεσμών εκτιμάται περίπου σε +0.6 kcal/mol ανά δεσμό. Εκτός από τις μη ευνοϊκές εντροπικές ποινές, υπάρχει και ευνοϊκή μεταβολή εντροπίας $\Delta S > 0$ που προκύπτει από την απομάκρυνση μορίων νερού από την περιοχή πρόσδεσης στο διάλυμα (επιδιαλύτωση) κατά τη μεταφορά και τη σύνδεση του φαρμακομορίου στην περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα.⁷⁴

Εκτός από τις εντροπικές ποινές, υπάρχουν και ενθαλπικές ποινές. Η ενθαλπία σύνδεσης είναι συνισταμένη δύο αντίθετων συνιστωσών: ευνοϊκή ενθαλπία από ελκτικές μη ομοιοπολικές δυνάμεις, και μη ευνοϊκή ενθαλπία από την επιδιαλύτωση πολικών ομάδων που η συμμετοχή τους είναι απαραίτητη στις αλληλεπιδράσεις σύνδεσης. Η ποινή της ενθαλπίας επιδιαλύτωσης πολικών ομάδων είναι πολύ σημαντική και θεωρείται η κύρια συνιστώσα της ενθαλπίας σύνδεσης, καθώς εκτιμάται στα 30-40 KJ/mol στους 25°C.⁷⁵

Το ενεργειακό κόστος από αυτές τις αναπόφευκτες ποινές πρέπει να αντισταθμιστεί και να ξεπεραστεί από άλλες, ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις, προκειμένου να επιτευχθεί η πρόσδεση. Αυτό αποτελεί βασική θεώρηση στο σχεδιασμό φαρμακομορίων.⁵⁷ Η αύξηση της εντροπίας σύνδεσης είναι σχετικά απλή καθώς επιτυγχάνεται με την προσθήκη υδρόφοβων ομάδων στα υποψήφια φαρμακομόρια. Όμως υπάρχει ένα όριο στη βελτιστοποίηση μέσω αύξησης του υδρόφοβου χαρακτήρα, καθώς τα μόρια μπορούν να γίνουν δυσδιάλυτα οπότε παύουν να θεωρούνται υποψήφια φαρμακομόρια.^{76,77} Η ενθαλπία είναι πολύ πιο δύσκολο να βελτιστοποιηθεί σε σχέση με την εντροπία, διότι είναι πολύ δύσκολος ο ακριβής a priori υπολογισμός ατομικών αλληλεπιδράσεων, ακόμα και για υποδοχείς γνωστής δομής.⁷⁵

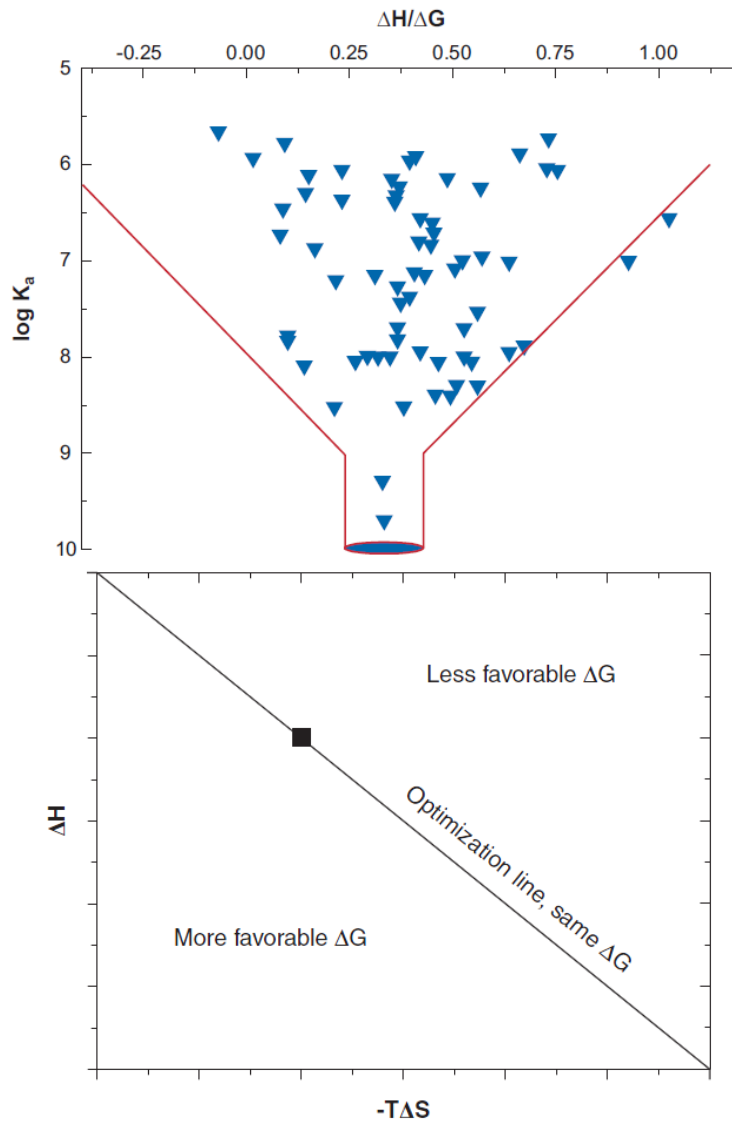
Παρόλο που θα φαινόταν εύκολο να διακριθούν ποιοτικά οι ξεχωριστές μεταβολές ενθαλπίας και εντροπίας και ο μικρός κατάλογος των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων που είναι σημαντικές στις βιολογικές αλληλεπιδράσεις συνδέσεως (δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις Van der Waals), εντούτοις είναι δύσκολο να διαχωριστούν οι αναλυτικές συνεισφορές (διατύπωση εξισώσεων) ενθαλπίας και εντροπίας στη θερμοδυναμική περιγραφή των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων.⁷⁸

Ανάλογη είναι η θεώρηση και από τους Freire et al., οι οποίοι θεωρούν τη ΔH πρόσδεσης ως μέτρο των ειδικών αλληλεπιδράσεων που προκαλούν τη σύνδεση (σχηματισμός δεσμών υδρογόνου και δυνάμεις Van der Waals). Η βέλτιστη ενθαλπία πρόσδεσης δεν συσχετίζεται απλά με τον αριθμό δοτών ή δεκτών δεσμού υδρογόνου, αλλά προκύπτει από την ποιότητα των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται εντός της θέσης σύνδεσης, σε σχέση με την ποιότητα των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ φαρμακομορίου και διαλύτη-νερού.⁷⁹⁻⁸² Η ΔS πρόσδεσης θεωρείται κυρίως

μέτρο των μη ειδικών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που εμφανίζονται κατά τη μεταφορά του φαρμακομορίου από το διάλυμα στην περιοχή πρόσδεσης όπου εκτοπίζονται πιθανώς μόρια νερού, δηλαδή θεωρείται μέτρο επιδιалύτωσης.^{76,82,83} Αφετηρία αυτής της οπτικής είναι η διαπίστωση ότι πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί τιμών ΔH και $T\Delta S$ μπορούν να δώσουν την ίδια τιμή ΔG . Παρολαυτά, οι εντροπικά ή ενθαλπικά βελτιστοποιημένοι προσδέτες μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό εξειδίκευσης ή διαφορετικές φαρμακολογικές ιδιότητες, παρά το γεγονός πως η αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα έχει τη ίδια τιμή ΔG .

Το παραγόμενο συμπέρασμα από τις μελέτες των Freire et al. είναι πως για την επίτευξη υψηλής συγγένειας σύνδεσης απαιτείται ευνοϊκή ενθαλπία πρόσδεσης. Ως εκ τούτου, η βελτιστοποίηση της ενθαλπίας πρόσδεσης αναδεικνύεται ως βασική αρχή στο σχεδιασμό φαρμακομορίων. Μολαταύτα, για την επίτευξη βέλτιστων αλληλεπιδράσεων σύνδεσης, είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψιν και ο εντροπικός παράγοντας. Οι ευνοϊκές εντροπίες σύνδεσης και επιδιалύτωσης πρέπει να μεγιστοποιηθούν, ενώ οι μη-ευνοϊκές εντροπίες διαμόρφωσης πρέπει να ελαχιστοποιηθούν.

Η σύλληψη της «ενθαλπικής χοάνης» (σχ. 3.6) ως φίλτρου, αναπτύχθηκε για να αξιολογηθεί το θερμοδυναμικό προφίλ της σύνδεσης σε κάθε στάδιο της διαδικασίας ανάπτυξης φαρμακομορίων: η ενθαλπική συνεισφορά προς τη συνολική ελεύθερη ενέργεια ($\Delta H/\Delta G$) καταγράφεται ως συνάρτηση με το λογάριθμο της σταθεράς σύνδεσης ($\log K_a$) που εκφράζει τη συγγένεια προσδέτη-υποδοχέα. Τα μόρια χαμηλής συγγένειας εμφανίζονται στο πάνω μέρος της χοάνης, όπου το φάσμα των δυνατών συνδυασμών ενθαλπίας/εντροπίας είναι ευρύτερο (άρα και ο λόγος πολικών/υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων), ενώ καθώς η χοάνη στενεύει, η συγγένεια αυξάνεται λόγω πιο ειδικών θερμοδυναμικών ποσοτήτων (ΔH , ΔG) που σχετίζονται με τη φύση του υποδοχέα που μελετάται.^{57,76}



Σχήμα 3.6: Α)⁵⁷ Αριστερά, η «ενθαλπική χοάνη». Β)⁸⁴ Δεξιά, το «θερμοδυναμικό διάγραμμα βελτιστοποίησης».

Οι Freire et al. επέκτειναν την εφαρμογή της θερμοδυναμικής στρατηγικής βελτιστοποίησης μέσω της κατασκευής ενός «θερμοδυναμικού διαγράμματος βελτιστοποίησης» (σχ. 3.6). Σε αυτό, τα υποψήφια προς βελτιστοποίηση φαρμακομόρια χαρακτηρίζονται θερμοδομετρικά και σχεδιάζεται ένα διάγραμμα με τη ΔH στον άξονα y και τη $-T\Delta S$ στον άξονα x. Μετά από κάθε χημική τροποποίηση των υποψήφιων μορίων, επαναλαμβάνεται ο θερμοδυναμικός χαρακτηρισμός, και προστίθεται ένα νέο σημείο στο διάγραμμα. Ενώσεις με την ίδια ΔG με την ένωση-οδηγό θα εμφανιστούν πάνω στη γραμμή βελτιστοποίησης, αυτές που έχουν μεγαλύτερη ΔG (πιο θετική => μικρότερη συγγένεια) από την ένωση οδηγό εμφανίζονται πάνω από τη γραμμή, ενώ οι ενώσεις με μικρότερη ΔG (πιο αρνητική => μεγαλύτερη συγγένεια) θα εμφανίζονται κάτω από τη γραμμή.^{84,85}

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ

4.1 Γενικά

Για την περιγραφή της δυναμικής του συστήματος, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής βασίζονται στην κλασική μηχανική και για τον υπολογισμό τους, ολοκληρώνεται η εξίσωση του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα χρησιμοποιώντας συνήθως μια συνάρτηση δυναμικής ενέργειας ενός πεδίου δυνάμεων για το σύστημα και δίνοντας αρχικές ταχύτητες στο σύστημα. Παράγονται έτσι πληροφορίες για το σύστημα σε μικροσκοπικό επίπεδο. Στη συνέχεια, οι μικροσκοπικές ιδιότητες συνδέονται με παρατηρούμενες μακροσκοπικές ιδιότητες μέσω της στατιστικής μηχανικής.

Η μεγάλη πλειονότητα των πειραματικών τεχνικών μετρούν μοριακές ιδιότητες όχι σε ένα μόνο μόριο, αλλά ως μέσες τιμές σε μακροσκοπικά δείγματα. Αυτές μπορεί να είναι χρονικές μέσες τιμές ή μέσες τιμές συνόλων (*ensembles*) ή και τα δύο. Η μοριακή δυναμική παράγει χρονικές μέσες τιμές στατιστικού συνόλου.

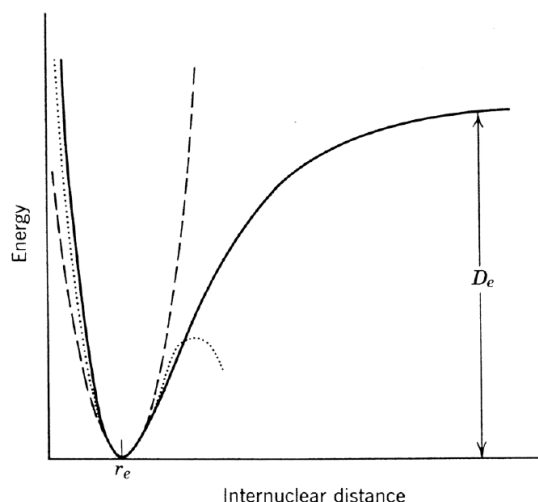
4.2 Μοριακή μηχανική - Πεδίο δυνάμεων

4.2.1 Γενικά

Η μέθοδος της μοριακής μηχανικής ή πεδίου δυνάμεων χρησιμοποιεί εξισώσεις της κλασικής μηχανικής για τον υπολογισμό της εσωτερικής ενέργειας μορίου που οφείλεται στην τάση, κάμψη και περιστροφή των δεσμών. Με την περιγραφή αυτή τα ηλεκτρόνια αγνοούνται. Ευνοείται όμως η χρήση απλών εκφράσεων για την περιγραφή της αλληλεπίδρασης ατόμων που δε συνδέονται μέσω δεσμού, οπότε απέχουν τουλάχιστον δύο δεσμούς μεταξύ τους, όπως εκείνων των ελκτικών ή απωστικών δυνάμεων van der Waals και των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την τελική γεωμετρία του μορίου.

Πράγματι, το απλούστερο πρότυπο για την περιγραφή των μορίων είναι τα άτομα να θεωρηθούν ως σφαίρες χαρακτηριστικής ακτίνας και οι δεσμοί μεταξύ τους ως ελατήρια. Η δυναμική ενέργεια που καταναλώνεται για την παραμόρφωση του δεσμού από την τιμή ισορροπίας δίνεται από με το νόμο του Hooke για ένα ελατήριο, καθώς που περιλαμβάνει το γινόμενο της σταθεράς και του τετραγώνου της παραμόρφωσης του μήκους δεσμού.

$$U(r) = \frac{1}{2}k_{AB}(r_{AB} - r_{AB,eq})^2 \quad (4.1)$$



Σχήμα 4.1⁸⁶: Καμπύλη μεταβολής της δυναμικής ενέργειας $U(r)$ σε συνάρτηση με τη διαπυρηνική απόσταση και η προσεγγιστική καμπύλη δυναμικού αρμονικού ταλαντωτή με διακεκομμένη γραμμή.

4.2.2 Πεδίο δυνάμεων

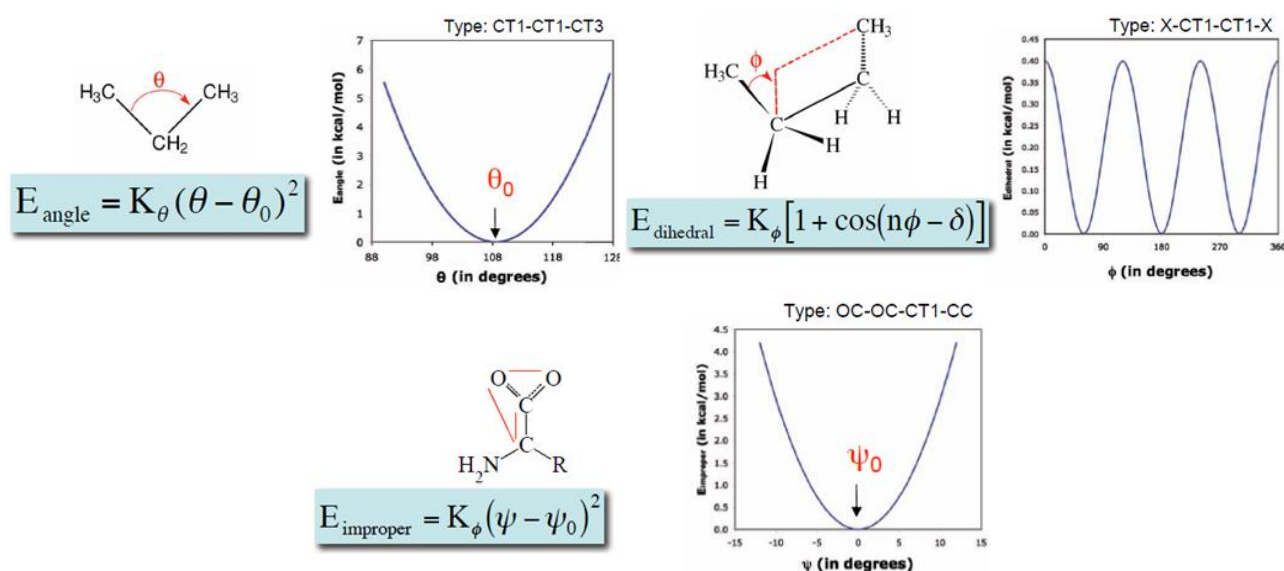
Η δυναμική ενέργεια πεδίου δυνάμεων ή ολική στερική ενέργεια V_{MM} είναι μέτρο της ενδομοριακής τάσης σε σχέση με ένα υποθετικό μόριο με πρότυπη γεωμετρία. Η V_{MM} μπορεί να υπολογιστεί, όπως φαίνεται από την εξίσωση (4.2), αθροίζοντας τις επιμέρους ενέργειες που απαιτούνται για την παραμόρφωση όλων των μήκων δεσμών, γωνιών δεσμών και διεδρών γωνιών, που συνιστούν την ενέργεια τάσης V_{strain} (*strain energy*) και τις ενέργειες των αλληλεπιδράσεων van der Waals και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των όλων των ατόμων του μορίου, που συνιστούν τη μη δεσμική ενέργεια V_{nb} .

$$\begin{aligned}
 V_{MM} &= V_{strain} + V_{nb} = (V_{stretch} + V_{bend} + V_{torsn} + V_{imp}) + (V_{vdW} + V_{el}) + \dots \\
 &= \left(\sum_i^{r \text{ bonds}} U_r + \sum_i^{s \text{ angles}} U_\theta + \sum_i^{t \text{ dihedrals}} U_\phi + \sum_i^{z \text{ impropers}} U_\psi \right) + \sum_i^{N \text{ atoms}} U_{vdW} \\
 &\quad + \sum_i^{N \text{ atoms}} U_{el} + \dots \quad (4.2)
 \end{aligned}$$

Για τον υπολογισμό των παραπάνω όρων χρησιμοποιούνται κατάλληλες μαθηματικές εκφράσεις και παράμετροι, όπως για που συνιστούν το **πεδίο δυνάμεων**.^{87,88} Ένα πεδίο δυνάμεων δηλαδή περιλαμβάνει μια βάση δεδομένων η οποία αποτελείται από παραμέτρους, όπως μήκη δεσμών, γωνίες δεσμών και διεδρες γωνίες, δυναμικές σταθερές, ατομικά μερικά φορτία, ακτίνες,

θερμοχημικά δεδομένα κλπ και κατάλληλες συναρτησιακές μορφές για τον υπολογισμό των διαφόρων ενεργειακών όρων που συνεισφέρουν στην ολική δυναμική ενέργεια. Η διατύπωση των παραμέτρων ενός πεδίου δυνάμεων βασίζεται σε δεδομένα αναφοράς που μπορεί να είναι αποτελέσματα πειραματικών διατάξεων ή κβαντομηχανικών υπολογισμών. Η πιστότητα του παραγόμενου πεδίου δυνάμεων στη συνέχεια ελέγχεται με αναπαραγωγή δομικών, δυναμικών και θερμοδυναμικών ιδιοτήτων μικρών μορίων που έχουν ήδη χαρακτηριστεί πειραματικά. Οι μαθηματικές εκφράσεις και παράμετροι διαφοροποιούνται μεταξύ των διαφορετικών πεδίων δυνάμεων που έχουν διατυπωθεί

Κατ' αναλογία με τη συνάρτηση μήκους δεσμού 4.1, για τις γωνίες προκύπτουν οι τύποι του σχήματος 4.2:



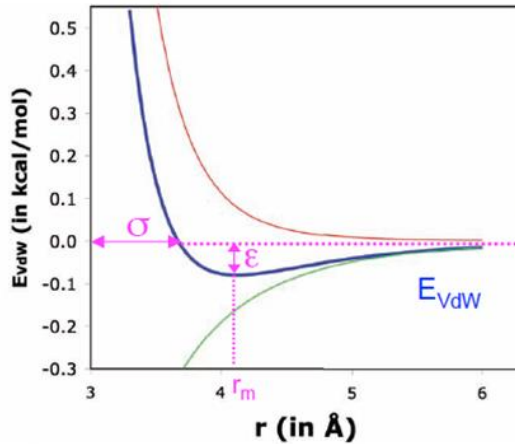
Σχήμα 4.2⁸⁹: Συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας για τις γωνίες δεσμών θ , τις κανονικές διεδρες γωνίες ϕ και τις μη κανονικές διεδρες γωνίες ψ .

Η δυναμική ενέργεια των αλληλεπιδράσεων van der Waals συνηθέστερα υπολογίζεται με το δυναμικό Lennard-Jones⁹⁰⁻⁹² σύμφωνα με τον τύπο του σχήματος 4.3 (για αλληλεπιδράσεις μεταξύ 2 ατόμων):

$$E_{\text{vdw}} = 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] = \varepsilon \left[\left(\frac{r_m}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r} \right)^6 \right]$$

σ : διάμετρος σύγκρουσης
 ε : βάθος φρέατος δυναμικού
 r_m : απόσταση στο min $r_m = 2^{1/6} \sigma$

Για 2 διαφορετικά άτομα i, j : $r_m = r_{m,i} + r_{m,j}$ $\varepsilon = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j}$



Απώσεις Pauli $\propto \frac{1}{r^{12}}$

Ελξεις επαγόμενων διπόλων $\propto -\frac{1}{r^6}$

Σχήμα 4.3⁸⁹: Δυναμικό Lennard-Jones. Η διάμετρος σύγκρουσης σ είναι η απόσταση για την οποία η τάση μεταξύ των ατόμων είναι μηδενική. Το βάθος φρέατος δυναμικού ε , εκφράζει το τοπικό ελάχιστο της δυναμικής ενέργειας. Η r είναι η απόσταση μεταξύ των ατόμων και r_m είναι η απόσταση για την οποία η δυναμική ενέργεια είναι ελάχιστη, και ορίζεται ως $2^{1/6} \sigma$. Σε $r = r_m = E_{\text{vdw}} = -\varepsilon$.

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να υπολογιστούν με το νόμο του Coulomb – εκτενέστερη αναφορά στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις θα ακολουθήσει παρακάτω.

$$U_{el} = \frac{q_i q_j}{4\pi \varepsilon_0 \varepsilon r_{ij}} \quad (4.3)$$

Υπάρχουν μη-δεσμικές αλληλεπιδράσεις που συχνά αναφέρονται ως ιδιαίτερες (πχ δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβη σύνδεση κλπ), αλλά αποτελούν συνήθως αποτέλεσμα των δύο αλληλεπιδράσεων που περιγράφηκαν προηγουμένως, δηλαδή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και των αλληλεπιδράσεων van der Waals.

Μετά την ελαχιστοποίηση της ενέργειας με τη βοήθεια του κατάλληλου αλγορίθμου στη δομή χαμηλότερης ενέργειας που προκύπτει, παρατηρείται παραμόρφωση γωνιών δεσμού, δίεδρων γωνιών και μηκών δεσμών, δηλαδή η απόκλιση από τις τιμές ισορροπίας r_{eq} , θ_{eq} , φ_{eq} , ψ_{eq} . Ως αποτέλεσμα, η αντίστοιχη τιμή της δυναμικής ενέργειας αυξάνεται, όμως οι στερικές ή γενικότερα οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις μειώνονται με αποτέλεσμα την ελάττωση της συνολικής ενέργειας.

Η γεωμετρία του μορίου, η οποία αντιστοιχεί στο ενεργειακό ελάχιστο, το οποίο καθορίζεται από τα μήκη δεσμών r , τις γωνίες δεσμών θ , τις κανονικές δίεδρες γωνίες φ και τις μη-κανονικές δίεδρες

γωνίες ψ (σχήμα 4.2) είναι διαφορετική από εκείνη της πρότυπης γεωμετρίας ή γεωμετρίας αναφοράς, που καθορίζεται από τις τιμές ισορροπίας των γεωμετρικών στοιχείων του (r_{eq} , θ_{eq} , φ_{eq} , ψ_{eq}). Οι τελευταίες τιμές αντιστοιχούν στη γεωμετρία θεμελιώδους κατάστασης μικρών – προτύπων μορίων που προκύπτουν πειραματικά ή από ακριβείς *ab initio* κβαντομηχανικούς υπολογισμούς.

Η μέθοδος της μοριακής μηχανικής δεν υπολογίζει δηλαδή την απόλυτη τιμή δυναμικής ενέργειας, αλλά τη διαφορά δυναμικής ενέργειας μεταξύ της γεωμετρίας χαμηλής ενέργειας και της πρότυπης γεωμετρίας. Η μέθοδος της μοριακής μηχανικής δεν υπολογίζει την απόλυτη τιμή δυναμικής ενέργειας, αλλά τη διαφορά δυναμικής ενέργειας μεταξύ της γεωμετρίας χαμηλής ενέργειας και της πρότυπης γεωμετρίας. Αυτή είναι η ενέργεια πεδίου δυνάμεων, V_{MM} .

Κατά την εφαρμογή ενός πεδίου δυνάμεων οι εκφράσεις των ενεργειακών συνιστωσών που περιγράφηκαν εφαρμόζονται μέσω των κατάλληλων παραμέτρων σε όλες τις ομάδες ατόμων ενός μορίου. Οι ομάδες αυτές είναι όμοιες μεταξύ των διαφόρων μορίων οπότε οι παράμετροι έχουν παρόμοια τιμή. Η μεταβιβασιμότητα παραμέτρων είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό του πεδίου δυνάμεων επειδή επιτρέπει ένα σύνολο παραμέτρων που αναπτύχθηκαν και ελέγχθησαν για ένα μικρό σχετικά αριθμό μορίων να μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα μεγαλύτερο εύρος ενώσεων. Παρολαυτά, ένα πεδίο δυνάμεων περιλαμβάνει συγκεκριμένους ατομικούς τύπους και παραμέτρους, δηλαδή συγκεκριμένα άτομα και τρόπους σύνδεσης μεταξύ τους, άρα εφαρμόζεται μόνο σε συγκεκριμένες κατηγορίες ενώσεων.

4.3 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας ή Βελτιστοποίηση Γεωμετρίας

Στους υπολογισμούς Μοριακής Μηχανικής παράγεται μια αρχική μοριακή γεωμετρία $\mathbf{q}^{(k)}$, στην οποία τα μήκη δεσμών, οι γωνίες δεσμών καθώς και οι δίεδρες γωνίες λαμβάνουν τις τιμές r_{eq} , θ_{eq} , φ_{eq} , ψ_{eq} , από τη βάση δεδομένων του πεδίου δυνάμεων. Για αυτήν τη δομή \mathbf{A} και για οποιαδήποτε άλλη μπορεί να υπολογιστεί μια τιμή στερικής ενέργειας U_{MM} σύμφωνα με την εξίσωση (4.2), με εφαρμογή των εξισώσεων που περιγράφουν τις συνιστώσες της. Για το σημείο A η τιμή της U_{strain} είναι μηδενική, αλλά ο όρος U_{nb} είναι συνήθως πολύ μεγάλος λόγω των έντονων μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων.

Η μεταβολή των 3M-6 εσωτερικών συντεταγμένων (r , θ , φ) είναι επιθυμητή ώστε να προκύψει το τοπικό ελάχιστο \mathbf{M} , στο οποίο ενώ θα αυξηθεί η U_{strain} , ο όρος των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων U_{nb} θα ελαττωθεί τόσο ώστε να επέλθει ελαχιστοποίηση της U_{MM} .

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας ή η βελτιστοποίηση της γεωμετρίας πραγματοποιείται με χρήση κατάλληλων αλγορίθμων. Ο αλγόριθμος ελαχιστοποίησης της ενέργειας μεταβάλλει τις συντεταγμένες του μορίου και η U_{MM} υπολογίζεται εκ νέου για κάθε τροποποίηση. Η τροποποίηση των συντεταγμένων γίνεται προς την κατεύθυνση της ελαχιστοποίησης της ενέργειας U_{MM} . Με αυτές τις τροποποιήσεις πραγματοποιούνται μικρές μεταβολές των διέδρων γωνιών καθώς και μήκη και γωνίες δεσμών, που οδηγούν σε σταδιακή μείωση της ενέργειας.

Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης οδηγούν στην εύρεση των τοπικών ακρότατων της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας (Potential Energy Surface – PES). Για αυτό εξετάζεται το διάνυσμα $gradU$, που για το σημείο k δίνεται από την εξίσωση (4.4).

$$gradU^{(k)} = \frac{\partial U^{(k)}}{\partial q_1^{(k)}} e_1 + \dots + \frac{\partial U^{(k)}}{\partial q_n^{(k)}} e_n \quad (4.4)$$

όπου q_i οι $3M-6$ συντεταγμένες ή οι $3M$ καρτεσιανές συντεταγμένες.

Σε ακρότατο $\mathbf{q}^{(k)}$ η πρώτη παράγωγος ως προς κάθε συντεταγμένη είναι μηδέν, οπότε και το διάνυσμα είναι μηδενικό.

Η βελτιστοποίηση της γεωμετρίας γίνεται αρχικά με έναν αλγόριθμο πρώτης παραγώγου που μελετά την κλίση της καμπύλης της δυναμικής ενέργειας. Όταν η ενέργεια δε μειώνεται περαιτέρω, δηλαδή η ενέργεια συγκλίνει σε μία τιμή, η δομή αντιστοιχεί σε ένα ακρότατο. Αν με την εφαρμογή ενός αλγορίθμου δεύτερης παραγώγου, ο οποίος μελετά την κυρτότητα της καμπύλης δυναμικής ενέργειας, υπάρχει σύγκλιση σε μία τιμή, τότε η μελετώμενη διαμόρφωση αντιστοιχεί σε τοπικό ελάχιστο ή σημείο καμπής. Για τη διάκριση από τα σημεία καμπής θα πρέπει να μελετηθούν τα πρόσημα όλων των $\frac{\partial^2 U^{(k+1)}}{\partial q_i \partial q_j^{(k+1)}}$.

4.4 Βασικά χαρακτηριστικά προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

4.4.1 Χώρος φάσης και τροχιά - Μέσες τιμές

Σύμφωνα με την κλασική μηχανική, η κατάσταση ενός συστήματος μπορεί να προσδιοριστεί πλήρως αν είναι γνωστές οι τρεις συντεταγμένες θέσης και οι τρεις συνιστώσες της ορμής για καθένα από τα N σωματίδιά του. Αν ένα μοριακό σύστημα αποτελείται από N άτομα, ο χώρος των $6N$ μεταβλητών χαρακτηρίζεται ως **χώρος φάσης** του μοριακού συστήματος. Ένα σημείο \mathbf{X} αυτού

του χώρου περιγράφει τη μικροσκοπική η μηχανική κατάσταση του συστήματος σε μια τυχαία χρονική στιγμή, όπως εκφράζει η εξίσωση (4.5)

$$(\mathbf{X})(t) = (\mathbf{q}(t), \mathbf{p}(t)) \quad (4.5)$$

$$\mathbf{q} = (x_1, y_1, z_1, \dots, x_N, y_N, z_N), \quad \mathbf{p} = (x_1, y_1, z_1, \dots, x_N, y_N, z_N) \quad (4.6)$$

Με την πάροδο του χρόνου και σε δεδομένη θερμοδυναμική κατάσταση, ένα μόριο ή οποιοδήποτε δυναμικό σύστημα, διατρέχει στο χώρο φάσης μια αλληλουχία διαφορετικών σημείων ή στιγμιότυπων ή απεικονίσεων $\mathbf{X}_i(\mathbf{q}_i, \mathbf{p}_i)$ ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των N ατόμων. Το σύνολο αυτών των σημείων συνιστούν μια τροχιά στο χώρο φάσης. Τα σημεία αυτά αποτελούν επίσης μέρος ενός συγκεκριμένου στατιστικού συνόλου (*ensemble*) που χαρακτηρίζεται από καθορισμένες θερμοδυναμικές συνθήκες και αποτελεί υποσύνολο του χώρου φάσης. Για παράδειγμα, το σύνολο των απεικονίσεων $\mathbf{X}_i(\mathbf{q}_i, \mathbf{p}_i)$ ενός συστήματος σε θερμοδυναμικές συνθήκες σταθερού αριθμού ατόμων N , όγκου V και θερμοκρασίας T , ονομάζεται στατιστικό σύνολο NVT ⁹³ ή κανονικό στατιστικό σύνολο.

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής συλλέγουν καταστάσεις χαμηλής ενέργειας, από το χώρο φάσης κοντά στην κατάσταση ισορροπίας του συστήματος ενώ αντίθετα καταστάσεις υψηλής ενέργειας σπάνια συλλέγονται αφού έχουν μικρό συντελεστή Boltzmann. Ενώ όμως οι καταστάσεις υψηλής ενέργειας δεν είναι τόσο σημαντικές στον υπολογισμό της εσωτερικής ενέργειας που δίνεται από το ολοκλήρωμα (4.7)

$$U = \langle U \rangle = \iint E(\mathbf{q}, \mathbf{p}) P(\mathbf{q}, \mathbf{p}) d\mathbf{q} d\mathbf{p} \quad (4.7)$$

είναι πολύ σημαντικές στον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας εξαιτίας της εκθετικής μορφής της ενέργειας στην ολοκληρωτέα ποσότητα παρά το γεγονός του χαμηλού συντελεστή Boltzmann για τις περιοχές υψηλής ενέργειας (4.8)

$$A = \langle A \rangle = k_B T \ln \iint \exp \left[\frac{E(\mathbf{q}, \mathbf{p})}{k_B T} \right] P(\mathbf{q}, \mathbf{p}) d\mathbf{q} d\mathbf{p} = k_B T \ln \left\langle \exp \left[\frac{E(\mathbf{q}, \mathbf{p})}{k_B T} \right] \right\rangle \quad (4.8)$$

όπου U η εσωτερική ενέργεια και A η ελεύθερη ενέργεια κατά Helmholtz του συστήματος.

Οι προσομοιώσεις αυτές προσεγγίζουν με ακρίβεια ιδιότητες όπως η εσωτερική ενέργεια, η θερμοχωρητικότητα, κ.λπ. Ο υπολογισμός των ιδιοτήτων αυτών αποτελεί υπόθεση ρουτίνας για τις προσομοιώσεις MD, σε αντίθεση με ιδιότητες όπως της ελεύθερης ενέργειας ή της εντροπίας που απαιτείται εφαρμογή ιδιαίτερων τεχνικών.

4.4.2 Υπολογισμός της τροχιάς

Η μέθοδος της MD χρησιμοποιεί το δεύτερο νόμο του Νεύτωνα. Ο υπολογισμός της δύναμης F που ασκείται σε ένα άτομο i εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του με το υπόλοιπο σύστημα, σε κάθε χρονικό βήμα της προσομοίωσης, ορίζει τη μεταβολή της θέσης του στο χώρο. Για να υπολογιστεί η F_i χρησιμοποιείται η δυναμική ενέργεια.

$$F_i = m_i \ddot{r}_i = -\nabla_{r_i} U(r_1, \dots, r_N) = -\left(\frac{\partial U}{\partial x_i}, \frac{\partial U}{\partial y_i}, \frac{\partial U}{\partial z_i}\right) \quad (4.9)$$

βλ. εξίσωση (4.8). Όπως φαίνεται και από την εξισώσεις (4.9) και (4.10), η μάζα κάθε ατόμου i συσχετίζεται με την επιτάχυνση του μοριακού συστήματος N ατόμων.

$$\frac{d\mathbf{p}_i(t)}{dt} = \frac{\partial V(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad (4.10)$$

$$\frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = -\frac{1}{m_i} \frac{\partial V(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad (4.11)$$

Η ολοκλήρωση των εξισώσεων του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα για κάθε άτομο παράγει μια ομάδα διαδοχικών ταχυτήτων και συντεταγμένων θέσης, οι οποίες περιγράφουν τις ατομικές κινήσεις με την πάροδο του χρόνου ή αλλιώς την τροχιά του μοριακού συστήματος. Οι φυσικές συνθήκες των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής είναι το στατιστικό σύνολο NVE , οπότε η δειγματοληψία του χώρου φάσης γίνεται υπό σταθερή ενέργεια. Με την κατάλληλη όμως εφαρμογή θερμοστατών, οι προσομοιώσεις πραγματοποιούνται σε άλλα στατιστικά σύνολα όπως NPT , NVT .

Στα πιο ρεαλιστικά συστήματα διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, η δύναμη σε κάθε σωματίο αλλάζει κάθε φορά που το σωματίο αλλάζει θέση ή κάθε φορά που αλλάζει η θέση των άλλων σωματίων με τα οποία αλληλεπιδρά. Η ολοκλήρωση του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα για κάθε σωματίο i ενός μοριακού συστήματος N ατόμων περιγράφεται με τον πιο απλό τρόπο από τις σχέσεις (4.12) και (4.13) και (4.14)

$$\mathbf{p}_i(t_i) = \mathbf{p}_i(t_0) + \int_{t_0}^{t_i} \mathbf{a}_i(t) dt \quad (4.12)$$

$$\mathbf{q}_i(t_i) = \mathbf{q}_i(t_0) + \int_{t_0}^{t_i} \frac{\mathbf{q}_i(t)}{m} dt \quad (4.13)$$

$$\mathbf{a}_i(t) = -\frac{1}{m_i} \frac{\partial V(r_1, \dots, r_N)}{\partial r_i} \quad (4.14)$$

Στόχος της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής^{94,95} είναι η αριθμητική ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα, δηλαδή ο υπολογισμός της θέσης και της ορμής του συστήματος (ή της τροχιάς) των N ατόμων μετά από χρόνο Δt , αν είναι γνωστές οι προηγούμενες τιμές $\mathbf{q}(t)$, $\mathbf{p}(t)$ και η επιτάχυνση $\mathbf{a}(t)$, σύμφωνα με τις εξισώσεις (4.15) και (4.16)

$$\mathbf{q}(t + \Delta t) = f(\mathbf{q}(t), \mathbf{a}(t)) \quad (4.15)$$

$$\mathbf{p}(t + \Delta t) = f(\mathbf{p}(t), \mathbf{a}(t)) \quad (4.16)$$

Επειδή το δυναμικό είναι συνεχές, οι εξισώσεις της κίνησης απαιτείται να ολοκληρώνονται κατακερματίζοντας τον υπολογισμό σε σειρές πολύ μικρών βημάτων χρόνου. Υπολογίζεται η συνολική δύναμη σε κάθε άτομο στην απεικόνιση στον χρόνο t ως διανυσματικό άθροισμα από τις αλληλεπιδράσεις με άλλα άτομα. Από τις δυνάμεις υπολογίζονται οι επιταχύνσεις στα άτομα και μαζί με τα δεδομένα των τρέχουσων θέσεων και ταχυτήτων σε χρόνο t παράγονται οι νέες θέσεις και ταχύτητες σε χρόνο $t+\Delta t$. Η δύναμη σε κάθε χρονικό διάστημα Δt θεωρείται σταθερή. Οι δυνάμεις υπολογίζονται στις νέες θέσεις, οι οποίες παράγουν τις νέες τιμές θέσεων και ταχυτήτων σε χρόνο $t+2\Delta t$, κ.ο.κ. Για την ολοκλήρωση των εξισώσεων χρησιμοποιούνται κατάλληλοι αλγόριθμοι ολοκλήρωσης π.χ. ο αλγόριθμος Verlet^{91,96}, ο αλγόριθμος ταχύτητας Verlet⁹⁷ με στόχο την παραγωγή μιας σταθερής τροχιάς.

Η προσομοίωση MD παράγει την τροχιά του μοριακού συστήματος σε κάποια επιλεγμένη θερμοκρασία T και για ικανοποιητικό χρόνο, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένας ικανοποιητικός αριθμός απεικονίσεων.

Από την τροχιά που παράγεται υπολογίζονται χρονικές μέσες τιμές ιδιοτήτων, σύμφωνα με την έκφραση (4.17)

$$\langle A \rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M A(\mathbf{q}_i, \mathbf{p}_i) \quad (4.17)$$

όπου M ο αριθμός των βημάτων.

4.4.3 Υπολογισμός απλών θερμοδυναμικών ιδιοτήτων

Οι προσομοιώσεις δίνουν τη δυνατότητα υπολογισμού μιας πληθώρας ιδιοτήτων, όπως για παράδειγμα της ενέργειας, της πίεσης, της θερμοκρασίας, κ.λπ. Η σύγκριση μεταξύ πειραματικών και υπολογιστικών τιμών για τις ιδιότητες αυτές είναι ένας σημαντικός τρόπος ελέγχου ακρίβειας των αποτελεσμάτων που παράγονται από τις προσομοιώσεις. Από το παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι μέσω των προσομοιώσεων μπορούν να υπολογιστούν θερμοδυναμικές ιδιότητες για συστήματα που δεν υπάρχουν διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα ή είναι δύσκολο να μετρηθούν. Στη συνέχεια παρατίθενται οι εξισώσεις υπολογισμού για ιδιότητες που προσδιορίζονται σε ένα κανονικό στατιστικό σύνολο. Η μετατροπή σε ένα άλλο στατιστικό σύνολο είναι πάντα εφικτή μόνο στο όριο ενός απείρως μεγάλου συστήματος.

A) *Ενέργεια*: Σύμφωνα με την εξίσωση (4.18), η εσωτερική ενέργεια ενός συστήματος προσδιορίζεται ως μέσος όρος συνόλου των ενεργειών των M απεικονίσεων που εξετάζονται κατά την προσομοίωση

$$U = \langle E \rangle = \frac{1}{M} \sum_i^M E_i \quad (4.18)$$

B) *Πίεση*: Ο προσδιορισμός της πίεσης βασίζεται στο Θεώρημα Clausius και αποδεικνύεται ότι για ένα υγρό ή αέριο σύστημα N σωματιδίων, η πίεση P δίνεται από την εξίσωση (4.19)

$$P = \frac{1}{V} \left[Nk_B T - \frac{1}{3} \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N r_{ij} F_{ij} \right] \quad (4.19)$$

Η εξίσωση (3.19) μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον υπολογισμό της πίεσης σε μια προσομοίωση, ενώ οι δυνάμεις υπολογίζονται σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής.

Γ) *Θερμοκρασία*: Σε ένα κανονικό στατιστικό σύνολο NVT^{93} η θερμοκρασία είναι σταθερή, ενώ σε ένα στατιστικό σύνολο NVE^{93} κυμαίνεται. Ο προσδιορισμός της θερμοκρασίας βασίζεται στον υπολογισμό της κινητικής ενέργειας, με την οποία σχετίζεται σύμφωνα με την εξίσωση (4.20)

$$\sum_{i=1}^N \frac{|p_i(t)|^2}{2m_i} = \frac{k_B T}{2} (3N - N_C) \quad (4.20)$$

όπου \mathbf{p}_i και m_i η συνολική ορμή και η μάζα του σωματίου i .

Σύμφωνα με το Θεώρημα Ισοκατανομής της Ενέργειας κάθε βαθμός ελευθερίας συνεισφέρει $\frac{k_B T}{2}$. Για N σωμάτια, καθένα από τα οποία έχει τρεις βαθμούς ελευθερίας, η κινητική ενέργεια θα είναι ίση με $\frac{3Nk_B T}{2}$. Αν N_C ο αριθμός των τυχόν παρεμποδισμένων βαθμών ελευθερίας, τότε ο συνολικός αριθμός των βαθμών ελευθερίας είναι $(3N - N_C)$ και επειδή η συνολική ορμή του συστήματος εξαναγκάζεται να είναι μηδενική, τότε θα είναι τουλάχιστον 3.

4.4.4 Προετοιμασία και εκτέλεση προσομοίωσης μοριακής δυναμικής

Για την εκτέλεση της προσομοίωσης MD πρέπει να αποδοθεί στο σύστημα μια αρχική απεικόνιση σε συνθήκες μικροκανονικού συνόλου NVE . Οι αρχικές θέσεις $\mathbf{q}_i(t)$ λαμβάνονται από μια δομή που έχει προσδιοριστεί πειραματικά σε στερεά κατάσταση (κρυσταλλογραφία ακτίνων X) ή σε διάλυμα (φασματοσκοπία NMR) ή από ένα τοπικό ελάχιστο που προέκυψε από μια ελαχιστοποίηση ενέργειας χρησιμοποιώντας κάποιον κατάλληλο αλγόριθμο ελαχιστοποίησης και μια υπολογιστική μέθοδο.

Οι αρχικές ορμές $\mathbf{p}_i(t)$ στη συγκεκριμένη θερμοκρασία T αποδίδονται τυχαία σε κάθε άτομο, σύμφωνα με την κατανομή μοριακών ταχυτήτων Maxwell-Boltzmann, που δίνει την πιθανότητα $f(\mathbf{v}_{i,x})$ ένα άτομο i να έχει την ορμή $p_{i,x}$ στη διεύθυνση x στη θερμοκρασία T , σύμφωνα με την εξίσωση (4.21)

$$f(\mathbf{v}_{i,x}) = \exp\left[-\frac{m_i |\mathbf{v}_{i,x}|^2}{2T k_B}\right] \sqrt{\frac{m_i}{2\pi T k_B}} \quad (4.21)$$

Είναι κοινή τακτική οι ταχύτητες να ρυθμίζονται ώστε η συνολική ορμή του συστήματος να είναι μηδενική, οπότε η προσομοίωση δειγματίζει απεικονίσεις από ένα σύνολο $NVE\mathbf{p}$. Για προσομοιώσεις υπό κενό, η συνολική ορμή και στροφορμή είναι σταθερή, οπότε μπορούν να επιλεγούν αρχικά μηδενικές και να διατηρούνται έτσι καθώς το σύστημα θα διαδίδεται ενώ υπό περιοδικές συνοριακές συνθήκες (§4.5.1), διατηρείται μόνο η συνολική ορμή και μπορεί να επιλεγεί μηδενική.

Ενώ η ολική θερμοκρασία είναι σταθερή σε ένα κανονικό στατιστικό σύνολο NVT , σε ένα μικροκανονικό στατιστικό σύνολο παρουσιάζει διακυμάνσεις. Η εξίσωση (4.22) προκύπτει από την (4.20) εκφράζει τη θερμοκρασία T σε όρους μέσης κινητικής ενέργειας του συστήματος στο μικροκανονικό στατιστικό σύνολο

$$\sum_{i=1}^N \frac{|\mathbf{p}_i(t)|^2}{2m_i} = \frac{k_B T}{2} (3N - N_C) \Rightarrow$$

$$T(t) = \frac{2}{(3N - N_C)k_B T} \sum_{i=1}^N \frac{|\mathbf{p}_i(t)|^2}{2m_i} \quad (4.22)$$

όπου \mathbf{p}_i η συνολική ορμή του σωματίου i μάζας m_i και ο συνολικός αριθμός των βαθμών ελευθερίας (εξίσωση (4.20)). Επειδή συνήθως η ορμή «εξαναγκάζεται» να είναι μηδενική, συνήθως είναι , επειδή απαλείφονται τρεις βαθμοί ελευθερίας. Για προσομοιώσεις υπό κενό μπορούν να αφαιρεθούν 6 βαθμοί ελευθερίας εφόσον διατηρείται και η συνολική στροφορμή, ενώ για περιοδικές συνοριακές συνθήκες, βλ. §4.5.1, διατηρείται μόνον η συνολική ορμή σταθερή. Σε μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής μπορούν να αφαιρεθούν και άλλοι βαθμοί ελευθερίας.

Διαφορίζοντας την εξίσωση (4.14), σε κάθε σημείο t , $t+\Delta t$ υπολογίζεται η επιτάχυνση \mathbf{a}_i ή η συνολική δύναμη \mathbf{F}_i που δρα σε κάθε άτομο από την αλληλεπίδρασή του με άλλα άτομα. Με τη μέθοδο της μοριακής μηχανικής, δηλαδή την εφαρμογή ενός πεδίου δυνάμεων είναι δυνατοί οι υπολογισμοί αυτοί, οπότε η δύναμη σε ένα άτομο περιλαμβάνει συνεισφορές από όρους όπως η τάση δεσμών, γωνιών δεσμών, δίεδρων γωνιών και μη-δεσμικών αλληλεπιδράσεων. Μέσω του κανόνα της αλυσίδας πραγματοποιείται η μετατροπή των παραγώγων που περιλαμβάνουν τους παραπάνω όρους από τις εσωτερικές συντεταγμένες σε καρτεσιανές για να χρησιμοποιηθούν από τη MD. Η δύναμη μεταξύ δύο ατόμων υπολογίζεται μόνο μια φορά.

Μετά την προετοιμασία του συστήματος μπορεί να αρχίσει η προσομοίωση που έχει ως βασικά στάδια τη φάση εξισορρόπησης και παραγωγής. Αρχικά, το πρώτο στάδιο μιας προσομοίωσης MD είναι η φάση εξισορρόπησης που έχει ως σκοπό να φέρει το σύστημα σε ισορροπία ξεκινώντας από την αρχική δομή. Κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης παρακολουθούνται διάφοροι παράμετροι μαζί με τις απεικονίσεις. Όταν αυτές οι παράμετροι αποκτήσουν σταθερές τιμές, τότε μπορεί να αρχίσει η φάση παραγωγής κατά την οποία υπολογίζονται οι θερμοδυναμικές ιδιότητες και άλλα δεδομένα. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για να χαρακτηριστεί πότε το σύστημα έχει φθάσει σε ισορροπία εξαρτώνται σε κάποιο βαθμό από το σύστημα που προσομοιώνεται, αλλά γενικά περιλαμβάνουν την κινητική, δυναμική και ολική ενέργεια, τις ταχύτητες, τη θερμοκρασία και την πίεση.

Όπως αναφέρθηκε, η κινητική και δυναμική ενέργεια κυμαίνονται σε ένα μικροκανονικό στατιστικό σύνολο, αλλά η ολική ενέργεια παραμένει σταθερή. Οι συνιστώσες των ταχυτήτων περιγράφονται από μια κατανομή Maxwell-Boltzmann και η κινητική ενέργεια κατανέμεται ισοδύναμα και στις

τρεις διευθύνσεις x , y και z (Θεώρημα Κατανομής Ενέργειας). Είναι επιθυμητό η φάση εξισορρόπησης να πραγματοποιείται υπό σταθερή θερμοκρασία, π.χ. στο στατιστικό σύνολο NVT μπορεί να ρυθμίζεται η θερμοκρασία μέσω των ταχυτήτων, βλ. εξίσωση (4.22). Κατά τη διάρκεια της παραγωγής η θερμοκρασία μπορεί και να είναι μεταβλητή του συστήματος.

Όταν προσομοιώνεται ένα ανομοιογενές σύστημα είναι συνήθως επιθυμητή μια λεπτομερέστερη φάση εξισορρόπησης. Θα περιγραφεί στη συνέχεια μια πιθανή διαδικασία εξισορρόπησης που είναι κατάλληλη για μια μακρομοριακή διαλυμένη ουσία, όπως είναι μια πρωτεΐνη σε διάλυμα. Αρχικά, μόνο ο διαλύτης με τα τυχόντα αντισταθμιστικά ιόντα υποβάλλονται σε ελαχιστοποίηση ενέργειας κατά την οποία η διαλυμένη ουσία διατηρείται ακλόνητη (αμετάβλητη) στην αρχική της διαμόρφωση. Ακολουθεί ελαχιστοποίηση ενέργειας ολόκληρου του συστήματος (διαλυμένη ουσία και διαλύτης) μειώνοντας σταδιακά τους αρμονικούς περιορισμούς στη διαλυμένη ουσία (π.χ. ένα στάδιο με αρμονικό εξαναγκασμό (restraint) $50 \text{ kcal/mol}/\text{\AA}^2$ για όλα τα άτομα της διαλυμένης ουσίας και ένα στάδιο χωρίς περιορισμό). Στη συνέχεια ο διαλύτης και τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε μοριακή δυναμική ή προσομοίωση Monte Carlo αρχίζοντας με κάποιο μεγαλύτερο αρμονικό περιορισμό για τη δομή του διαλυμένου μορίου και μειώνοντας σταδιακά σε επόμενα βήματα τους αρμονικούς περιορισμούς. Δηλαδή η πρώτη φάση εξισορρόπησης πρέπει να είναι επαρκώς εκτενής ώστε να επιτρέψει στα μόρια του διαλύτη να επαναδιευθετηθούν πλήρως ως προς το πεδίο της διαλυμένης ουσίας. Η διάρκεια αυτής της πρώτης φάσης εξισορρόπησης του διαλύτη πρέπει να διαρκεί περισσότερο από το χρόνο χαλάρωσης του διαλύτη (που είναι ο χρόνος που χρειάζεται ένα μόριο για να “χάσει κάθε μνήμη” σχετικά με τον αρχικό προσανατολισμό του και για το νερό είναι περίπου 10 ps). Π.χ. προκειμένου να γίνει αυτό με την προσομοίωση μοριακής δυναμικής μπορεί να εφαρμοστούν συνολικά 200 ps σε θερμοκρασία 10 K σε NVT με τα βαριά άτομα της διαλυμένης ουσίας να υποβάλλονται σε αρμονικό περιορισμό $50 \text{ kcal/mol}/\text{\AA}^2$ και στη συνέχεια στους 310 σε NVT διατηρώντας τον αρμονικό περιορισμό $50 \text{ kcal/mol}/\text{\AA}^2$ για τα βαριά άτομα της διαλυμένης ουσίας.

Ακολουθεί εξισορρόπηση της διαλυμένης ουσίας π.χ. επιτρέποντας στην πρωτεΐνη να χαλαρώσει στον χώρο, εφαρμόζοντας κάποιους μικρότερους αρμονικούς περιορισμούς στη δομή του διαλυμένου μορίου οι οποίοι μικραίνουν σταδιακά ως αναφέρθη πιο πάνω. Π.χ. δύο στάδια προσομοίωσης NPT ένα για 1 ns με $10 \text{ kcal/mol}/\text{\AA}^2$ για όλα τα βαριά άτομα και 1 ns με $2 \text{ kcal/mol}/\text{\AA}^2$ για τα άτομα Ca της πρωτεΐνης.

Μελέτες έδειξαν ότι ξεκινώντας από ένα υπολογιστικό μοντέλο (και όχι από πειραματική δομή) η προσεκτική εξισορρόπηση της δομής πρωτεΐνης μέσω βοηθητικών προσομοιώσεων MD, με σκοπό

την μετέπειτα προσομοίωση-δειγματοληψία εκτενούς περιοχής του χώρου, έχει ως αποτέλεσμα η δομή να προσεγγίζει ή να είναι καλύτερη της αναμενόμενης πειραματικής⁹⁸.

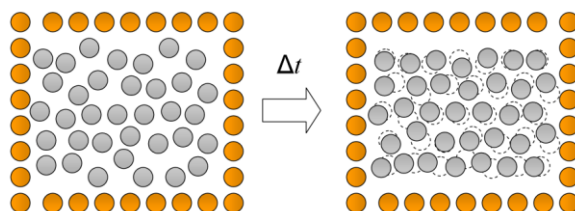
Στη φάση παραγωγής σε ένα μικροκανονικό στατιστικό σύνολο NVE οι ταχύτητες και επομένως η θερμοκρασία αποτελούν μεταβλητές του συστήματος, ενώ αν γίνει σε στατιστικό σύνολο NVT η θερμοκρασία είναι σταθερή. Διάφορες ιδιότητες υπολογίζονται και αποθηκεύονται στη φάση διάδοσης για τη μετέπειτα επεξεργασία. Είναι συνήθης επίσης, η αποθήκευση θέσεων, ενεργειών και ταχυτήτων των απεικονίσεων του συστήματος σε τακτικά χρονικά διαστήματα από τις οποίες μπορούν να υπολογιστούν άλλες ιδιότητες μετά το πέρας της προσομοίωσης.

4.5 Ρυθμίσεις κατά την προσομοίωση χημικών φαινομένων

Για την προσομοίωση και εξήγηση χημικών φαινομένων σε μεγάλα συστήματα εφαρμόζονται διάφορες ρυθμίσεις για την τήρηση σωστών συνθηκών προσομοίωσης και τον περιορισμό του υπολογιστικού κόστους.

4.5.1 Συνοριακές Συνθήκες και Αποστάσεις Αποκοπής

A) *Συνοριακές Συνθήκες*: Έστω ότι το σύστημα που θέλουμε να προσομοιώσουμε είναι ένα οργανικό μόριο μέσα σε ένα υδατικό διάλυμα. Είναι αυτονόητο ότι δεν μπορεί να υπολογιστεί ένα σύστημα με άπειρα μόρια νερού, ενώ ένα σύστημα με X μόρια νερού και 1 οργανικό μόριο σε ένα χώρο άπειρου όγκου δεν είναι ρεαλιστικό. Συνεπώς θα πρέπει ο χώρος αυτός να καταλαμβάνει σαφώς ορισμένο όγκο, περιορίζοντας την προσομοίωση με τρόπο τέτοιο ώστε να είναι ρεαλιστική και ο περιορισμός αυτός να την επηρεάζει όσο το δυνατό λιγότερο. Θα πρέπει λοιπόν να οριστεί ένα στατικό «κελί» εντός του οποίου θα πραγματοποιείται η προσομοίωση (στοχαστικές συνοριακές συνθήκες).



Σχήμα 4.4⁹⁹: Στοχαστικές συνοριακές συνθήκες. Ορίζεται ένα στατικό "κελί" του οποίου τα τοιχώματα είναι ακλόνητα, εντός του οποίου πραγματοποιείται η προσομοίωση.

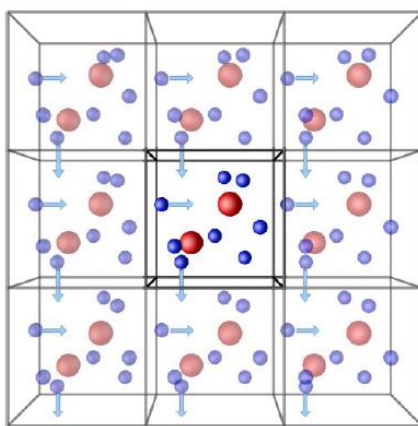
Αυτό δημιουργεί ένα νέο πρόβλημα. Αν υποθέσουμε ότι έχουμε ένα σύστημα 1000 ατόμων σε έναν κύβο $10 \times 10 \times 10 \text{ \AA}$, περίπου τα μισά θα βρίσκονται στις οριακές επιφάνειες του κύβου, και αυτό θα

έχει μεγάλη επίδραση στις ιδιότητες του συστήματος. Ακόμα και για ένα σύστημα 10^6 ατόμων, τα επιφανειακά άτομα αποτελούν περίπου το -όχι υπολογιστικά ασήμαντο- ποσοστό του 6%.¹⁰⁰

Περιβάλλοντας τον παραπάνω κύβο με αντίγραφα του εαυτού του λύνεται αυτό το πρόβλημα (περιοδικές συνοριακές συνθήκες – periodic boundary conditions, PBC). Το κεντρικό κελί προσομοιώνεται, στο περιβάλλον που προκύπτει από την επανάληψή του προς όλες τις κατευθύνσεις. Αν η τροχιά ενός ατόμου το βγάλει εκτός των ορίων του κουτιού προσομοίωσης, αυτό αντικαθίσταται από ένα σωματίο ενός περιοδικού αντιτύπου, που εισάγεται στο κουτί προσομοίωσης από την αντίθετη πλευρά (σχήμα 3.5). Με τον τρόπο αυτό οι PBC διατηρούν τη μάζα, των αριθμό των σωματιών και τη συνολική ενέργεια στο κουτί προσομοίωσης.

Η επιλογή του σχήματος του κουτιού προσομοίωσης είναι τέτοια ώστε να αντανακλά τη γεωμετρία του συστήματος. Εκτός από κύβους και ορθ.παραλληλεπίπεδα (τα συνηθέστερα), χρησιμοποιούνται και κελιά με γεωμετρία εξαγωνικού πρίσματος και ρομβικού δωδεκαέδρου.

Παρόλα αυτά απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στην εφαρμογή περιοδικών συνοριακών συνθηκών σε συστήματα που δεν είναι περιοδικά. Οι συνθήκες PBC εφαρμόζονται συνήθως π.χ. στην περιγραφή υγρών συστημάτων όταν ενδιαφέρει κυρίως η περιγραφή της διαλυμένης ουσίας που περιβάλλεται από μόρια διαλύτη (επίσης γενικά ρευστών συστημάτων π.χ. μεμβρανικές πρωτεΐνες κλπ).





Σχήμα 4.5¹⁰¹: Σχηματική αναπαράσταση της σύλληψης των Περιοδικών Συνοριακών Συνθηκών.

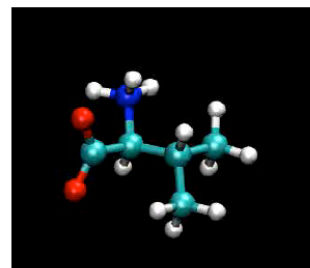
Όμως, πόσο μεγάλο πρέπει να είναι το κουτί προσομοίωσης; Η απάντηση στο ερώτημα αυτό είναι ότι το μέγεθος του κουτιού προσομοίωσης καθορίζεται με βάση την εμβέλεια των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος ή την απόσταση αποκοπής. Έτσι, οι διαστάσεις του κουτιού πρέπει να αντιστοιχούν τουλάχιστον στη μεγαλύτερη απόσταση αποκοπής, ειδάλλως κάποιες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις θα προσμετρώνται τουλάχιστον εις διπλούν, δηλαδή μια φορά εντός του κουτιού και μια φορά εντός του επόμενου περιοδικού αντιτύπου. Πρακτικά, το μέγεθος του

κουτιού πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερο από την απόσταση αποκοπής, επειδή οι αλληλεπιδράσεις είναι ενεργές, εφόσον το σύστημα θεωρείται μη περιοδικό και ομογενές. Για την προσομοίωση ενός βιομορίου σε αραιό διάλυμα, το μέγεθος του κουτιού προσομοίωσης συνίσταται να είναι τέτοιο ώστε να περιλαμβάνει το μέγεθος του μελετώμενου μορίου και επιπλέον δυο φορές τη μεγαλύτερη απόσταση αποκοπής.

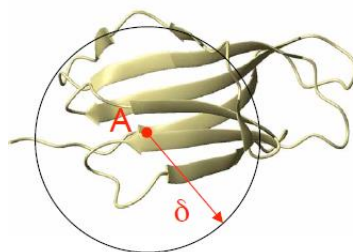
B) *Αποστάσεις αποκοπής*: Αντικειμενικά το πιο απαιτητικό από άποψης υπολογιστικού κόστους κομμάτι μιας μοριακής δυναμικής είναι ο υπολογισμός των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων στη συνάρτηση της δυναμικής ενέργειας, π.χ. οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι δυνάμεις van der Waals. Για τις αλληλεπιδράσεις van der Waals η επιλογή απόστασης αποκοπής δεν παρουσιάζει πρόβλημα, αφού το δυναμικό Lennard-Jones ελαττώνεται γρήγορα με την απομάκρυνση εξαιτίας της εξάρτησης r^{-6} της αλληλεπίδρασης διασποράς. Η τιμή που συνήθως χρησιμοποιείται για τη σχετική απόσταση αποκοπής δ ή R_c είναι μεταξύ (8 – 12) Å.

$$E = \sum_{\text{bonds}} K_b (r - r_0)^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedrals}} K_\phi [1 + \cos(n\phi - \delta)] + \sum_{\text{impropers}} K_\psi (\psi - \psi_0)^2 + \sum_{i>j} \epsilon \left[\left(\frac{r_m}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r} \right)^6 \right] + \sum_{i>j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon r}$$

Για ένα σύστημα 1500 ατόμων

 ~10⁶ ζεύγη ατόμων που αλληλεπιδρούν

 Εισαγωγή απόστασης αποκοπής (cutoff)

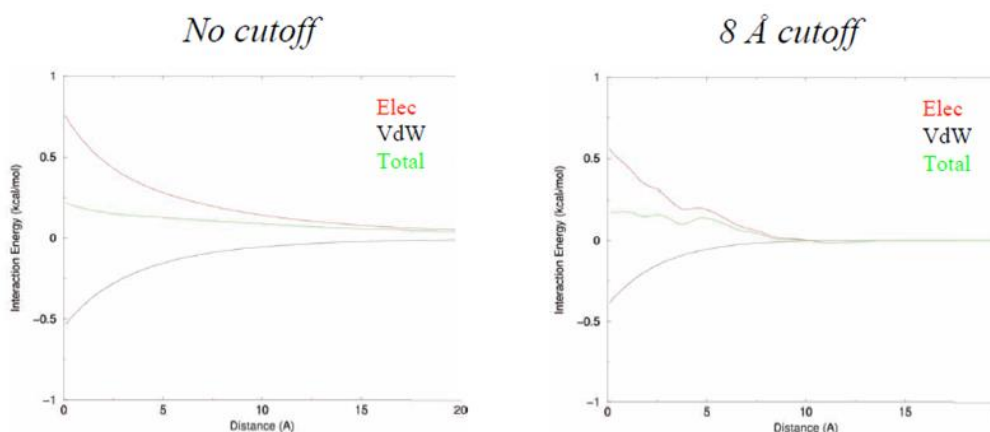


Αμινοξύ Βαλίνη, 19 άτομα. Άρα 1500 άτομα => πεπτίδιο 80 Βαλινών.



Σχήμα 4.6⁸⁹: α) Πάνω: Ο υπολογισμός των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων είναι πολύ απαιτητικός, διότι θεωρητικά πρέπει να υπολογιστούν οι αλληλεπιδράσεις όλων των ατόμων μεταξύ τους –ακόμα και αν πρακτικά κάποιες από αυτές τις αλληλεπιδράσεις είναι πολύ μικρές. Πχ για ένα πεπτίδιο 80 βαλινών, αλληλεπιδρούν θεωρητικά περίπου 10⁶ ζεύγη ατόμων, αριθμός απαγορευτικός για την εκτέλεση υπολογισμών, γεγονός που κάνει επιτακτική την εισαγωγή της απόστασης αποκοπής. β) Κάτω: Απόσταση αποκοπής: Για ένα άτομο A, μόνο οι μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις με άτομα σε απόσταση δ Å υπολογίζονται.

Ωστόσο για τις μακράς εμβέλειας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, η απόσταση αποκοπής πρέπει να είναι πολύ μεγαλύτερη. Ενώ συνήθως ως ελάχιστη τιμή χρησιμοποιείται $R_c = 10 \text{ \AA}$, υπάρχει η αντίληψη ότι οποιαδήποτε απόσταση αποκοπής θα οδηγήσει σε σφάλμα. Έχει λοιπόν προταθεί, ότι κατά την προσομοίωση πρωτεϊνών, λιπιδικών μεμβρανών, κ.λπ, η απόσταση αποκοπής να είναι τουλάχιστον 15 – 16 \AA .



Σχήμα 4.7⁸⁹: Επίδραση της απόστασης αποκοπής στη μη-δεσμική δυναμική ενέργεια συναρτήσει της απόστασης.

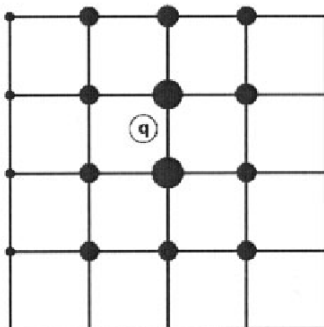
Επειδή η αποκοπή της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης επιφέρει ασυνέχειες στη δυναμική ενέργεια στην περιοχή κοντά στην απόσταση αποκοπής, έχουν προταθεί ρυθμιστικές συναρτήσεις για αποκοπή με βάση το άτομο ή την ομάδα, σε λογισμικά όπως το Gromacs ή το Gromos.¹⁰²

Γ) Τεχνικές υπολογισμού των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων: Εξαιτίας του μεγάλου υπολογιστικού κόστους για τον υπολογισμό των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων κατά Coulomb με την παράλειψή τους, π.χ. χρησιμοποιώντας απόσταση αποκοπής $R_c \sim 10 \text{ \AA}$, το υπολογιστικό κόστος μειώνεται.

Παρόλα αυτά, η χρήση της αποκοπής των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων δεν είναι απαραίτητο ότι μειώνει εντυπωσιακά το χρόνο υπολογισμού και αυτό γιατί για κάθε ζεύγος ατόμων πρέπει να κριθεί αν είναι αναγκαίος ο υπολογισμός των ενεργειών αλληλεπίδρασης. Έτσι, ο υπολογισμός $N(N - 1)$ αποστάσεων απαιτεί ισοδύναμο χρόνο με αυτόν που απαιτεί ο υπολογισμός της ενέργειας.

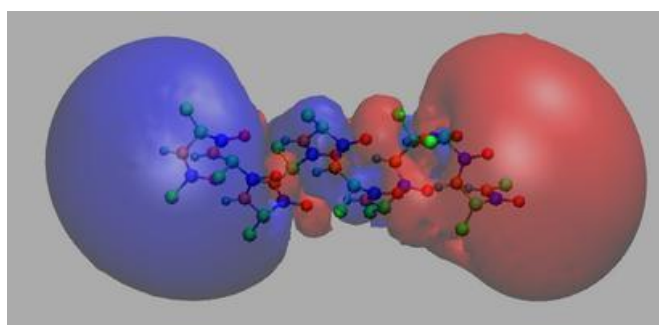
Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τον αποδοτικό υπολογισμό ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, όπως είναι η μέθοδος αθροισμάτων Ewald (Ewald method for lattice summations), η μέθοδος πεδίου αντίδρασης (reaction field method), ενώ για τον υπολογισμό των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων ο ταχύς αλγόριθμος πολύπολου (fast multipole algorithm).¹⁰³

Η άθροιση Ewald¹⁰⁴ είναι μια δημοφιλής τεχνική υπολογισμού μια περιγραφή των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μακράς εμβέλειας για ένα σύστημα με περιοδικές συνοριακές συνθήκες. Το άθροισμα άπειρων αλληλεπιδράσεων φορτίου-φορτίου για ένα ουδέτερο σύστημα μπορεί να συγκλίνει υπό όρους και αυτό σημαίνει ότι το αποτέλεσμα της άθροισης εξαρτάται από τη σειρά με την οποία αθροίζονται οι αλληλεπιδράσεις. Η άθροιση Ewald καθορίζει τη σειρά ως εξής¹⁰⁵: 1) άθροισμα σε κάθε κουτί 2) άθροισμα σφαιρών που περικλείουν κουτιά, με ολοένα μεγαλύτερες ακτίνες. Η άθροιση Ewald θεωρείται πιο αξιόπιστη από ένα σύστημα αποκοπής¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.



Σχήμα 4.8¹⁰⁹: Στο PME, ένα σημειακό φορτίο (συμβολίζεται με ένα άδειο κύκλο με ετικέτα "Q" στο σχήμα) κατανέμεται στους κόμβους πλέγματος, με συναρτήσεις στάθμησης που επιλέγονται ανάλογα με την απόσταση των αντίστοιχων κόμβων από τη θέση του φορτίου. Η τοποθέτηση όλων των φορτίων σε ένα πλέγμα επιτρέπει την εφαρμογή μετασχηματισμού Fourier και μειώνει σημαντικά το χρόνο υπολογισμού. Σε πραγματικές εφαρμογές, το πλέγμα είναι τρισδιάστατο.

Το πλέγμα σωματιδίων Ewald (particle-mesh Ewald – PME) είναι μια γρήγορη αριθμητική μέθοδος για υπολογισμό του αθροίσματος Ewald που περιλαμβάνει μετασχηματισμό Fourier. Το κόστος της μεθόδου PME είναι ανάλογο με $N \log N$ (όπου N = αριθμός φορτίων του συστήματος) και η μείωση του χρόνου είναι σημαντική ακόμη και για ένα μικρό σύστημα αρκετών εκατοντάδων ατόμων. Το PME χρησιμοποιεί ένα σχήμα παρεμβολής για τη διανομή των φορτίων που βρίσκονται οπουδήποτε στον πραγματικό χώρο, στους κόμβους ενός ενιαίου πλέγματος^{110,111}.



Σχήμα 4.9¹⁰⁹: Ηλεκτροστατικό δυναμικό πεπτιδίου δεκαλανίνης υπό κενό όπως υπολογίζεται με το εργαλείο PME που διατίθεται στο λογισμικό VMD. Τα άτομα είναι χρωματισμένα ανάλογα με το φορτίο τους (τα μπλε είναι θετικά φορτισμένα, τα κόκκινα είναι αρνητικά).

Δ) *Προσομοίωση επίδρασης του νερού*: Η επίδραση του διαλύτη σε μια προσομοίωση είναι προτιμότερο να περιγραφεί με ρητή ή ατομιστική αναπαράσταση του κάθε μορίου (*explicit solvent*). Το απλούστερο μοντέλο ατομιστικής περιγραφής των μορίων του διαλύτη βασίζεται στη μοριακή μηχανική. Αναμφισβήτητα ο πιο σημαντικός διαλύτης είναι το νερό και για το λόγο αυτό ο μεγαλύτερος αριθμός προτύπων MM που έχει διατυπωθεί περιγράφει το νερό.

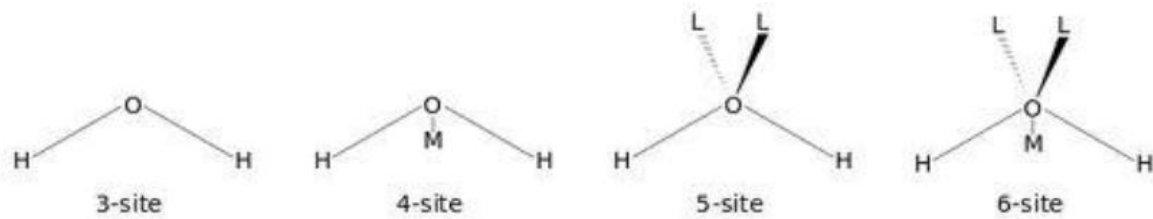
Υπάρχουν διάφορα μοντέλα νερού τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν είτε με βάση το αν η δομή του μορίου διαλύτη είναι ακλόνητη ή ευκίνητη είτε με βάση το συνολικό αριθμό των θέσεων αλληλεπίδρασης του νερού με ένα άλλο μόριο νερού ή με ένα μόριο διαλυμένης ουσίας, είτε ακόμη με το αν περιλαμβάνουν φαινόμενα πόλωσης. Το πιο διαδεδομένο μοντέλο περιλαμβάνει τη θεώρηση του νερού ως ακλόνητη σφαίρα Lennard-Jones, μέσα στην οποία υπάρχουν δύο φορτία ίσης και αντίθετης τιμής προς μίμηση της διπολικής ροπής του.

Λίγο πιο περίπλοκες ακλόνητες αναπαραστάσεις περιλαμβάνουν τον ορισμό ίσων θετικών ατομικών φορτίων στα άτομα υδρογόνου και την τοποθέτηση ενός αρνητικού φορτίου στη θέση του οξυγόνου ή σε κατάλληλη θέση στον άξονα συμμετρίας ή την τοποθέτηση ίσων αρνητικών φορτίων στις περιοχές ζευγών ηλεκτρονίων (σχήμα 4.10). Κάθε μοντέλο περιλαμβάνει ένα δυναμικό αλληλεπίδρασης των μορίων νερού.

Με τη διαφοροποίηση της θέσης και της τιμής των αρνητικών φορτίων και των διάφορων παραμέτρων του δυναμικού που υπάρχει από μοντέλο σε μοντέλο επιτυγχάνεται η μίμηση της διπολικής ροπής και της γεωμετρίας πρότυπων μοριακών συστημάτων.

Τέτοια απλά μοντέλα με προσεκτική παραμετροποίηση αποδίδουν εξαιρετικά ως προς την πρόβλεψη πολλών ιδιοτήτων του υγρού νερού, όπως η πυκνότητα, η θερμότητα ατμοποίησης, η θερμοχωρητικότητα, η συμπιεστότητα, κ.λπ.

Από αυτά τα μοντέλα νερού τα πιο επιτυχημένα είναι τα διαμοριακά δυναμικά 3- και 4-,5- θέσεων αλληλεπίδρασης (TIP3P, TIP4P, TIP5P), που αναπτύχθηκαν από τον Jorgensen και περιλαμβάνουν 3- και 4- σημειακά φορτία, αντίστοιχα, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.10.¹¹²⁻¹¹⁴ Κατά την εξέλιξη του TIP3P στο μοντέλο TIP5P βελτιώθηκε η γεωμετρία του διμερούς νερού και λήφθηκε μια πιο τετραεδρική γεωμετρία του διαλύτη, δηλαδή των συσσωματωμάτων του νερού, ώστε υπολογίστηκαν για παράδειγμα καλύτερα οι συναρτήσεις ακτινικής κατανομής και η θερμοκρασία μέγιστης πυκνότητας.



Σχήμα 4.10⁸⁶: Μοντέλα νερού 3-, 4-, 5- και 6- θέσεων αλληλεπίδρασης. Στο μοντέλο 4- θέσεων τοποθετείται όχι στο άτομο του οξυγόνου, αλλά σε ένα τεχνητό άτομο M επί της διχοτόμου της γωνίας H-O-H. Στο μοντέλο 5- θέσεων τοποθετούνται αρνητικά φορτία στα τεχνητά άτομα L, τα οποία αναπαριστούν τα μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων του οξυγόνου σύμφωνα με την τετραεδρική γεωμετρία του μορίου του νερού. Για το μοντέλο 3- θέσεων χρειάζονται $3 \times 3 = 9$ αποστάσεις για την αλληλεπίδραση κάθε ζεύγους μορίων νερού, δηλαδή κάθε άτομο του ενός μορίου με κάθε άτομο του άλλου. Αντίστοιχα, για το μοντέλο 4- θέσεων χρειάζονται 10 αποστάσεις στον υπολογισμό, δηλαδή κάθε φορτισμένη θέση ενός μορίου αλληλεπιδρά με κάθε φορτισμένη θέση ενός άλλου και υπάρχει επιπλέον η αλληλεπίδραση O-O, $(3 \times 3) + 1 = 10$. Ανάλογα, για το μοντέλο 5- θέσεων χρειάζονται 17 αποστάσεις, $(4 \times 4) + 1 = 17$ και για το μοντέλο 6- θέσεων 26, $(5 \times 5) + 1 = 26$.

Το δυναμικό για τα μοντέλα TIP3P και TIP4P δίνεται από την εξίσωση (4.23)

$$V_{nb} = V_{el} + V_{vdW} = \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}} + \frac{A}{r_{oo}^{12}} - \frac{A}{r_{oo}^{10}} \quad (4.23)$$

όπου q_i, q_j τα μερικά φορτία, r_{ij} η απόσταση μεταξύ των θέσεων των φορτίων A και B είναι παράμετροι του όρου του δυναμικού Lennard-Jones, το οποίο εφαρμόζεται μόνο για την αλληλεπίδραση των ατόμων οξυγόνου.

Η μορφή και οι διάφοροι παράμετροι διατυπώθηκαν κατά την προσαρμογή με αποτελέσματα *ab initio* κβαντομηχανικών υπολογισμών σε διμερή, τριμερή ή υψηλότερης τάξης συσσωματώματα νερού και βελτιώθηκαν από τις τιμές των μακροσκοπικών ιδιοτήτων του νερού που λαμβάνονται μετά από προσομοιώσεις Monte Carlo. Τα μοντέλα TIPnP είναι **μεταβιβάσιμα** (*transferable*), δηλαδή είναι συμβατά με διάφορα πεδία δυνάμεων και μεθόδους.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμη και τα πιο εξελιγμένα μοντέλα δεν αναπαράγουν τέλεια όλες τις μακροσκοπικές ιδιότητες του νερού και ότι κατά την επιλογή ενός μοντέλου στις προσομοιώσεις πρέπει να ληφθεί υπόψη η ακρίβεια υπολογισμού καθώς και το υπολογιστικό κόστος που αυξάνεται με τον αριθμό των θέσεων αλληλεπίδρασης (σχήμα 4.10). Το μοντέλο τριών θέσεων αλληλεπίδρασης βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής εξαιτίας της απλότητάς του και του μειωμένου υπολογιστικού κόστους που επιτρέπει.

Υπάρχουν επίσης και αδρανοποιημένα μοντέλα νερού, ευκίνητα μοντέλα νερού και μοντέλα που βασίζονται σε πολώσιμα πρότυπα, η περιγραφή των οποίων ξεφεύγει από το σκοπό της διπλωματικής αυτής εργασίας.

4.6 Σύγκλιση προσομοίωσης με βάση τον υπολογισμό της τιμής RMSD

Για να επιτευχθεί η σύγκλιση μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής, εξ ορισμού πρέπει να έχουν προστεθεί στο δείγμα τόσες απεικονίσεις ώστε να καλύπτεται πλήρως ο χώρος φάσης του συστήματος, δηλαδή η δειγματοληψία να είναι εργοδική. Τότε η χρονική μέση τιμή της μελετώμενης ιδιότητας στο επιλεγμένο δείγμα σημείων του διαμορφωτικού χώρου συμπίπτει με τη μέση τιμή που προκύπτει αν ληφθούν υπόψη όλα τα σημεία του χώρου φάσης. Αν κι αυτή η θέση είναι απλή, η σύγκλιση όπως ορίστηκε παραπάνω είναι αδύνατο να αποδειχτεί.

Για το λόγο αυτό, πρακτικά, στατιστική σύγκλιση θεωρείται ότι επιτυγχάνεται σε μια προσομοίωση MD, όταν οι μέσες τιμές όλων των μελετώμενων ιδιοτήτων $\langle A \rangle$ εμφανίζονται προσεγγιστικά ότι δε μεταβάλλονται με την επιπλέον συλλογή σημείων του χώρου φάσης. Η απόδειξη, λοιπόν, της σύγκλισης μιας προσομοίωσης μοριακής δυναμικής εΐθισται να γίνεται δίνοντας τα γραφήματα μιας ή δύο ιδιοτήτων συναρτήσεως του χρόνου, όπου διακρίνεται ότι μετά από κάποιο χρόνο η τιμή της μελετώμενης ιδιότητας παραμένει σταθερή.

Για παράδειγμα κατά την προσομοίωση μακρομορίων παρακολουθείται η τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής του τετραγώνου της απόκλισης (RMSD) της υπολογιστικής δομής από μια πειραματική γεωμετρία, η οποία έχει προκύψει από δεδομένα κρυσταλλογραφίας X ή φασματοσκοπίας NMR.

Η τιμή RMSD για ένα στιγμιότυπο ορίζεται από την εξίσωση (4.24)

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (r_{i,\text{sim}} - r_{i,\text{expt}})^2}{N}} \quad (4.24)$$

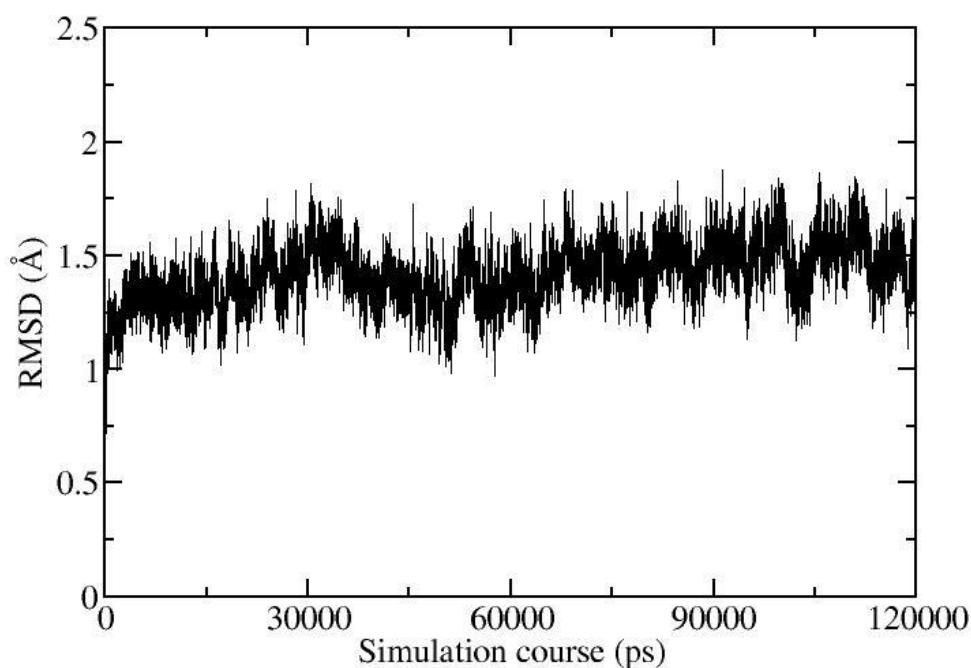
όπου N ο αριθμός των ατόμων στο μακρομόριο και οι θέσεις r προσδιορίζονται σε ένα σύστημα συντεταγμένων που έχει ως αρχή το κέντρο μάζας, ενώ οι κύριες ροπές αδράνειας του μορίου βρίσκονται επί των καρτεσιανών αξόνων (η υπολογιστική και η πειραματική δομή έχουν τέλεια υπερτεθεί πριν τον υπολογισμό της τιμής RMSD).

Με τον υπολογισμό της τιμής RMSD επιτυγχάνονται ταυτόχρονα τόσο η εκτίμηση της σύγκλισης μιας προσομοίωσης όσο και η εκτίμηση του πόσο «όμοιες» είναι η πειραματική με την υπολογιστική δομή μεταξύ τους.

Σημειώνεται ότι παλαιότερα στη βιβλιογραφία, όσον αφορά τον έλεγχο της σύγκλισης με την τιμή RMSD, συχνά αναφερόταν μόνο ο αριθμός της τιμής RMSD και σπάνια δινόταν το γράφημα της

σύγκλισης, όπως για παράδειγμα στο σχήμα 4.11. Η τιμή της απόκλισης ως προς τη μέση τιμή της, σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση (4.24), είναι σημαντική ποσότητα και πρέπει να αναφέρεται αλλά και το γράφημα της μεταβολής της RMSD ως συνάρτηση του χρόνου δείχνει την μεταβολή του συστήματος με την πάροδο του χρόνου και επιβάλλεται να δίνεται. Αυτό αληθεύει για όλες τις αναμενόμενες τιμές που προκύπτουν από μια προσομοίωση. Διάφορες προσεγγισμένες μέθοδοι ανάλυσης σφάλματος των μέσων τιμών που προκύπτουν από προσομοιώσεις έχουν διατυπωθεί.¹¹⁵

Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη των υπολογιστών έχει σημειωθεί ανάλογη αύξηση του χρόνου διάρκειας των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής που φτάνουν σήμερα μέχρι και μερικά μs . Παρόλα αυτά, ένα μοριακό σύστημα μπορεί να συγκλίνει στατιστικά, αλλά να μη συγκλίνει στη δομή ισορροπίας, επειδή η προσομοίωση έχει παγιδευτεί σε μια μετασταθή κατάσταση του συστήματος. Για αυτό ένας τρόπος ελέγχου είναι η συνέχιση της προσομοίωσης για μεγαλύτερο χρόνο, αν κι αυτό δεν είναι πάντα εφικτό εξαιτίας της αύξησης του υπολογιστικού κόστους. Εναλλακτικά, πραγματοποιούνται μία ή περισσότερες προσομοιώσεις με διαφορετικές αρχικές συνθήκες του συστήματος και ελέγχεται εάν υπάρχει κοινή σύγκλιση. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να ληφθούν εντελώς διαφορετικές τροχιές που στατιστικά δεν είναι όμοιες με την αρχική.



Εικόνα 4.11: Διάγραμμα RMSD ως προς τον σκελετό (backbone) μιας πρωτεΐνης μετά από προσομοίωση MD διάρκειας 120 ns.

Φυσικά και η παραπάνω μέθοδος –όπως επίσης και άλλες μέθοδοι– δεν εγγυάται την πραγματοποίηση μιας εργοδικής δειγματοληψίας του χώρου φάσης, ακόμα κι αν στο χρόνο προσομοίωσης οι τιμές διαφόρων ιδιοτήτων φαίνεται να συγκλίνουν. Αν και έχουν διατυπωθεί μέθοδοι για τον έλεγχο της σύγκλισης¹¹⁶⁻¹¹⁸ ο καλύτερος τρόπος για να εκτιμηθεί η αξία των προβλέψεων από μια προσομοίωση είναι η σύγκριση με πειραματικά δεδομένα καλής ποιότητας.

5 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ: ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ-ΥΠΟΔΟΧΕΑ

5.1 Γενικά

Στο κεφάλαιο 3 αναλύθηκε η σημασία του θερμοδυναμικού χαρακτηρισμού ενός υποψήφιου φαρμακομορίου για τον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων, και η μέθοδος ITC με την οποία μπορεί να χαρακτηριστεί θερμοδυναμικά ένα υποψήφιο φαρμακομόριο. Παρολαυτά, ο συγκεκριμένος χαρακτηρισμός λαμβάνει χώρα αφότου έχουν ήδη συντεθεί τα υποψήφια φαρμακομόρια, διαδικασία που είναι δαπανηρή οικονομικά αλλά και από πλευράς χρόνου και περιβαλλοντικής ρύπανσης. Γι' αυτό το λόγο, κατ' αναλογία και σε συνδυασμό με τις υπολογιστικές μεθόδους που αναλύθηκαν προηγούμενα, οι οποίες χρησιμοποιούνται για προσομοίωση της τοπολογίας σύνδεσης ενός προσδέτη με έναν υποδοχέα, αναπτύχθηκαν υπολογιστικές μέθοδοι προσδιορισμού της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης. Γενικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: 1) μέθοδοι που βασίζονται στις αρχές της στατιστικής μηχανικής και είναι πιο ακριβείς αλλά υπολογιστικά απαιτητικές, 2) προσεγγιστικές μέθοδοι που βασίζονται σε εμπειρικά δυναμικά και δεν λαμβάνουν υπόψη όλους τους βαθμούς ελευθερίας του συστήματος. Μια μέθοδος που ανήκει στην πρώτη κατηγορία και εξετάζεται στα πλαίσια της παρούσας εργασίας είναι η Μέθοδος Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας (Free Energy Perturbation). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι υπολογισμοί ελλιμενισμού (docking calculations) που επίσης εφαρμόστηκαν. Και οι δύο μέθοδοι εφαρμόστηκαν για τη μελέτη του προβλήματος σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών παραγώγων με τη διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης M2 του ιού influenza A (A/M2TM).

5.2 Μέθοδος Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας

Έστω ότι για δύο συστήματα A και B πρέπει να υπολογιστεί η διαφορά ελεύθερης ενέργειας με προσομοίωση των συστημάτων κάτω από τις ίδιες συνθήκες, π.χ. ίσο αριθμό μορίων διαλύτη, ίδιο μέγεθος περιοδικού κουτιού προσομοίωσης, κ.λπ.

Σε ένα κανονικό στατιστικό σύνολο, N διακρίσιμων σωματίων, η ελεύθερη ενέργεια Helmholtz A δίνεται από την εξίσωση (5.1) που περιγράφει τον πιθανοτικό χαρακτήρα προσδιορισμού της ελεύθερης ενέργειας A :

$$A = \langle A \rangle = k_B T \ln \frac{1}{Q_{NVT}} = k_B T \ln \left[\iint e^{E(\mathbf{p}, \mathbf{q})/k_B T} P(\mathbf{p}, \mathbf{q}) d\mathbf{p} d\mathbf{q} \right] = k_B T \ln \langle e^{E(\mathbf{p}, \mathbf{q})/k_B T} \rangle \quad (5.1)$$

όπου $P(\mathbf{p}, \mathbf{q})$ η πιθανότητα να βρεθεί το σύστημα σε ένα σημείο του χώρου φάσης.

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση (5.1), η διαφορά ελεύθερης ενέργειας ΔA για τη μεταβολή $A \rightarrow B$ δίνεται από την εξίσωση (5.2) και είναι ίση $-RT \ln K_{A \rightarrow B}$

$$\begin{aligned} \Delta A &= \langle A \rangle_B - \langle A \rangle_A = k_B T \ln \langle e^{E_i/k_B T} \rangle_B - k_B T \ln \langle e^{E_i/k_B T} \rangle_A \\ &= k_B T \left[\ln \left(\frac{1}{M_B} \sum_i^{M_B} e^{E_i/k_B T} \right) - \ln \left(\frac{1}{M_A} \sum_i^{M_A} e^{E_i/k_B T} \right) \right] = k_B T \ln \left(\frac{\langle e^{E_i/k_B T} \rangle_B}{\langle e^{E_i/k_B T} \rangle_A} \right) \end{aligned} \quad (5.2)$$

όπου E_i η συνολική ενέργεια κάθε στιγμιότυπου ή απεικόνισης M_A ή M_B ως άθροισμα δυναμικής και κινητικής ενέργειας.

Από πλευράς προσομοίωσης, με βάση την εξίσωση (5.2) η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια για την πορεία $A \rightarrow B$ μπορεί να υπολογιστεί από τις μέσες τιμές των στατιστικών συνόλων που προκύπτουν κατά τη διάρκεια προσομοιώσεων MD ή MC από τη δειγματοληψία σημείων M_A του συστήματος A και M_B του συστήματος B, αντίστοιχα.

Η σημασία των σφαλμάτων στον προσδιορισμό των μέσων τιμών μειώνεται, επειδή προσδιορίζεται ο λόγος των αναμενόμενων τιμών. Όμως η σύγκλιση των αναμενόμενων τιμών ΔA είναι αργή και κάποιες φορές μη εφικτή (δηλαδή τα σφάλματα είναι μεγάλα), διότι οι χαμηλές πιθανότητες των σημείων υψηλής ενέργειας μετατρέπονται σε σημαντικές εκθετικές συνεισφορές κατά τον υπολογισμό των όρων του κλάσματος της εξίσωσης (5.2).

Όμως, αν τα συστήματα A και B έχουν μικρή διαφορά, τότε η εξίσωση (5.2) απλοποιείται στην εξίσωση Zwanzig¹¹⁹ (5.3) μέσω της οποίας προσεγγίζεται το πρόβλημα και στην οποία βασίζεται ο υπολογισμός διατάραξης ελεύθερης ενέργειας (FEP, Free Energy Perturbation).

$$\Delta A = \langle A \rangle_B - \langle A \rangle_A = k_B T \ln \left\langle e^{\frac{E_B - E_A}{k_B T}} \right\rangle_A \quad (5.3)$$

Σύμφωνα με την εξίσωση (5.3) η δειγματοληψία γίνεται ως προς το σύνολο των απεικονίσεων που συλλέγονται προσομοίωση του συστήματος A και από αυτή προσδιορίζεται η τιμή E_B και η μέση τιμή συνόλου $\left\langle e^{\frac{E_B - E_A}{k_B T}} \right\rangle$. Ανάλογα μπορεί να υπολογιστούν οι στατιστικές μέσες τιμές που προκύπτουν από την προσομοίωση του συστήματος B.

Ο παραπάνω φορμαλισμός της μεθόδου FEP (5.3) προσφέρει μερικά τεράστια πλεονεκτήματα σε σχέση με την εξίσωση (5.2). Ένα από τα πιο σημαντικά είναι ότι όλες οι συνεισφορές στην ενέργεια από αλληλεπιδράσεις διαλύτη – διαλύτη αλληλοαναιρούνται στην ενεργειακή διαφορά $E_B - E_A$ επειδή τα σύνολα είναι παρόμοια. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι ιδιαίτερα σημαντικές σε σχέση με τις αλληλεπιδράσεις διαλυμένης ουσίας (που μπορεί να είναι ένα μακρομόριο) – διαλύτη, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των μορίων του διαλύτη. Αν χρησιμοποιείται για την περιγραφή του συστήματος ένα πεδίο δυνάμεων, η συνιστώσα της κινητικής ενέργειας $\Delta E_{\text{κιν}}$ μπορεί να βγει ως σταθερά εκτός του ολοκληρώματος της μέσης τιμής και αν τα συστήματα A και B είναι πολύ παρόμοια, οι συνεισφορές της κινητικής ενέργειας στους υπολογισμούς αυτούς αλληλοαναιρούνται. Οπότε η διαφορά ολικής ενέργειας της εξίσωσης (5.3) γράφεται ως διαφορά δυναμικής ενέργειας σύμφωνα με την εξίσωση (5.4).

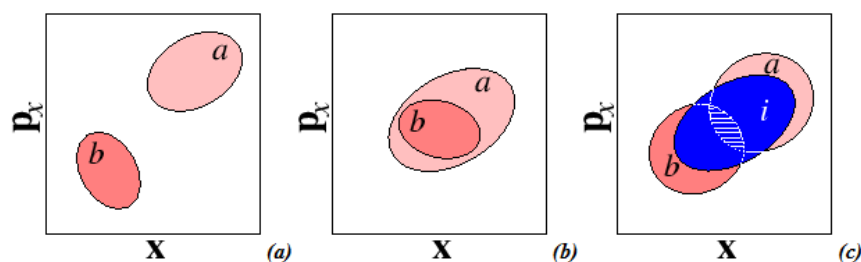
$$\Delta A = \langle A \rangle_B - \langle A \rangle_A = k_B T \ln \left\langle e^{\frac{V_B(\mathbf{q}) - V_A(\mathbf{q})}{k_B T}} \right\rangle_A \quad (5.4)$$

Αν όμως οι συναρτήσεις καταμερισμού των συστημάτων A και B δεν επικαλύπτονται στο χώρο φάσης τότε η διαφορά ελεύθερης ενέργειας που υπολογίζεται με βάση την (5.4) δε θα είναι ακριβής, διότι δε θα επικαλύπτεται αντιπροσωπευτικά ο χώρος φάσης του συστήματος B κατά την προσομοίωση του συστήματος A. Πιο συγκεκριμένα, το πρόβλημα προκύπτει όταν η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο καταστάσεων είναι πολύ μεγαλύτερη από $k_B T$: $|V_B - V_A| \gg k_B T$.

Σε αυτήν την περίπτωση για να ληφθούν ακριβέστερες προσεγγίσεις της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας μπορεί να εισαχθεί μια κατάσταση i που είναι ενδιάμεση των A και B, οπότε ο υπολογισμός της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας βασίζεται στην έκφραση (5.5).

$$\Delta A = \langle A \rangle_B - \langle A \rangle_A = (\langle A \rangle_B - \langle A \rangle_i) + (\langle A \rangle_i - \langle A \rangle_A) = k_B T \ln \left\langle e^{\frac{V_B - V_i}{k_B T}} \right\rangle + k_B T \ln \left\langle e^{\frac{V_i - V_A}{k_B T}} \right\rangle \quad (5.5)$$

Αν οριστεί η περιοχή i ώστε να επικαλύπτεται ικανοποιητικά με τις περιοχές A και B, τότε οι υπολογισμοί θερμοδυναμικής διατάραξης μεταξύ της κατάστασης A και i , και μεταξύ i και B, βελτιώνουν τελικά τη δειγματοληψία του χώρου φάσης της κατάστασης B από τη δειγματοληψία του στατιστικού συνόλου του συστήματος A και λαμβάνεται πιο αξιόπιστη τιμή διαφοράς ελεύθερης ενέργειας ΔA (σχ. 5.1).



Σχήμα 5.1¹²⁰: Σύγκλιση του υπολογισμού FEP. Τα σύνολα a , b αναπαριστούν το χώρο φάσης των συστημάτων A και B αντίστοιχα. α) Οι χώροι φάσης απέχουν αρκετά, οπότε η εξίσωση (5.4) δε θα συγκλίνει β) Αν αντίθετα ο χώρος φάσης του B αποτελεί υποσύνολο του χώρου φάσης A, ο υπολογισμός θα συγκλίνει με ευκολία. γ) Η δυσκολία που παρουσιάζεται στο α) μπορεί να αμβλυνθεί με την εισαγωγή του ενδιάμεσου στατιστικού συνόλου της κατάστασης i .

Συνεπώς μια προφανής μεθοδολογία είναι η χρήση πολλαπλών ενδιάμεσων καταστάσεων για τη μετάβαση από το σύστημα A στο σύστημα B. Η διαδικασία ονομάζεται σταδιοποίηση (staging). Είναι πολύ καίριας σημασίας να τονιστεί εδώ ότι όλοι οι ενδιάμεσοι όροι αλληλοαναιρούνται ακριβώς, με αποτέλεσμα τη δυνατή χρήση όσων ενδιάμεσων καταστάσεων χρειάζεται για να ληφθούν καλές επικαλύψεις των χώρων φάσης και κατά συνέπεια αξιόπιστες τιμές της ζητούμενης διαφοράς ελεύθερης ενέργειας. Όμως το υπολογιστικό κόστος της μεθόδου αυξάνει με αυτό τον τρόπο και απαιτείται συγκερασμός μεταξύ επιθυμητής ακρίβειας και υπολογιστικού κόστους.

5.3 Αλχημικός Μετασχηματισμός

5.3.1 Περιγραφή της μεθοδολογίας

Ας εξεταστεί πώς μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος FEP στο σύστημα προσδέτη-υποδοχέα. Ας θεωρηθεί ο υπολογισμός της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης μεταξύ δύο προσδετών A και B για τον ίδιο υποδοχέα. Με βάση την εξίσωση (5.2) χρειάζονται δύο διαφορετικοί υπολογισμοί για κάθε σύστημα προσδέτη-υποδοχέα. Η ατομιστική περιγραφή των μορίων του διαλύτη (νερού) είναι απαραίτητη για τη χημικά ακριβή περιγραφή του συστήματος, ιδιαίτερα αν ληφθεί υπόψη ότι τα μόρια νερού που βρίσκονται στη θέση σύνδεσης παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία σύνδεσης. Η θεώρηση μεγάλου αριθμού (ακόμα και χιλιάδων) μορίων νερού, θα απαιτεί την εκτέλεση δύο υπολογισμών με μεγάλο υπολογιστικό κόστος και στατιστικό θόρυβο-σφάλμα.

Η εφαρμογή της μεθόδου FEP επιτυγχάνεται με τον αλχημικό μετασχηματισμό. Σε έναν αλχημικό μετασχηματισμό, αντί να προσομοιώνεται απευθείας η διαδικασία εισαγωγής και σύνδεσης του κάθε αδέσμευτου μορίου-προσδέτη στον υποδοχέα, προσομοιώνεται η σταδιακή «μετάλλαξη» της δομής του ήδη συμπλεγμένου μορίου-προσδέτη A με τον υποδοχέα προς το δεύτερο προσδέτη B μέσω σταδιοποίησης, δηλαδή εισαγωγής ενδιάμεσων καταστάσεων –σύμφωνα με όσα θεωρητικά περιγράφηκαν παραπάνω κατά τη διατύπωση της εξίσωσης (5.5). Τα ενδιάμεσα αυτά δεν έχουν

φυσική σημασία, αλλά θεωρούνται βολικές υπολογιστικές κατασκευές.^{121,122} Έτσι υπολογίζεται η διαφορά ανάμεσα στην ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης (άρα και στη συγγένεια) του προσδέτη αναφοράς A σε σχέση με τον υπό εξέταση προσδέτη B¹²¹⁻¹²³:

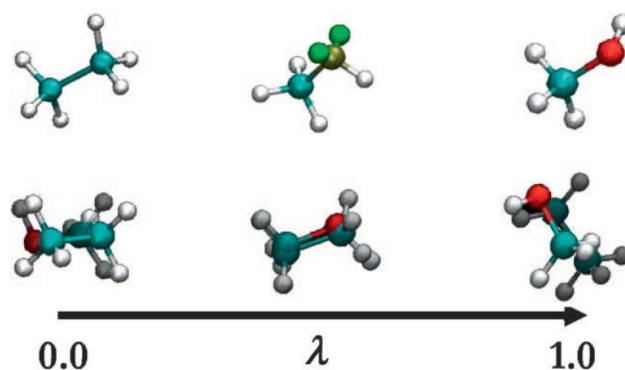
$$\Delta\Delta A_{\text{bind}} = \Delta A_B - \Delta A_A \quad (5.6)$$

Ας σημειωθεί ότι μπορεί να υπολογιστεί και η απόλυτη ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης μέσω σταδιακής εμφάνισης-εξαφάνισης του προσδέτη εντός του υποδοχέα αλλά, αν και έχει σημειωθεί πρόοδος^{124,125}, οι υπολογισμοί απόλυτης ελεύθερης ενέργειας παραμένουν δύσχρηστοι στο σχεδιασμό φαρμακομορίων καθώς απαιτούν πολύ μεγάλο αριθμό ενδιάμεσων και έχουν υψηλό υπολογιστικό κόστος, εξαιτίας της τεράστιας διατάραξης που συνεπάγεται η αφαίρεση του προσδέτη από τη θέση σύνδεσης. Η συντριπτική πλειοψηφία των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας που βρίσκουν εφαρμογή στο σχεδιασμό φαρμάκων -περιλαμβανομένης και της παρούσας εργασίας- αφορούν τη σχετική ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης. Η περιγραφή που ακολουθεί αναφέρεται στον υπολογισμό της σχετικής ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης.

Κατά τον αλχημικό μετασχηματισμό η μοριακή τοπολογία των δύο μορίων αλλάζει, δηλαδή υπάρχουν διαφορετικά άτομα σε κάθε μόριο, τα άτομα συνδέονται με διαφορετικούς τρόπους π.χ. η μετατροπή του αιθανίου σε μεθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_3\text{OH}$). Δύο τρόποι έχουν προταθεί για την περιγραφή της αλλαγής της δομής: η μέθοδος της **μονής και της δυαδικής τοπολογίας** (*single and dual topology coupling*).¹²² Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιείται ένα συνδυαστικό δυναμικό (βλ. εδάφιο 5.3.2) για την περιγραφή του μορίου (π.χ. προσδέτη) αφού τα δύο μόρια συνυπάρχουν κατά τον αλχημικό μετασχηματισμό.

α) Στην μέθοδο της μονής τοπολογίας οι παράμετροι των πεδίων δυνάμεων των προσδετών X και Y παρεμβάλλονται συνήθως γραμμικά. Για να είναι εφικτή η σύζευξη απλής τοπολογίας, οι δύο προσδέτες έχουν διαφορετικό αριθμό ατόμων και προστίθενται «εικονικά» (*dummy*) άτομα, στον ένα ή και στους δύο προσδέτες, τα οποία δε συνεισφέρουν στη δυναμική ενέργεια.

β) Από την άλλη μεριά, στην προσέγγιση δυαδικής τοπολογίας, οι προσδέτες X και Y προσομοιώνονται ταυτόχρονα, αλλά δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και η ενέργεια αλληλεπίδρασής τους με την πρωτεΐνη και τα άτομα του διαλύτη κλιμακώνεται κατά τα ενδιάμεσα στάδια. Στο σχήμα 5.2 φαίνονται οι προσεγγίσεις απλής και δυαδικής τοπολογίας για τη μετατροπή του αιθανίου σε μεθανόλη.



Σχήμα 5.2¹²²: Πάνω: Προσέγγιση απλής τοπολογίας για τη μετατροπή ενός μορίου αιθανίου σε ένα μόριο μεθανόλης. Δύο άτομα υδρογόνου συρρικνώνονται σταδιακά (ανοιχτό πράσινο) και τελικά εξαφανίζονται σε ακτίνα van der Waals του ατόμου οξυγόνου του μορίου της μεθανόλης. Κάτω: Στην προσέγγιση δυαδικής τοπολογίας τα δύο μόρια προσομοιώνονται ταυτόχρονα. Οι ενέργειες αλληλεπίδρασης μεταξύ του περιβάλλοντος και των μορίων της μεθανόλης και του αιθανίου ρυθμίζονται από το λ , όπως φαίνεται από τη σταδιακή αλλαγή του χρώματος.

5.3.2 Συνδυαστικό δυναμικό με μεταβλητή σύζευξης λ – Πραγματοποίηση της σταδιοποίησης Υπολογισμού Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας

Η δημιουργία των ενδιάμεσων σταδίων που είναι απαραίτητοι για τον αλχημικό μετασχηματισμό επιτυγχάνεται με τον ορισμό της μεταβλητής σύζευξης λ , η οποία επιτρέπει την ομαλή μετάβαση από τον προσδέτη A στον προσδέτη B. Γενικά η μεταβλητή σύζευξης λ παίρνει τιμές στο διάστημα $[0,1]$, ώστε για $\lambda = 0.0$ να προκύπτει η δομή του προσδέτη A, ενώ για $\lambda = 1.0$ προκύπτει η δομή του προσδέτη B.¹²² Με τον ορισμό της μεταβλητής σύζευξης λ η σταδιοποίηση μπορεί να επιτευχθεί μέσω εφαρμογής του παρακάτω συνδυαστικού δυναμικού.

$$V(\lambda) = \lambda V_B + (1 - \lambda)V_A \quad (5.7)$$

Η εξίσωση (5.7) χρησιμοποιείται από την προσέγγιση της δυαδικής τοπολογίας, όπου κατά τον υπολογισμό συνυπάρχουν και οι δύο τοπολογίες που αλληλεπιδρούν με το περιβάλλον, χωρίς όμως να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

Το ποσοστό συμμετοχής κάθε τοπολογίας αλλάζει κατά την πρόοδο του υπολογισμού σύμφωνα με την εξίσωση (5.7). Οι ενδιάμεσες αποστάσεις που αντιστοιχούν σε τιμές λ μεταξύ $[0,1]$ δεν έχουν φυσική σημασία. Από αυτήν προκύπτει η εξίσωση (5.8):

$$\Delta V = V(\lambda) - V_A = \lambda(V_B - V_A) \quad (5.8)$$

Τα βήματα μήκους $d\lambda$ μπορούν να έχουν το ίδιο εύρος και για κάθε τιμή του λ μεταξύ του 0 και του 1 πραγματοποιείται μια προσομοίωση MC ή MD. Η φάση εξισορρόπησης γίνεται στην τιμή λ και

ακολουθεί η φάση παραγωγής, όπως σε κάθε υπολογισμό MD, κατά την οποία συλλέγονται οι τιμές $V_{\lambda+d\lambda} - V_{\lambda}$. Η διαφορά ελεύθερης ενέργειας προσδιορίζεται σύμφωνα με την εξίσωση Zwanzig, που γράφεται για τη μεταβολή $\lambda \rightarrow \lambda + d\lambda$, με τη μορφή (5.9)

$$\Delta A = \langle A \rangle_{\lambda+d\lambda} - \langle A \rangle_{\lambda} = k_B T \ln \left\langle e^{\frac{V_{\lambda+d\lambda} - V_{\lambda}}{k_B T}} \right\rangle_{\lambda} \quad (5.9)$$

Το αναπόφευκτο κόστος για την επιθυμητή και αναπόφευκτη σταδιοποίηση αντιστοιχεί στην εκτέλεση ν προσομοιώσεων αντί της μίας (όπου ν ο αριθμός των βημάτων $\lambda \in [0,1]$). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται διάστημα – διάστημα μέχρι η τιμή του λ από 0 να φτάσει 1, οπότε όλες οι ελεύθερες ενέργειες κατά Helmholtz κάθε διαστήματος αθροίζονται, με το άθροισμα να αντιστοιχεί στη μεταβολή $A \rightarrow B$. Έτσι, η σχέση (5.4) για τέτοια πρωτόκολλα FEP γενικεύεται στην εξίσωση (4.10)

$$\Delta A = \langle A \rangle_{\lambda+d\lambda} - \langle A \rangle_{\lambda} = \sum_{\lambda=0}^1 k_B T \ln \left\langle e^{\frac{V_{\lambda+d\lambda} - V_{\lambda}}{k_B T}} \right\rangle_{\lambda} \quad (5.10)$$

Πριν από τον υπολογισμό πρέπει να προσδιοριστεί το βήμα $d\lambda$, που αντιστοιχεί στη σταθερά σύζευξης λ . Τυπικά το $d\lambda$ τίθεται σε μια σταθερή τιμή κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Είναι σημαντικό να υπάρχει ικανοποιητική επικάλυψη μεταξύ των διαδοχικών καταστάσεων $d\lambda$ και $\lambda + d\lambda$, ώστε να ληφθούν αξιόπιστες τιμές. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μικρά βήματα $d\lambda$, όταν η ελεύθερη ενέργεια μεταβάλλεται γρήγορα και μεγάλα βήματα όταν αλλάζει πιο αργά. Σε αυτή την αρχή βασίζεται η μέθοδος των **δυναμικά τροποποιημένων παραθύρων**, όπου η τιμή της κλίσης της καμπύλης ελεύθερης ενέργειας ως προς λ χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί η τιμή $d\lambda$ για την επόμενη προσομοίωση $\lambda + d\lambda$.

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι αντί της δημιουργίας νέων συνόλων στην κατεύθυνση $\lambda \rightarrow \lambda + d\lambda$, η οποία ονομάζεται **πρόσθια δειγματοληψία** (forward sampling), είναι το ίδιο εύκολος ο προσδιορισμός διαφοράς ελεύθερης ενέργειας για την **αντίστροφη δειγματοληψία** $\lambda \rightarrow \lambda - d\lambda$ (backward sampling). Ενώ, θεωρητικά, η μεταβολή ελεύθερης ενέργειας για την πορεία $A \rightarrow B$, θα έπρεπε να έχει ακριβώς αντίθετη τιμή από αυτήν που υπολογίζεται για την πορεία $B \rightarrow A$, αυτό σπάνια παρατηρείται στην πράξη. Η διαφορά μεταξύ απόλυτων τιμών $\Delta A_{A \rightarrow B}$ αφορά στην υστέρηση της μεθόδου και αποτελεί ένα πολύ απλό μέτρο των σφαλμάτων της μεθόδου. Στη **δειγματοληψία διπλού εύρους** (double-wide sampling) οι διαφορές ελεύθερης ενέργειας για τις πορείες $\lambda \rightarrow \lambda + d\lambda$ και $\lambda \rightarrow \lambda - d\lambda$ υπολογίζονται συγχρόνως από το ίδιο σύνολο. Με αυτόν τον τρόπο υπολογίζονται διπλάσιες διαφορές ενέργειας ΔA από μία προσομοίωση.

Ενώ οι περισσότερες πειραματικές μετρήσεις γίνονται υπό σταθερή πίεση και όχι υπό σταθερό όγκο, στο κεφάλαιο αυτό έγινε η θεμελίωση της μεθόδου υπολογισμού μεταβολών της ελεύθερης ενέργειας Helmholtz και όχι κατά Gibbs, όπου συνήθως αναφέρονται η πλειοψηφία των θερμοδυναμικών δεδομένων. Επειδή ο συνολικός αριθμός σωματιδίων σε μια προσομοίωση ελεύθερης ενέργειας παραμένει σταθερός, η μεταβολή του όγκου του κλειστού συστήματος είναι μηδενική, δηλαδή $P\Delta V = 0$, και άρα οι μεταβολές στις ελεύθερες ενέργειες Helmholtz και Gibbs ταυτίζονται. Στην περίπτωση, όμως, που αυτό δεν ισχύει πρέπει να γίνουν και οι κατάλληλες προσαρμογές.

5.4 Διατάραξη Ελεύθερης Ενέργειας με χρήση Θερμοδυναμικού Κύκλου

Ο υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας μέσω αλχημικού μετασχηματισμού για μια πορεία που περιλαμβάνει τη δυναμική ισορροπία μεταξύ μορίων που συνδέονται με μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις π.χ. σε ένα σύμπλοκο προσδέτη-υποδοχέα πραγματοποιείται ως εξής:

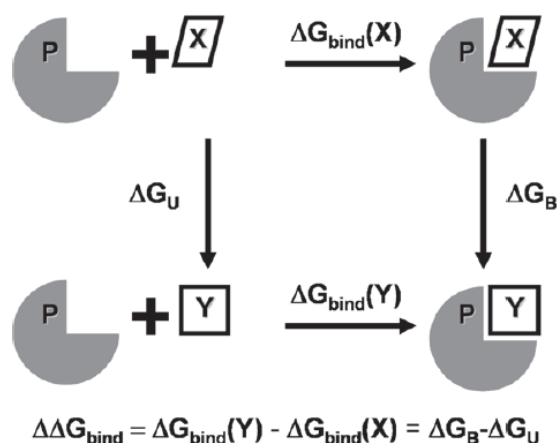
Είναι γνωστό ότι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης κατά Gibbs σχετίζεται με τη συγγένεια προσδέτη-υποδοχέα μέσω της σχέσης

$$\Delta G_{\text{bind}} = -RT \ln K_{\alpha} \quad (5.11)$$

Αν πρέπει να υπολογιστεί η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης δύο διαφορετικών προσδετών X και Y (ή υποστρωμάτων S_1 και S_2), με το μόριο του υποδοχέα P (ή του ενζύμου E), ΔG_Y και ΔG_X , ο υπολογισμός καθενιάς από τις ΔG_Y και ΔG_X , υπόκειται σε μεγάλα σφάλματα, γιατί περιλαμβάνει τη μεταφορά των διακριτών μορίων του προσδέτη και του υποδοχέα σε κατάσταση διαμοριακού συμπλόκου X – P και Y – P, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Αυτό συμβαίνει διότι κατά την πορεία ο υποδοχέας, ο προσδέτης και ο διαλύτης υφίσταται μεγάλες αναδιατάξεις, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η αποτελεσματική δειγματοληψία του χώρου φάσης. Το πρόβλημα του υπολογισμού της διαφοράς στις ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης

$$\Delta \Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_Y - \Delta G_X \quad (5.12)$$

επιλύεται με τη χρήση ενός **Θερμοδυναμικού Κύκλου** ή **Κύκλου Ελεύθερης Ενέργειας** σε συνδυασμό με έναν αλχημικό μετασχηματισμό μεταξύ των προσδετών X και Y (αρκεί αυτό να επιτρέπεται από τη δομή των προσδετών).¹²⁶



Σχήμα 5.3¹²²: Θερμοδυναμικός Κύκλος για τον υπολογισμό της σχετικής ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης. Με P συμβολίζεται η πρωτεΐνη, X και Y είναι δύο διαφορετικοί προσδέτες. Η ενέργεια σύνδεσης δίνεται από τη σχέση $\Delta\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{bind}}(\text{Y}) - \Delta G_{\text{bind}}(\text{X}) = \Delta G_{\text{B}} - \Delta G_{\text{U}}$

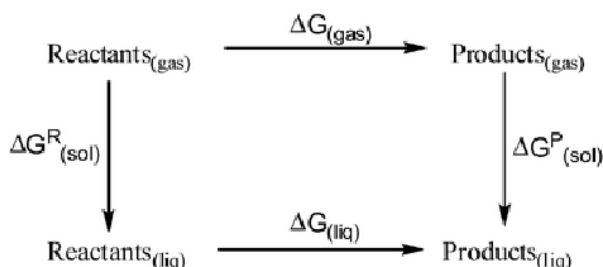
Εξαιτίας της καταστατικής φύσης της ελεύθερης ενέργειας η συνολική μεταβολή της σε έναν πλήρη θερμοδυναμικό κύκλο είναι μηδέν, οπότε για τον κύκλο του σχήματος 5.3, η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ υπολογίζεται από τη διαφορά

$$\Delta\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{B}} - \Delta G_{\text{U}} = \Delta G_{\text{Y}} - \Delta G_{\text{X}} \quad (5.13)$$

Για τον υπολογισμό της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης των προσδετών πραγματοποιούνται δύο σειρές μεταλλάξεων, για τη σταδιακή μετατροπή του προσδέτη X στον Y στην αδέσμευτη κατάσταση στο νερό και στην κατάσταση συμπλόκου με το βιομόριο.^{127,128} Οι μεταλλάξεις του προσδέτη X στον Y, τόσο σε διάλυμα όσο και εντός του υποδοχέα, που αντιστοιχούν στις μεταβολές ελεύθερης ενέργειας ΔG_{B} (B: bound) και ΔG_{U} (U: Unbound), αντίστοιχα, είναι μη πραγματικές και δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν εργαστηριακά (κατακόρυφες γραμμές του κύκλου του σχ. 5.3). Με τη χρήση, όμως, της υπολογιστικής μεθόδου FEP, οι μεταβολές αυτές μπορούν να περιγραφούν με ακρίβεια, συγκριτικά με τις πραγματικές μεταβολές που περιλαμβάνουν αλλαγές στην ελεύθερη ενέργεια ΔG_{Y} και ΔG_{X} οριζόντιες γραμμές του κύκλου του σχ. 5.3). Η ακρίβεια της FEP αυξάνει όπως αναλύθηκε ειδικά αν οι δομές των προσδετών X και Y είναι παρόμοιες, διότι στην παραδοχή ότι οι καταστάσεις A και B είναι παρόμοιες βασίζεται η προσέγγιση της εξίσωσης Zwanzig. Από τα παραπάνω φαίνεται επίσης ότι αν είναι γνωστή η πειραματική σταθερά σύνδεσης ενός αναστολέα, μπορεί να προσδιοριστεί με σχετική ακρίβεια με τη μέθοδο FEP, η σταθερά σύνδεσης ενός άλλου αναστολέα ανάλογης δομής.

Είναι άξιο αναφοράς ότι όλα όσα περιγράφηκαν παραπάνω για τον υπολογισμό της σχετικής ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης ενός φαρμακομορίου με έναν υποδοχέα, εφαρμόζονται κατά τον ίδιο τρόπο και για τον υπολογισμό της σχετικής ελεύθερης ενέργειας διάλυσης ενός μορίου στο νερό. Ο

θερμοδυναμικός κύκλος σε αυτήν την περίπτωση περιλαμβάνει τον αλχημικό μετασχηματισμό του μορίου X στο μόριο Y στην αέρια φάση (δηλαδή απουσία διαλύτη) και σε υδατικό διάλυμα (σχ. 5.4).^{126,129}



Σχήμα 5.4⁸⁶: Κύκλος υπολογισμού μεταβολής ελεύθερης ενέργειας σε διάλυμα. Οι κάθετες γραμμές του κύκλου αντιστοιχούν σε ελεύθερες ενέργειες διάλυσης σε ένα διαλύτη, ενώ οι οριζόντιες σε αλχημικές μεταβολές. Η διαφορά μεταξύ των κάθετων ποσοτήτων πρέπει να είναι ίση με τη διαφορά των οριζόντιων ποσοτήτων $\Delta G_{(liq)} - \Delta G_{(gas)} = \Delta G^P_{(sol)} - \Delta G^R_{(sol)}$.

5.5 Περιορισμοί, τεχνικά χαρακτηριστικά και αστοχίες των Υπολογισμών Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας

Αν και οι υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας FEP βασίζονται στις αρχές της στατιστικής μηχανικής μπορούν να αποτύχουν για πολλούς λόγους στην πράξη.¹²² Η αποτελεσματική χρήση του μοριακού σχεδιασμού απαιτεί την κατανόηση των περιορισμών των υπάρχοντων πρωτοκόλλων, τα οποία σε γενικές γραμμές, εκδηλώνονται επηρεάζοντας την πιστότηταⁱ (*precision*) ή την ακρίβειαⁱⁱ (*accuracy*). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται εν συντομία κάποια σημαντικά τεχνικά σημεία και γενικά χαρακτηριστικά που χαρακτηρίζουν τους υπολογισμούς ελεύθερης ενέργειας.¹³⁰

ⁱ Η πιστότητα ενός συστήματος μέτρησης σχετίζεται με την επαναληψιμότητα και τη δυνατότητα αναπαραγωγής των μετρήσεων, και εκφράζει το βαθμό στον οποίο επαναλαμβανόμενες μετρήσεις για ένα μέγεθος υπό αμετάβλητες συνθήκες δίνουν τα ίδια αποτελέσματα.

ⁱⁱ Η ακρίβεια ενός συστήματος μέτρησης εκφράζει το βαθμό εγγύτητας των μετρήσεων για ένα μέγεθος στην πραγματική τιμή του μεγέθους αυτού.

- 1) Οι υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας με λ -προσομοιώσεις βασίζονται σε θεμέλια της στατιστικής μηχανικής. Μια μέθοδος λ -προσομοίωσης είναι περίπλοκη από τεχνικής πλευράς και πολύ απαιτητική υπολογιστικά κατά την εφαρμογή της σε συστήματα που περιλαμβάνουν οργανικά και βιολογικά μόρια, αφού κάθε υπολογισμός περιλαμβάνει αρκετές προσομοιώσεις με ενδιάμεσα δυναμικά.
- 2) Σημαντικά σφάλματα προκύπτουν και από ανακρίβειες στη διατύπωση του χρησιμοποιούμενου δυναμικού, το οποίο είναι συνήθως ένα δυναμικό πεδίου δυνάμεων.
- 3) Δυστυχώς, η δειγματοληψία της κατάστασης A και η δειγματοληψία του χώρου φάσης του συστήματος B δεν καλύπτεται πάντα και ο υπολογισμός αξιόπιστων τιμών ελεύθερης ενέργειας δεν είναι πάντα εφικτός.¹³¹
- 4) Ένα σημαντικό μειονέκτημα των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας, στις περισσότερες προσομοιώσεις πολύπλοκων συστημάτων, είναι η απουσία ουσιαστικού τρόπου ανάλυσης του σφάλματος που προέρχεται από ανεπαρκή δειγματοληψία του χώρου φάσης. Προσομοιώσεις, όπως για παράδειγμα με τη μέθοδο FEP, αποτελούνται από 10 ή περισσότερες επιμέρους προσομοιώσεις, των οποίων τα σφάλματα αναμένεται να σχετίζονται στενά και να συναθροίζονται στο συνολικό σφάλμα. Επιπροσθέτως, το υπολογιστικό κόστος αυτών των προσομοιώσεων είναι πολύ μεγάλο ώστε πολλές φορές είναι ασύμφορο μία προσομοίωση είτε να εκτελεστεί με μεγαλύτερη διάρκεια, ώστε να εκτιμηθεί η σύγκλιση της ελεύθερης ενέργειας, είτε να επανεκτελεστεί με διαφορετικές αρχικές συνθήκες.
- 5) Ένας πολύ προσεγγιστικός έλεγχος του σφάλματος της μεθόδου περιλαμβάνει την πραγματοποίηση της προσομοίωσης με πρόσθια ($X \rightarrow Y$) και της προσομοίωσης με αντίστροφη δειγματοληψία ($Y \rightarrow X$) και την εκτίμηση της υστέρησης στη διαφορά στις τιμές των ελευθέρων ενεργειών $\Delta\Delta G$ ως κάτω όριο του σφάλματος.
- 6) Από πλευράς φορμαλισμού πολλά χαρακτηριστικά των υπολογισμών FEP προσφέρονται περισσότερο για την κωδικοποίηση στον υπολογιστή ενός σχήματος δειγματοληψίας MC παρά ενός σχήματος MD. Παρόλα αυτά όταν οι προσομοιώσεις MC εφαρμόζονται σε μεγάλα εύκαμπτα μόρια δίνουν ανεπαρκή αποτελέσματα, επειδή οι περισσότερες κινήσεις απορρίπτονται ως μη ενεργειακά ευνοϊκές, με αποτέλεσμα οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής να είναι η συνηθέστερη επιλογή.
- 7) Κατά την εφαρμογή της προσέγγισης δυαδικής τοπολογίας προκύπτουν μεγάλα σφάλματα από την κακή συμπεριφορά της συνάρτησης για συγκεκριμένο λ (προκύπτουν μεγάλα απωστικά δυναμικά σε περιοχές που εμφανίζονται ή εξαφανίζονται άτομα που συμμετέχουν

στη μετάλλαξη), που μπορεί να αντιμετωπιστεί επιτρέποντας διαφορετικά μονοπάτια μετάλλαξης, όπως περιγράφει η εξίσωση (5.14) ως γενικευμένη μορφή της εξίσωσης (5.7).

$$V(\lambda) = \lambda^n V_B + (1 - \lambda)^n V_A \quad (5.14)$$

Όπως δημοσιεύθηκε από την ερευνητική ομάδα του van Gunsteren,¹³² το πρόβλημα της κακής συμπεριφοράς του δυναμικού μπορεί να αντιμετωπιστεί αν στην παραπάνω εξίσωση το n είναι τουλάχιστον 4.

- 8) Επειδή η εξισορρόπηση των μορίων νερού στην περιοχή πρόσδεσης είναι δύσκολη, ειδικά όταν η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε μόρια νερού, είναι δυνατό οι υπολογισμοί FEP να οδηγήσουν σε μεγάλα σφάλματα λόγω λανθασμένης κατανομής των μορίων νερού.¹³³ Για τον περιορισμό του υπολογιστικού κόστους έχουν αναπτυχθεί σχήματα FEP όπου τα υπόλοιπα μόρια νερού περιγράφονται από συνεχή μοντέλα διάλυσης.^{134,135}
- 9) Η μέθοδος FEP αποτελεί την ακριβέστερη μέθοδο υπολογισμού σχετικών ελευθέρων ενεργειών σύνδεσης με σφάλμα 1 kcal/mol. Όμως οι υπολογισμοί είναι πολύ απαιτητικοί. Για να εξαχθεί το αποτέλεσμα $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ μεταξύ δύο προσδετών X και Y, πρέπει να υπολογιστούν πολλαπλές τιμές ελεύθερης ενέργειας για τα ενδιάμεσα στάδια, και κάθε τιμή ΔG με τη σειρά της απαιτεί πλήρη δειγματοληψία των βαθμών ελευθερίας πρωτεϊνών, συμπλόκων και του διαλύτη. Ως γενικός κανόνας, για την επίτευξη ικανοποιητικής ακρίβειας στις σχετικές τιμές ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης για παρόμοιους προσδέτες απαιτούνται περίπου 10 προσομοιώσεις λ ενδιάμεσων σταδίων. Στο παρελθόν κάθε λ -προσομοίωση είχε διάρκεια περίπου μία ημέρα. Για τις ερευνητικές ομάδες στη βιομηχανία, σχετικά με την εφαρμογή των υπολογισμών διαφορών ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης ως εργαλείο πρόβλεψης, επικρατεί ο κανόνας πως αν ένας υπολογισμός απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο για τη μελέτη μιας υποψήφιας φαρμακοφόρου ομάδας από το χρόνο που χρειάζεται η σύνθεση και ο φαρμακολογικός έλεγχος, τότε ο υπολογισμός δεν πραγματοποιείται. Έτσι, οι υπολογισμοί αυτού του τύπου εφαρμόστηκαν στο παρελθόν σε ακαδημαϊκά εργαστήρια, αλλά δεν ήταν δημοφιλείς στη φαρμακευτική βιομηχανία.
- 10) Η ιδέα για τον υπολογισμό FEP της μετατροπής ενός μορίου X σε ένα άλλο Y¹²⁹ και της εφαρμογής της μεθόδου FEP σε υπολογισμούς πρόσδεσης¹³⁶ διατυπώθηκε είκοσι χρόνια πριν από τον Jorgensen. Μέχρι το 2000 περίπου, οι υπολογισμοί FEP έβρισκαν κυρίως εφαρμογή στην επιβεβαίωση πειραματικών δεδομένων για μικρό αριθμό αναστολέων εξαιτίας του υψηλού υπολογιστικού κόστους. Σήμερα, εξαιτίας της εξέλιξης στην υπολογιστική ισχύ, οι υπολογισμοί FEP δείχνουν ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για το σχεδιασμό φαρμακομορίων με βάση τη δομή του υποδοχέα (structure-based drug design).

5.6 Εμπειρικές προσεγγίσεις υπολογισμού ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης - Υπολογισμοί ελλιμενισμού

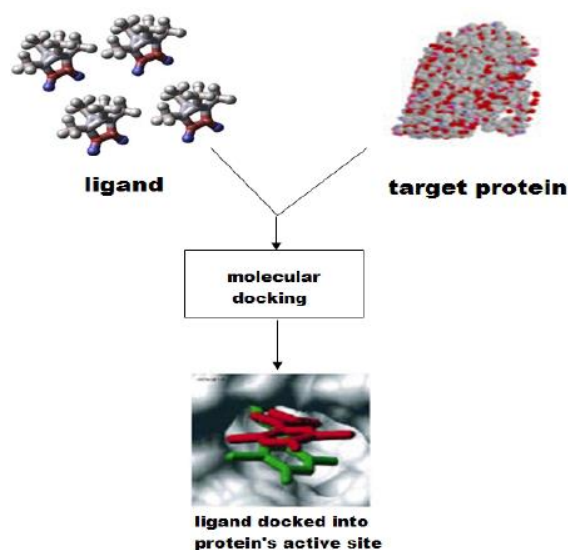
5.6.1 Γενικά

Ο σκοπός των υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού (molecular docking) με προσεγγιστικές συναρτήσεις δυναμικής ενέργειας για την περιγραφή της διαμοριακής αλληλεπίδρασης ή συναρτήσεις βαθμολογίας (scoring functions) είναι η πρόβλεψη σύνδεσης ενός φαρμακομορίου με τον υποδοχέα και η εκτίμηση της συγγένειας σύνδεσης. Η τιμή της δυναμικής, διαμοριακής ενέργειας αλληλεπίδρασης προσδέτη – υποδοχέα παρέχει ένα μέτρο της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης.¹³⁷ Καθώς η φυσική γεωμετρία του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα μπορεί γενικά να υποθεθεί ότι αντιστοιχεί στο ολικό ελάχιστο της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης, ο μοριακός ελλιμενισμός ουσιαστικά αποτελεί ένα πρόβλημα υπολογισμού της ενέργειας. Αυτό συμβαίνει διότι στις διαμορφώσεις σύνδεσής τους, τα μόρια -τόσο ο υποδοχέας όσο και ο προσδέτης- επιδεικνύουν γεωμετρική και χημική συμπληρωματικότητα που είναι απαραίτητες για τη φαρμακολογική δράση.

Παραπάνω αναπτύχθηκε η μέθοδος FEP η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποδοτικά σχετικά για τον υπολογισμό της σχετικής ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης. Λόγω του υψηλού υπολογιστικού κόστους χρειάζονται προσεγγιστικοί υπολογισμοί, α) για την εύρεση του ενεργειακού ελαχίστου για κάθε προσδέτη και β) τη σύγκριση της ενέργειας σύνδεσης με άλλους προσδέτες, ώστε να επιλυθεί το πρόβλημα μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Παραδείγματος χάριν α) η χρήση μεθόδων πεδίου δυνάμεων μοριακής μηχανικής για την αξιολόγηση της ενέργειας σύνδεσης μεταξύ προσδέτη και της συνήθως μικρής περιοχής σύνδεσης του υποδοχέα σε συνδυασμό β) με τη διατήρηση αμετάβλητων βαθμών ελευθερίας στο υπόλοιπο σύστημα αποτελεί μια μεθοδολογία που συνεχίζει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων από χημειοθήκες έναντι ενός υποδοχέα.¹³⁸

Δηλαδή οι υπολογισμοί μοριακού ελλιμενισμού χρησιμοποιούνται ευρέως από τη φαρμακευτική βιομηχανία στο σχεδιασμό φαρμακομορίων για τη βελτιστοποίηση ενώσεων-οδηγών αλλά και σε μελέτες εικονικής δοκιμής (*Virtual Screening*) χημειοθηκών μορίων προς εύρεση νέων βιολογικά δραστικών μορίων. Οι υπολογισμοί αυτοί χαρακτηρίζονται για την ταχύτητά τους και το σχετικά χαμηλό υπολογιστικό τους κόστος και κάποιες φορές την επιτυχία στο να διακρίνουν υποψήφια μόρια-προσδέτες για έναν υποδοχέα από χημειοθήκες εκατομμυρίων μορίων. Σαφώς μειονεκτούν ως προς την ακρίβεια ή την ευαισθησία τους, όπου υπερτερούν οι πιο χρονοβόρες και υψηλού

υπολογιστικού κόστους μέθοδοι υπολογισμού ελεύθερης ενέργειας π.χ. η μέθοδος διατάραξης ελεύθερης ενέργειας.^{139,140}



Εικόνα 5.5¹⁴⁰: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας μοριακού ελλιμενισμού.

5.6.2 Βασικές αρχές μοριακού ελλιμενισμού

Συνοψίζοντας τα προηγούμενα, οι υπολογισμοί μοριακού ελλιμενισμού εστιάζουν στην υπολογιστική προσομοίωση της διαδικασίας μοριακής αναγνώρισης του προσδέτη από τον υποδοχέα (σχ. 4.5). Ο σκοπός των υπολογισμών ελλιμενισμού είναι η επίτευξη της βέλτιστης διαμόρφωσης σύνδεσης κυρίως για τον προσδέτη (λίγες βελτιωμένες μέθοδοι επιδιώκουν και τη βελτιστοποίηση μικρής περιοχής του υποδοχέα) ώστε η δυναμική ενέργεια όλου του συστήματος να ελαχιστοποιείται.¹⁴⁰ Αυτό σημαίνει ότι μια επιτυχημένη μέθοδος υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού πρέπει⁵:

- 1) Να μπορεί να προβλέψει σωστά τη φυσική διαμόρφωση του προσδέτη εντός της θέσης σύνδεσης του υποδοχέα χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο αλγόριθμο ελλιμενισμού. Αν υπάρχει πειραματική δομή κάποιου προσδέτη με τον υποδοχέα (π.χ. από κρυσταλλογραφία ακτίνων-X, NMR), ελέγχεται αν η μέθοδος μπορεί να προβλέψει συνήθως με $RMSD < 2 \text{ \AA}$ την πειραματική γεωμετρία του μορίου-προσδέτη και τις σχετικές μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις (δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις van der Waals κλπ).

2) Χρησιμοποιώντας την κατάλληλη συνάρτηση βαθμολογίας να κατατάσσει σωστά τα μόρια μιας ομάδας προσδετών με γνωστές πειραματικές σταθερές σύνδεσης με τον μελετώμενο υποδοχέα (σωστή βαθμολόγηση, scoring).¹⁴¹

3) Αν ισχύουν οι παραπάνω δύο προϋποθέσεις, η μέθοδος είναι πιθανό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη διερεύνηση μεγάλων χημειοθηκών ενώσεων ώστε να μπορεί να διακρίνει επιτυχώς μόρια προσδέτες από άλλα αδρανή για τον υπό εξέταση υποδοχέα. Τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες ορθολογικού σχεδιασμού φαρμακομορίων.

Τα βασικά εργαλεία μίας μεθόδου υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού για την δημιουργία και την αξιολόγηση των διαμορφώσεων ενός υποψηφίου μορίου-προσδέτη είναι ο αλγόριθμος μοριακού ελλιμενισμού και η συνάρτηση βαθμολογίας (fitness or scoring function).

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί μιας ομάδας αμινοαδαμαντανικών παραγώγων έναντι του υποδοχέα A/M2TM με το πρόγραμμα Gold και τις συναρτήσεις βαθμολογίας Goldscore, Chemscore και ASP. Στη συνέχεια θα αναλυθούν τα βασικά χαρακτηριστικά των μεθόδων ελλιμενισμού και θα γίνει συζήτηση για τους αλγορίθμους ελλιμενισμού και συναρτήσεις βαθμολογίας που χρησιμοποιεί το πρόγραμμα Gold.

5.6.3 Αλγόριθμοι μοριακού ελλιμενισμού

Οι αλγόριθμοι μοριακού ελλιμενισμού (αλγόριθμοι εύρεσης) χρησιμοποιούνται για την διερεύνηση της Επιφάνειας Δυναμικής Ενέργειας ώστε να εντοπίσουν τις βέλτιστες διαμορφώσεις προσδέτη-υποδοχέα. Όπως αναφέρθηκε, εάν η προσομοίωση της θερμοδυναμικής συμπεριφοράς του συστήματος είναι ακριβής, τότε το ολικό ελάχιστο της Επιφάνειας Δυναμικής Ενέργειας θα αντιστοιχεί στην πειραματική διαμόρφωση του βιομοριακού συμπλόκου. Λόγω της παράβλεψης πολλών βαθμών ελευθερίας κατά την εκτέλεση των υπολογισμών (π.χ. ο υποδοχέας παραμένει άκαμπτος) ο ακριβής προσδιορισμός της ενθαλπικής αλλά κυρίως της εντροπικής συνιστώσας είναι ανεπαρκής. Συνεπώς, δεν είναι βέβαιο ότι το ολικό ελάχιστο της Επιφάνειας Δυναμικής Ενέργειας του συστήματος όπως ανιχνεύεται από τους υπολογισμούς μοριακού ελλιμενισμού, θα αντιστοιχεί πράγματι στην πειραματική διαμόρφωση σύνδεσης.

Οι τρεις κύριες στρατηγικές σχετικά με την ευκαμψία υποδοχέα και προσδέτη που χρησιμοποιούνται από τις μεθόδους μοριακού ελλιμενισμού είναι:

1. Ο υποδοχέας θεωρείται ότι είναι άκαμπτος, και μόνο βαθμοί ελευθερίας από μετατόπιση και περιστροφή του προσδέτη διερευνώνται, δηλαδή ο προσδέτης θεωρείται ως ένα άκαμπτο σώμα χωρίς εσωτερικούς βαθμούς ελευθερίας (rigid docking).
2. Ο υποδοχέας θεωρείται άκαμπτος, και όλοι οι βαθμοί ελευθερίας του προσδέτη διερευνώνται, δηλαδή μετατοπίσεως, περιστροφής και διαμόρφωσης (flexible docking). Αυτή η διαδικασία είναι η συνηθέστερη από τους τρέχοντες αλγόριθμους.
3. Ο υποδοχέας θεωρείται εντελώς ή μερικώς εύκαμπτος και όλοι οι βαθμοί ελευθερίας του προσδέτη διερευνώνται (full flexible docking).¹³⁹

Οι αλγόριθμοι ελλιμενισμού ταξινομούνται με βάση τη μέθοδο διερεύνησης που χρησιμοποιούν για να πραγματοποιήσουν ανάλυση διαμόρφωσης του προσδέτη εντός της περιοχής σύνδεσης δηλαδή για να υπολογίσουν την ευκαμψία του προσδέτη. Οι δύο βασικές κατηγορίες είναι: Συστηματικοί αλγόριθμοι ελλιμενισμού και στοχαστικοί αλγόριθμοι ελλιμενισμού.¹⁴²

- 1) Οι συστηματικοί αλγόριθμοι ελλιμενισμού διερευνούν όλα τα είδη βαθμών ελευθερίας του προσδέτη. Κατηγοριοποιούνται περαιτέρω σε εξαντλητικούς (exhaustive) αλγορίθμους, αλγορίθμους τμηματικής κατασκευής (incremental construction) και αλγορίθμους συνόλου διαμορφώσεων (conformational ensemble).
 - i. Οι εξαντλητικοί αλγόριθμοι συστηματικά διερευνούν τις τιμές όλων των βαθμών ελευθερίας του προσδέτη με ένα συνδυαστικό τρόπο, περιστρέφοντας όλες τις διέδρες γωνίες του προσδέτη.¹⁴³ Τέτοιους αλγορίθμους χρησιμοποιούν τα προγράμματα Glide¹⁴⁴ και eHiTS¹⁴⁵.
 - ii. Οι αλγόριθμοι τμηματικής κατασκευής^{146,147} ακολουθούν μια προσέγγιση θραυσματοποίησης (fragmentation approach) που βασίζεται στην κατάτμηση του προσδέτη σε μικρότερα βασικά θραύσματα τα οποία υφίστανται μοριακό ελλιμενισμό στον υποδοχέα. Η διαμόρφωση σύνδεσης του προσδέτη στη συνέχεια ανακατασκευάζεται σταδιακά με ομοιοπολική σύνδεση των βασικών θραυσμάτων μεταξύ τους. Τέτοιους αλγορίθμους χρησιμοποιούν τα προγράμματα FlexX¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ και Hammerhead¹⁵¹.
 - iii. Οι αλγόριθμοι συνόλου διαμορφώσεων εφαρμόζουν άκαμπτο ελλιμενισμό στη θέση σύνδεσης, για ένα σύνολο διαμορφώσεων του προσδέτη που έχει παραχθεί πρωτύτερα. Τέτοιους αλγορίθμους χρησιμοποιούν τα προγράμματα FLOG¹⁵² and DOCK 4.0¹⁵³.
- 2) Οι στοχαστικοί αλγόριθμοι ελλιμενισμού μεταβάλλουν με τυχαίο τρόπο όλα τα είδη βαθμών ελευθερίας του προσδέτη σε κάθε βήμα, παράγοντας έτσι πληθώρα αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά (διαμορφώσεις του προσδέτη στη θέση σύνδεσης) αξιολογούνται με ένα πιθανοτικό κριτήριο για να αποφασιστεί κατά πόσον το καθένα από αυτά πρέπει να απορριφθεί ή όχι. Οι κυριότερες κατηγορίες τέτοιων κριτηρίων που εφαρμόζονται στους υπολογισμούς

προσάραξης αντιστοιχούν στη μέθοδο Monte Carlo (MC) (π.χ. προγράμματα Prodock¹⁵⁴ και ICM¹⁵⁵) σε εξελικτικούς αλγόριθμους (evolutionary algorithms – EA) κλπ.

Οι αλγόριθμοι EA είναι μέθοδοι έρευνας που βασίζονται στη θεωρία της εξέλιξης των βιολογικών πληθυσμών μέσω της φυσικής επιλογής για να λάβουν τις βέλτιστες λύσεις για ένα συγκεκριμένο πρόβλημα^{156,157}. Μια σημαντική κατηγορία αλγορίθμων EA είναι οι γενετικοί αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται από τα προγράμματα GOLD¹⁵⁸ και AutoDock¹⁵⁹. Στους αλγόριθμους αυτούς χρησιμοποιούνται «χρωμοσωμικοί» κώδικες των εσωτερικών συντεταγμένων (π.χ. διέδρες γωνίες) και των συντεταγμένων προσανατολισμού του προσδέτη εντός της περιοχής σύνδεσης του υποδοχέα.^{160–162}

Αρχικά, δημιουργείται ένας πληθυσμός πιθανών λύσεων μ , που αντιστοιχεί σε τυχαία επιλογή συντεταγμένων. Ο προσανατολισμός και οι εσωτερικές συντεταγμένες μεταβάλλονται και έτσι εξελίσσονται οι πληθυσμοί των λύσεων. Ο νέος πληθυσμός επιλέγεται βάσει τυχαίου ανασυνδυασμού του «χρωμοσώματος» συντεταγμένων και τη βαθμολογία κάθε προηγούμενης σύνδεσης της ένωσης που γίνεται με μια συνάρτηση βαθμολογίας π.χ. οι τιμές των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων ενός πεδίου δυνάμεων MM. Οι απόγονοι πληθυσμοί εξελίσσονται σε καλύτερες λύσεις μέχρι συγκλίσεως.

Πολλές φορές η εφαρμογή ελαχιστοποίησης ενέργειας ή μοριακής δυναμικής σε μια αρχική διαμόρφωση με στόχο την βελτιστοποίηση της διαμόρφωσης σύνδεσης χαρακτηρίζεται ως ντετερμινιστικός αλγόριθμος ελλιμενισμού διότι το αποτέλεσμα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αρχική διαμόρφωση σύνδεσης.¹³⁹

Ας αναφερθεί ότι μια πρωτεΐνη στο περιβάλλον της περιλαμβάνει ένα σύνολο διαμορφώσεων και ο προσδέτης συνδέεται με μία από αυτές τις διαμορφώσεις από το σύνολο, μετατοπίζοντας την ισορροπία του πληθυσμού προς μια συγκεκριμένη διαμόρφωση του βιομοριακού συμπλόκου.^{163–167}

Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη αλγορίθμων αναζήτησης και στρατηγικών δειγματοληψίας που λαμβάνουν υπόψη την ευκαμψία της πρωτεΐνης αποτελεί πρόκληση για τους υπολογισμούς μοριακού ελλιμενισμού. Αναφέρονται οι εξής στρατηγικές που προοδευτικά λαμβάνουν υπόψη περισσότερο την ευκαμψία της πρωτεΐνης π.χ. α) εφαρμογή μαλακών δυναμικών Lennard-Jones (soft docking) που επιτρέπουν μικρές επικαλύψεις van der Waals μεταξύ ατόμων της πρωτεΐνης και των ατόμων του προσδέτη ώστε να περιγραφούν μικρές αλλαγές στη διαμόρφωση (ατομικές διακυμάνσεις μέχρι 1 Å) β) ευκαμψία πλευρικής αλυσίδας στην περιοχή σύνδεσης (side-chain flexibility) γ) προσομοιώσεις Monte Carlo ή μοριακής δυναμικής για τη βελτιστοποίηση της διαμόρφωσης σύνδεσης (molecular relaxation) δ) υπολογισμούς ελλιμενισμού ενός προσδέτη σε διαφορετικές διαμορφώσεις της πρωτεΐνης (ensemble docking) που είναι διαθέσιμες από

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, κρυσταλλογραφία ακτίνων-X ή προσομοιώσεις MD κλπ

5.6.4 Συναρτήσεις βαθμολογίας

Όπως περιγράφηκε, οι αλγόριθμοι προσάραξης, γενικά, παράγουν ένα μεγάλο αριθμό λύσεων (διαμορφώσεις σύνδεσης) που πρέπει να αξιολογηθούν. Οι συναρτήσεις βαθμολογίας είναι απλές αναλυτικές εκφράσεις που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουν τη ισχύ των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ δυο μορίων (π.χ. προσδέτη-υποδοχέα) αφότου έχει πραγματοποιηθεί ο ελλιμενισμός.

Η συνάρτηση βαθμολογίας στοχεύει στο να μπορεί να επιτύχει τα 1 και 2 στο εδάφιο 4.6.2 που είναι σημαντικά ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μια διαδικασία εικονικής δοκιμής μιας χημειοθήκης. Αν επίσης η συνάρτηση βαθμολογίας είναι ικανή να πετύχει την κατάταξη ενός ή περισσότερων προσδετών με βάση τη πειραματική συγγένεια σύνδεσής τους για διαφορετικές όμως πρωτεΐνες, αυτό αποτελεί κριτήριο για να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση της εκλεκτικότητας και της εξειδίκευσης.¹³⁸

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει μια "παγκόσμια" συνάρτηση βαθμολόγησης που μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία σε όλες τις μελέτες μοριακού ελλιμενισμού για όλα τα σύνολα προσδετών-πρωτεϊνών. Για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα και η αξιοπιστία των υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού, η στρατηγική που έχει βρεθεί ότι αποδίδει και αναφέρεται πιο συχνά είναι να εντοπιστεί και να χρησιμοποιηθεί η συνάρτηση βαθμολόγησης που είναι καλύτερα προσαρμοσμένη στο σύστημα υπό έρευνα, οπότε παράγει σωστά διαμορφώσεις σύνδεσης και σχετικές σταθερές σύνδεσης γνωστών προσδετών.¹³⁹

Οι συναρτήσεις βαθμολόγησης μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κύριες κατηγορίες (σχ. 2)^{168,169}: Συναρτήσεις πεδίου δυνάμεων, εμπειρικές συναρτήσεις και στατιστικές ή γνωστικές (knowledge-based) συναρτήσεις:

1) Οι συναρτήσεις πεδίου δυνάμεων προκύπτουν από ένα κλασικό πεδίο δυνάμεων δηλαδή αποτελούνται από ένα άθροισμα ενεργειακών όρων προέλευσης μοριακής μηχανικής. Αυτό το είδος συνάρτησης βαθμολόγησης λαμβάνει υπόψιν συνήθως τις ενέργειες αλληλεπίδρασης του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη (μη ομοιοπολικοί δεσμοί) και την εσωτερική ενέργεια του προσδέτη (ομοιοπολικοί και μη ομοιοπολικοί δεσμοί). Ένα παράδειγμα τέτοιας συνάρτησης

βαθμολογίας αποτελεί η **GoldScore**^{158,170} που χρησιμοποιείται από το λογισμικό GOLD περιέχει επίσης όρους MM όπως φαίνεται στην εξίσωση (5.15).

$$\begin{aligned} \Delta G \cong V_{\text{interaction}} &= V_{\text{complex}} + V_{\text{H-bond}} + V_{\text{internal}} \\ &= \sum_{\text{protein}} \sum_{\text{ligand}} \left(\frac{A_{ij}}{d_{ij}^8} - \frac{B_{ij}}{d_{ij}^4} \right) + \sum_{\text{protein}} \sum_{\text{ligand}} [(V_{da} + V_{ww}) - (V_{dw} + V_{aw})] \\ &+ \left\{ \sum_{\text{ligand}} \left(\frac{C_{ij}}{d_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{d_{ij}^6} \right) + \sum_{\text{ligand}} \frac{1}{2} V \left[1 + \frac{n}{|n|} \cos(|n| \omega) \right] \right\} \quad (5.15) \end{aligned}$$

Ο όρος V_{complex} ή υπολογίζεται με βάση ένα παραμετροποιημένο, μαλακό δυναμικό Lennard-Jones, το οποίο επιτρέπει την πλησιέστερη προσέγγιση των σφαιρών van der Waals. Ως εκ τούτου, το δυναμικό van der Waals του λογισμικού GOLD ευνοεί τον ευκολότερο σχηματισμό κοντινών επαφών μεταξύ υδρόφοβων ομάδων. Ο υπολογισμός του δεύτερου όρου $V_{\text{H-bond}}$ βασίζεται στον προσδιορισμό του δυναμικού ζεύγους $V_{\text{pair}} = (V_{da} + V_{ww}) - (V_{dw} + V_{aw})$ οι οποίο περιλαμβάνει συνιστώσες που αφορούν την ενέργεια που σχετίζεται με τη μεταφορά της ομάδας δότη (donor, d) και δέκτη (acceptor, a) από το διάλυμα – που αλληλεπιδρούν με το νερό – στην κατάσταση της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης μέσω δεσμών υδρογόνου ή ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, οπότε εκτοπίζονται τα μόρια νερού. Η ενέργεια V_{da} είναι άθροισμα δυναμικών Lennard-Jones κατάλληλα ρυθμισμένων για αυτήν την αλληλεπίδραση από όλα τα ζεύγη δότη – δέκτη του συμπλόκου. Η εσωτερική στερική ενέργεια του προσδέτη V_{internal} στην εξίσωση (5.15) περιλαμβάνει ένα δυναμικό διασποράς – άπωσης Lennard-Jones κι ένα δυναμικό στρέψης από το πεδίο δυνάμεων Tripos. Η συνάρτηση βαθμολογίας αρχικά βαθμονομήθηκε ώστε να μπορεί να αναπαράγει τις θέσεις και προσανατολισμούς πρόσδεσης για 100 σύμπλοκα πρωτεΐνης – προσδέτη.

- 2) Οι εμπειρικές συναρτήσεις βασίζονται στην ιδέα ότι είναι δυνατό να συσχετισθεί η ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης με ένα σταθμισμένο άθροισμα ανεξάρτητων ενεργειακών συνιστωσών. Μια εμπειρική συνάρτηση βαθμολόγησης μπορεί να αναλυθεί σε διάφορους όρους που σχετίζονται με συγκεκριμένες ενεργειακές συνιστώσες π.χ. αλληλεπιδράσεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου, εντροπία κλπ¹⁷¹, και μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$\Delta G_{\text{binding}} = c_1 \Delta G_{\text{vdW}} + c_2 \Delta G_{\text{H-bond}} + c_3 \Delta G_{\text{entropy}} \quad (5.16)$$

όπου οι όροι c_i είναι οι συντελεστές στάθμισης που λαμβάνονται από τον αντίστοιχο όρο ΔG .

Οι συντελεστές που σχετίζονται με τους όρους της συνάρτησης μπορούν να ληφθούν μέσω ανάλυσης παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας γνωστά δεδομένα συγγένειας σύνδεσης από πειραματικά προσδιορισμένες δομές.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας συνάρτησης είναι η ChemScore^{172,173} που χρησιμοποιείται από το λογισμικό GOLD:

$$\Delta G_{\text{binding}} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{H-bond}} \sum_{il}^{\text{atoms}} [g_1(\Delta r) g_2(\Delta \alpha)] + \Delta G_{\text{metal}} \sum_{aM} f(r_{aM}) + \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{lL} f(r_{lL}) + \Delta G_{\text{rot}} H_{\text{rot}} \quad (5.17)$$

όπου ΔG_0 είναι σταθερά, ανεξάρτητη του συστήματος, που αντιστοιχεί στην αλλαγή της μεταφορικής και περιστροφικής ελεύθερης ενέργειας κατά τη σύνδεση, $\Delta G_{\text{H-bond}}$ αντιστοιχεί στη συνεισφορά από έναν ιδανικό δεσμό υδρογόνου, ΔG_{metal} είναι η συνεισφορά από τη συναρμογή του προσδέτη με μέταλλο εντός του υποδοχέα (π.χ. στην περίπτωση μελέτη μεταλλικών κέντρων), ΔG_{lipo} είναι η συνεισφορά από λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις, ΔG_{rot} η απώλεια ελεύθερης ενέργειας που οφείλεται στο «πάγωμα» της περιστροφής των δεσμών του φαρμακορίου λόγω πρόσδεσης με τον υποδοχέα.

Ο συντελεστής στάθμισης των δεσμών υδρογόνου $\sum_{il} [g_1(\Delta r) g_2(\Delta \alpha)]$ υπολογίζεται για όλες τις συμπληρωματικές πιθανότητες σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ατόμων του προσδέτη, i , και των ατόμων του υποδοχέα, l . Οι συναρτήσεις g_1 και g_2 είναι οι ίδιες με την συνάρτηση βαθμολογίας του Böhm¹⁷⁴:

$$g_1(\Delta r) = \begin{cases} 1 & \text{if } \Delta r \leq 0.25 \text{ \AA} \\ 1 - (\Delta r - 0.25)/0.4 & \text{if } 0.25 \text{ \AA} < \Delta r \leq 0.65 \text{ \AA} \\ 0 & \text{if } \Delta r > 0.65 \text{ \AA} \end{cases} \quad (5.18)$$

$$g_2(\Delta \alpha) = \begin{cases} 1 & \text{if } \Delta \alpha \leq 30^\circ \\ 1 - (\Delta \alpha - 30)/50 & \text{if } 30^\circ < \Delta \alpha \leq 50^\circ \\ 0 & \text{if } \Delta \alpha > 50^\circ \end{cases} \quad (4.19)$$

Όπου Δr είναι η απόκλιση του μήκους του δεσμού υδρογόνου $\text{H}\cdots\text{O}/\text{N}$ από την πρότυπη τιμή των 1.85 \AA και $\Delta \alpha$ είναι η απόκλιση της γωνίας δεσμού υδρογόνου $\text{N}/\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}/\text{N}$ από την πρότυπη τιμή των 180° . Ο συντελεστής στάθμισης του μετάλλου, $\sum_{aM} f(r_{aM})$, υπολογίζεται για

όλα τα άτομα δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων συναρμογής του προσδέτη, α , και για τα όποια άτομα μετάλλου (αν υπάρχουν) στον υποδοχέα, M .

Ο συντελεστής στάθμισης της λιποφιλίας $\sum_{IL} f(r_{IL})$ υπολογίζεται για όλα τα λιπόφιλα άτομα του προσδέτη, I , και όλα τα λιπόφιλα άτομα του υποδοχέα, L . Η συνάρτηση $f(r)$ είναι συντελεστής επαφής, όπου $r_{\alpha M}, r_{IL}$ οι αποστάσεις σε Å μεταξύ των παραπάνω ατόμων του προσδέτη και του υποδοχέα. Ο συντελεστής στάθμισης H_{rot} εκφράζει το «πάγωμα» της περιστροφής των δεσμών του προσδέτη λόγω σύνδεσης με τον υποδοχέα.

$$H_{\text{rot}} = 1 + \left(1 - \frac{1}{N_{\text{rot}}}\right) \sum_r \frac{P_{nl}(r) + P'_{nl}(r)}{2} \quad (5.20)$$

όπου N_{rot} είναι ο αριθμός των «παγωμένων» περιστρεφόμενων δεσμών, και $P_{nl}(r)$ και $P'_{nl}(r)$ είναι τα ποσοστά των μη λιπόφιλων βαρέων ατόμων σε κάθε πλευρά του περιστρεφόμενου δεσμού.¹⁷²

- 3) Οι στατιστικές συναρτήσεις (*statistical or knowledge – based scoring functions*) βασίζονται στη γνώση στατιστικών δεδομένων. Η συναρτησιακή τους μορφή διατυπώνεται βάσει π.χ. της γνώσης κατανομής ή της συχνότητας ύπαρξης αποστάσεων μεταξύ συγκεκριμένων ζευγών ατόμων σε πειραματικές δομές προσδέτη – πρωτεΐνης.^{168,175} Αφού, λοιπόν, περιγραφούν οι πιθανότερες αποστάσεις μικρής εμβέλειας μεταξύ προσδέτη και πρωτεΐνης στις πειραματικές δομές, κατασκευάζονται εμπειρικές συναρτήσεις ελεύθερης ενέργειας διατομικής αλληλεπίδρασης, των οποίων η άθροιση δίνει μια εκτίμηση της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης¹⁷⁶.

Χρησιμοποιώντας π.χ. τον φορμαλισμό του Sippl¹⁷⁷ με τη γνώση της συχνότητας ή πιθανοτικής κατανομής των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων i και j , μπορούν να κατασκευαστούν τα εξαρτώμενα της απόστασης δυναμικά μέσης δύναμης (*potentials of mean force*) ή ζευγωτά δυναμικά, σύμφωνα με τις εξισώσεις (5.21) και (5.22)

$$\Delta W_{ij}(r) = W_{ij}(r) - W(r) = -\ln \frac{g_{ij}(r)}{g(r)} \quad (5.21)$$

$$g(r) = \sum_i \sum_j g_{ij}(r) \quad (5.22)$$

Όπου $g_{ij}(r)$ η κανονικοποιημένη ακτινική συνάρτηση κατανομής για τα άτομα τύπου i, j , που η μεταξύ τους απόσταση βρίσκεται στο διάστημα $[r, r + dr]$ και $g(r)$ η κανονικοποιημένη μέση ακτινική συνάρτηση κατανομής για οποιαδήποτε άτομα στο διάστημα $[r, r + dr]$. Η τελευταία αφορά στην κατάσταση στο διάλυμα πριν τον σχηματισμό του συμπλόκου με τον προσδέτη, και περιλαμβάνει όλη την «μη ειδική» πληροφορία, η οποία είναι κοινή για όλα τα ζεύγη ατόμων

που υπάρχουν στο περιβάλλον της πρωτεΐνης. Η επιλογή της είναι κρίσιμη και διαφέρει στα διάφορα δυναμικά.

Σύμφωνα με την εξίσωση (5.21), η αμιγής στατιστική προτίμηση $\Delta W_{ij}(r)$ προκύπτει ως διαφορά της μέσης στατιστικής προτίμησης W_{ij} των ατομικών τύπων i, j από αυτήν της κατάστασης αναφοράς W . Για τον υπολογισμό των παραπάνω δυναμικών έχουν οριστεί διάφοροι ατομικοί τύποι, ανάλογοι με αυτούς των πεδίων δυνάμεων. Πολλοί από αυτούς τους ατομικούς τύπους έχουν διατυπωθεί για την περιγραφή επαφών δότη – δέκτη δεσμού υδρογόνου από σχετικές κατανομές.

Οι Muege – Martin ανέπτυξαν το **δυναμικό βαθμολογίας μέσης δύναμης** (PMFScore)¹⁷⁸ που δίνεται από την εξίσωση (5.23), με βάση τις κρυσταλλικές δομές 697 συμπλόκων πρωτεΐνης – προσδέτη

$$\Delta W = \sum_{l_j}^{\text{ligand}} \sum_{k_i}^{\text{protein}} \Delta W_{ij}(r_{ij}) \quad (5.23)$$

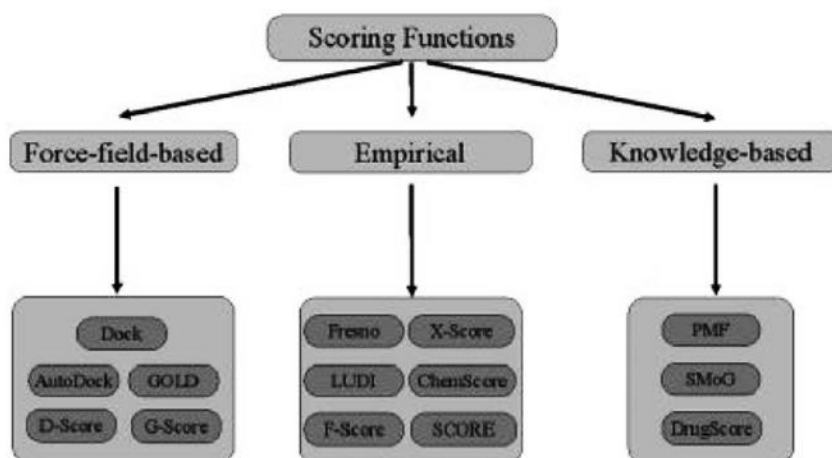
όπου το δυναμικό μέσης δύναμης $\Delta W_{ij}(r_{ij})$ ορίζεται βάσει της εξίσωσης (5.21).

Για το πρόβλημα ελλιμενισμού, το άτομο i ανήκει στην πρωτεΐνη και καταγράφονται τα κατάλληλα δυναμικά για αποστάσεις με μέγιστο τα 12 Å, ώστε να συμπεριλαμβάνονται έμμεσα τα φαινόμενα του διαλύτη στις επιφάνειες προσδέτη – πρωτεΐνης, αν και οι ειδικές αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για την πρόσδεση περιορίζονται σε αποστάσεις ~ 6 Å. Χρησιμοποιούνται 16 πρωτεϊνικοί ατομικοί τύποι και 34 ατομικοί τύποι προσδέτη. Η συνάρτηση PMFScore έχει ενσωματωθεί στο λογισμικό CK4 και στο Cerius2 και προβλέπει ικανοποιητικά πειραματικές απόλυτες ελεύθερες ενέργειες πρόσδεσης για 77 σύμπλοκα προσδέτη – πρωτεΐνης.

Όπως διακρίνεται από τις εξισώσεις (5.21) – (5.23), στην ενέργεια σύνδεσης δεν περιλαμβάνονται συνεισφορές όπως είναι οι διαμορφωτικές αλλαγές και η μείωση της εντροπίας εξαιτίας του περιορισμού της περιστροφικής και μεταφορικής κίνησης, επειδή οι συνεισφορές αυτές αλληλοαναιρούνται κατά τη σύγκριση δύο διαφορετικών προσανατολισμών πρόσδεσης. Ακόμη, δεν περιλαμβάνονται ενεργειακοί όροι που σχετίζονται με τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, όπως οι δυνάμεις van der Waals και τα δυναμικά στρέψης, επειδή οι σχετικές διαμορφωτικές μεταβολές θεωρείται ότι συνεισφέρουν στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης λιγότερο από 3 kcal/mol.¹⁷⁹

Το δυναμικό **ASP**¹⁸⁰ που είναι διαθέσιμο επίσης από το πρόγραμμα Gold είναι ζευγωτό δυναμικό ατόμου – ατόμου, που προέκυψε από μια βάση δεδομένων πρωτεϊνών – προσδετών και μπορεί να συγκριθεί με το παραπάνω δυναμικό βαθμολόγησης.

Συμπερασματικά, οι πληροφορίες για τη συχνότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ των προσδετών και της πρωτεΐνης συλλέγονται αναλύοντας τις υπάρχουσες δομές προσδέτη – πρωτεΐνης της τράπεζας δεδομένων πρωτεϊνών κι αυτά τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για να προκύψουν τα στατιστικά δυναμικά.



Σχήμα 5.6¹⁴⁰: Κατάταξη συναρτήσεων βαθμολογίας

6 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΚΤΟ: ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

6.1 Γενικά

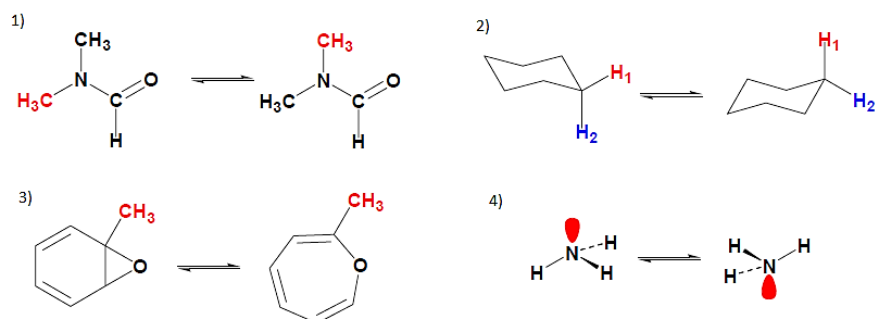
Είναι γνωστό ότι με τη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – NMR Spectroscopy) προσδιορίζονται παράμετροι όπως είναι οι χημικές μετατοπίσεις (chemical shifts), οι σταθερές σύζευξης (coupling constants) κλπ. Οι παραπάνω παράμετροι συνιστούν τη στατική πληροφορία που μπορεί να ληφθεί από τη Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού μπορεί επίσης να μελετήσει φυσικές και χημικές διεργασίες, οι οποίες μεταβάλλονται με το χρόνο (δυναμικές διεργασίες). Στην κλίμακα χρόνων του NMR, αν ο μελετώμενος πυρήνας αλλάζει μαγνητικό περιβάλλον αργά (ή καθόλου), παρατηρούνται φασματικές κορυφές χαρακτηριστικές του πυρήνα αυτού για το συγκεκριμένο μαγνητικό περιβάλλον. Αν ο μελετώμενος πυρήνας αλλάζει μαγνητικά περιβάλλοντα γρήγορα, παρατηρείται ένα φάσμα στο οποίο οι χημικές μετατοπίσεις και οι σταθερές σύζευξης αντιστοιχούν στο μέσο όρο των αντίστοιχων τιμών του πυρήνα στα διάφορα μαγνητικά περιβάλλοντα. Μεταξύ αυτών των δύο άκρων υπάρχουν ενδιάμεσες ταχύτητες ανταλλαγής του μαγνητικού περιβάλλοντος, όπου μπορεί να παρατηρηθεί ποικιλία μορφών των φασματικών κορυφών (lineshapes) του πυρήνα που αντανακλούν την θερμοδυναμική ισορροπία διαφορετικών χημικών συστημάτων - περιβαλλόντων.

Δηλαδή η αλλαγή μαγνητικού περιβάλλοντος ενός πυρήνα λαμβάνει χώρα σε χημικά συστήματα που βρίσκονται σε θερμοδυναμική ισορροπία. Συγκεκριμένα, οι πορείες που εξετάζονται είναι αμφίδρομες δομικές μετατροπές που επιτυγχάνονται γενικά με προσφορά θερμότητας όπως:

- 1) Διαμορφωτικές αλλαγές π.χ. αναστροφή δακτυλίου (ring inversion) αλεικυκλικών – ετεροκυκλικών μορίων, περιστροφές γύρω από απλούς δεσμούς που έχουν χαρακτήρα διπλού δεσμού (π.χ. αμιδικός δεσμός) ή είναι στερεοχημικά παρεμποδισμένοι (σχ. 6.1).
- 2) Αναστροφές στερεοδιάταξης π.χ. πυραμιδική αναστροφή αμινών (nitrogen inversion), φωσφινών κλπ (σχ. 6.1).
- 3) Αμφίδρομες χημικές αντιδράσεις π.χ. μεταφορά πρωτονίου μεταξύ ταυτομερών μορφών κλπ (σχ. 6.1).
- 4) Ισορροπίες ανταλλαγής υποκαταστατών σε ενώσεις συναρμογής.

- 5) Ισορροπίες μεταξύ της ελεύθερης και δεσμευμένης με πρωτεΐνη μορφής μικρών μορίων (υποστρωμάτων ή ανόργανων ιόντων).
- 6) Ενζυμικές αντιδράσεις πολλών σταδίων.



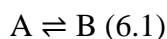
Σχήμα 6.1: Χαρακτηριστικά παραδείγματα χημικών διεργασιών που μελετώνται με Δυναμική Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού: 1) Περιορισμένη περιστροφή γύρω από απλό δεσμό, 2) Αναστροφή δακτυλίου, 3) Ταυτομέρεια, 4) Αναστροφή διάταξης

Η πληροφορία που λαμβάνεται από τη μελέτη τέτοιων φασμάτων μεταξύ των ισορροπούμενων μορφών είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τη μελέτη εσωτερικών μοριακών κινήσεων, την εκτίμηση των αντίστοιχων ενεργειακών φραγμάτων και θερμοδυναμικών παραμέτρων, τη λεπτομερέστερη ανάλυση του χημικού μηχανισμού μιας πορείας κλπ. Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού που ασχολείται με τέτοιες αλληλομετατροπές ονομάζεται Δυναμική Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – DNMR Spectroscopy).

Σε αυτά τα συστήματα με μεταβολή της θερμοκρασίας η μορφή της φασματικής κορυφής ενός μελετώμενου πυρήνα μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη χημική αλληλομετατροπή μεταξύ των θέσεων ισορροπίας, λόγω αλλαγής του χημικού περιβάλλοντος του πυρήνα π.χ. σε μια αργή περιστροφή γύρω από έναν απλό δεσμό. Ο πυρήνας, ο οποίος αλλάζει χημικό περιβάλλον κατά την αλληλομετατροπή μεταξύ των θέσεων ισορροπίας του συστήματος, λέγεται ότι υφίσταται χημική ανταλλαγή (chemical exchange). Η μελέτη της δυναμικής ισορροπίας της αλληλομετατροπής στηρίζεται στην ανάλυση του σχήματος της φασματικής κορυφής (lineshape analysis) των πυρήνων που υφίστανται χημική ανταλλαγή.^{181–183}

6.2 Θερμοδυναμικές και κινητικές παράμετροι

Με τη Δυναμική Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού μελετώνται πυρήνες που το χημικό περιβάλλον τους ανταλλάσσεται μεταξύ των δομών A και B που αλληλομετατρέπονται μέσω χημικής ισορροπίας:



Ο μελετώμενος πυρήνας βρίσκεται σε ισορροπία στις θέσεις A και B. Επισημαίνεται ότι οι χημικές ισορροπίες που μελετώνται θεωρούνται ότι περιγράφονται από κινητική πρώτης τάξης. Ακόμα και αν η μακροσκοπική κινητική της ισορροπίας είναι υψηλότερης τάξης, τα φαινόμενα που εμφανίζονται στα φάσματα DNMR θεωρούνται ότι περιγράφονται από κινητική ψευδοπρώτης τάξης.

Αρχικά είναι απαραίτητος ο ορισμός των παραμέτρων που περιγράφουν αυτήν τη δυναμική ισορροπία:

1. Η θερμοδυναμική σταθερά ισορροπίας K_{eq} , που καθορίζεται από τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs της διεργασίας (ΔG°), και δίνεται από την εξίσωση Van't Hoff (5.2):

$$K_{eq} = \frac{p_B}{p_A} = e^{-\frac{\Delta G^\circ}{RT}} \quad (6.2)$$

όπου

$$p_A + p_B = 1$$

p_A, p_B = γραμμομοριακά κλάσματα των A και B

R = παγκόσμια σταθερά των αερίων (8.314 J/K)

T = απόλυτη θερμοκρασία (K)

2. Η σταθερά ταχύτητας k , που καθορίζεται από τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs του μεταβατικού σταδίου (ΔG^\ddagger), και δίνεται από την εξίσωση Eyring:

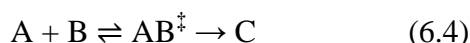
$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (6.3)$$

k_B = σταθερά Boltzmann (1.3805×10^{-23} J/K)

h = σταθερά Plank (6.625×10^{-34} J·s)

κ = συντελεστής μετασχηματισμού (transmission coefficient)

Σύμφωνα με τη θεωρία της μεταβατικής κατάστασης (Transition State Theory – TST), απαιτείται η εισαγωγή του συντελεστή μεταφοράς κ στην παραπάνω εξίσωση (6.3), ο οποίος σε κλασικές περιπτώσεις έχει συνήθως τιμή 1. Η φυσική σημασία αυτού είναι ότι σε μία πορεία:

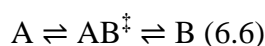


η μεταβατική κατάσταση AB^\ddagger προχωρά πάντα στο προϊόν C και ποτέ δεν επανέρχεται στα αντιδρώντα A, B.

Αντικαθιστώντας τις τιμές των h , k_B και θέτοντας $\kappa = 1$ από την εξίσωση (6.3) προκύπτει

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[23.76 - \ln \left(\frac{k}{T} \right) \right] \quad (6.5)$$

Στην περίπτωση όπου το προϊόν B δεν είναι παρά διαμορφομερές του A, όπως περιγράφεται στην παρακάτω πορεία:



ο συντελεστής μεταφοράς κ θα έχει τιμή $\frac{1}{2}$ καθώς η πιθανότητα το σύστημα να φτάσει από τη μεταβατική κατάσταση AB^\ddagger στη δομή A ή B είναι ίδια.^{182,183}

Αντικαθιστώντας τις τιμές των h , k_B και θέτοντας $\kappa = 0.5$ από την εξίσωση (6.3) προκύπτει

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[23.07 - \ln \left(\frac{k}{T} \right) \right] \quad (6.7)$$

Μια άλλη ανάλυση προκύπτει με τη χρήση της εμπειρικής εξίσωσης Arrhenius αντί της εξίσωσης Eyring:

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (6.8)$$

A = παράγοντας συχνότητας (s^{-1})

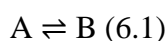
E_a = ενέργεια ενεργοποίησης κατά Arrhenius

Επειδή υπάρχουν οι δύο ανωτέρω μεθοδολογίες (υπάρχουν και άλλες όπως η θεωρία συγκρούσεων που δεν θα αναλυθεί), όταν χρησιμοποιείται ο όρος "ενέργεια ενεργοποίησης" πρέπει, προκειμένου να γίνουν ακριβείς συγκρίσεις, να εξηγείται σαφώς αν αναφέρεται σε ενέργεια ενεργοποίησης Arrhenius, ενέργεια ενεργοποίησης TST κλπ

6.3 Χημική ανταλλαγή

Η πιο συνηθισμένη περίπτωση χημικής ανταλλαγής είναι η χημική ανταλλαγή δύο θέσεων, κατά την οποία ο μελετώμενος πυρήνας ανταλλάσσεται μεταξύ δύο δομών που βρίσκονται σε ισορροπία. Στην περίπτωση που στην ισορροπία συμμετέχουν παραπάνω από δύο δομές, η χημική ανταλλαγή είναι πολλών θέσεων. Για απλοποίηση οι περιγραφές που θα ακολουθήσουν αφορούν σε χημική ανταλλαγή δύο θέσεων, οι ίδιες όμως αρχές ισχύουν και στη χημική ανταλλαγή πολλών θέσεων.

Μια χημική ανταλλαγή δύο θέσεων A, B σύμφωνα με τη εξίσωση (6.1) δύναται να είναι συμμετρική ή ασύμμετρη.



Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν την παραπάνω ανταλλαγή δύο θέσεων είναι οι p_A , p_B και $k_{A \rightarrow B}$, $k_{B \rightarrow A}$ και ν_A , ν_B και τ_A , τ_B όπου $k_{A \rightarrow B}$, $k_{B \rightarrow A}$ είναι οι σταθερές ταχύτητας της αντίστοιχης αλληλομετατροπής, ν_A , ν_B είναι οι συχνότητες συντονισμού των φασματικών κορυφών που αντιστοιχούν στις θέσεις χημικής ανταλλαγής και τ_A , τ_B είναι οι μέσοι χρόνοι παραμονής σε κάθε θέση (μέσοι χρόνοι ζωής)

Χαρακτηριστικό παράδειγμα συμμετρικής ανταλλαγής είναι η δυναμική ισορροπία μίας ένωσης μεταξύ δύο διαμορφώσεων ίσης ενέργειας. Στην περίπτωση αυτή όπου ο σχετικός πληθυσμός των μορίων της ένωσης που καταλαμβάνουν τις διαμορφώσεις A και B είναι ο ίδιος και καθώς ο ένας πυρήνας μεταπηδά από τη διαμόρφωση A στη B, ταυτόχρονα ένας άλλος πυρήνας μεταπηδά από τη B στην A με την ίδια ταχύτητα. Οπότε στη συμμετρική ανταλλαγή δύο θέσεων ισχύουν:

$$\begin{aligned} K_{eq} &= 1 \\ p_A &= p_B = p \\ k_{A \rightarrow B} &= k_{B \rightarrow A} = k \\ \tau_A &= \tau_B = \tau = 1/k \quad (6.9) \end{aligned}$$

Στην ασύμμετρη ανταλλαγή οι δύο διαμορφώσεις δεν είναι πλέον ίσης ενέργειας, έχουν διαφορετικούς πληθυσμούς Boltzmann, διαφορετικές ταχύτητες αλληλομετατροπής και η σταθερά ισορροπίας είναι διάφορη του 1. Συνεπώς οι θέσεις είναι ανισοδύναμα κατειλημμένες. Το διαμορφωμερές που βρίσκεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση -και επομένως είναι υψηλότερης ενέργειας- έχει μικρότερο μέσο χρόνο ζωής. Στην ισορροπία ισχύουν:

$$\begin{aligned} p_A + p_B &= 1 \\ k_{A \rightarrow B} p_A &= k_{B \rightarrow A} p_B \\ \tau_A / \tau_B &= p_A / p_B \\ \tau_A &= 1/k_{A \rightarrow B}, \tau_B = 1/k_{B \rightarrow A} \quad (6.10) \end{aligned}$$

Για απλοποίηση, οι περιγραφές που θα ακολουθήσουν αφορούν σε συμμετρική ανταλλαγή θέσεων.

6.4 Κλίμακα χρόνου NMR και αλλαγές σχήματος φασματικών κορυφών

6.4.1 Γενικά

Για να μελετήσουμε τη δυναμική ισορροπία μιας αλληλομετατροπής $A \rightleftharpoons B$ με Φασματοσκοπία DNMR, θα πρέπει η ταχύτητα αυτής (άρα και οι μέσοι χρόνοι ζωής κάθε θέσης) να είναι συγκρίσιμοι με τη χρονική κλίμακα του NMR. Στη Φασματοσκοπία DNMR διακρίνονται τρία είδη ανταλλαγών σε σχέση με την ταχύτητα:

- 1) Η βραδεία ανταλλαγή ($\tau > 10$ ms)
- 2) Η ενδιάμεση ανταλλαγή ($\tau = 1-10$ ms)
- 3) Η ταχεία ανταλλαγή ($\tau < 1$ ms)

Αρχίζοντας από δύο διακριτές κορυφές αυξάνοντας τη θερμοκρασία παρατηρείται σταδιακά διεύρυνση των δυο κορυφών, που στη συνέχεια πλησιάζουν μεταξύ τους και διευρύνονται περισσότερο μέχρι να συμπυκθούν σε μία. Με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας προκύπτει τελικά μια οξεία κορυφή (σχ. 6.2).

6.4.2 Περιοχή βραδείας ανταλλαγής

Η βραδεία ανταλλαγή συμβαίνει σε μια περιοχή θερμοκρασιών (άρα και σταθερών ταχύτητας) όπου για τις θέσεις της ισορροπίας A, B παρατηρούνται διακριτές κορυφές με συχνότητες συντονισμού ν_A, ν_B . Αυτό σημαίνει ότι στις θερμοκρασίες αυτές η σταθερά της ταχύτητας k είναι τόσο μικρή, άρα ο μέσος χρόνος παραμονής τ σε κάθε θέση τόσο μεγάλος, ώστε στο φάσμα να παρατηρούνται

δύο διακριτές κορυφές, μια για κάθε θέση ισορροπίας. Εάν σε αυτό το σύστημα προσφέρουμε θερμότητα αυξάνοντας τη θερμοκρασία, αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα να αυξηθεί η σταθερά της ταχύτητας k και να μειωθεί ο χρόνος ζωής τ . Αυτό αντανακλάται στο φάσμα, αρχικά με διεύρυνση των δυο κορυφών, που στη συνέχεια πλησιάζουν μεταξύ τους και διευρύνονται περισσότερο μέχρι να συμπτυχθούν σε μία. Με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας προκύπτει τελικά μια οξεία κορυφή. Η διεύρυνση της φασματικής γραμμής που προκαλείται ως αποτέλεσμα της πορείας ανταλλαγής συμβολίζεται με Δ_e (e, exchange) και ονομάζεται διεύρυνση ανταλλαγής. Λαμβάνεται αν από το παρατηρούμενο εύρος της φασματικής κορυφής μετρούμενο στο ήμισυ του ύψους της, Δ_{obs} αφαιρεθεί το φυσικό εύρος Δ_o , το οποίο είναι το εύρος της κορυφής στο ημιύψος, απουσία ανταλλαγής που οφείλεται κυρίως στην ανομοιογένεια του πεδίου:

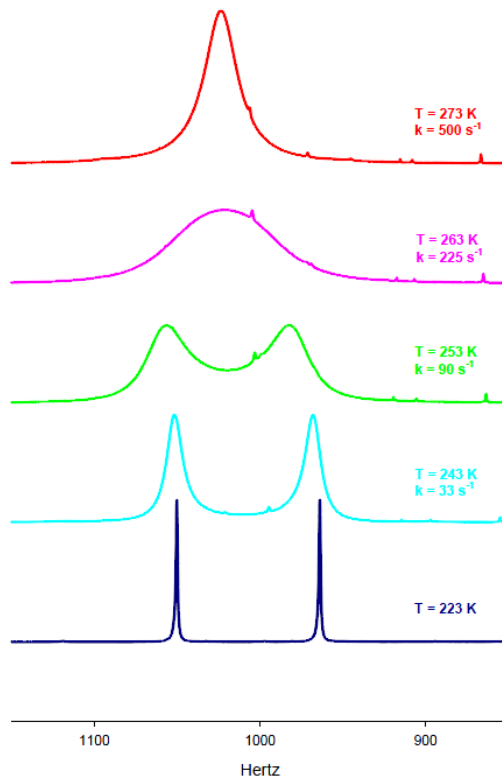
$$\begin{aligned}\Delta_e &= \Delta_{obs} - \Delta_o \\ \Delta_o &= 1/\pi T_2 \quad (6.11)\end{aligned}$$

T_2 = χρόνος αποδιέγερσης spin-spin

Στην περιοχή βραδείας ανταλλαγής η αύξηση στο εύρος της φασματικής κορυφής προσεγγίζεται με την εξίσωση:

$$\Delta_e = k/\pi = 1/\pi\tau \quad (6.12)$$

Από την παραπάνω εξίσωση γίνεται φανερό ότι κατά τη βραδεία ανταλλαγή όσο ταχύτερη είναι η ανταλλαγή, τόσο μεγαλύτερη είναι η διεύρυνση της κορυφής. Αυτό το φαινόμενο διεύρυνσης της φασματικής κορυφής μπορεί να ερμηνευθεί με βάση την Αρχή της Απροσδιοριστίας του Heisenberg. Όσο μικρότερος ο χρόνος ζωής τ ενός πυρήνα σε ένα μαγνητικό περιβάλλον, τόσο μεγαλύτερη γίνεται η αβεβαιότητα στον προσδιορισμό της ενέργειας. Οι ενεργειακές στάθμες που προκύπτουν είναι συνεπώς ασαφείς, οπότε οι μεταπτώσεις από τη μία στην άλλη οδηγούν σε διευρυμένες φασματικές κορυφές. Αυτή είναι μια μοναδική ικανότητα της Φασματοσκοπίας NMR, και πολλές διεργασίες των οποίων οι ταχύτητες εύκολα μετρώνται με τεχνικές DNMR είναι σχεδόν αδύνατο να μελετηθούν με οποιαδήποτε άλλη μέθοδο.



Σχήμα 6.2¹⁸⁴: Μορφές φάσματος NMR για διαφορετικές ταχύτητες ανταλλαγής σε διαφορετικές θερμοκρασίες για μια συμμετρική ανταλλαγή. Μπλε: η βραδεία ανταλλαγή, Κόκκινο: ταχεία ανταλλαγή, Μωβ: ενδιάμεση ανταλλαγή (σημείο σύμπτωσης).

6.4.3 Περιοχή ενδιάμεσης ανταλλαγής

Στην ενδιάμεση ανταλλαγή οι διευρυνόμενες φασματικές κορυφές συγχωνεύονται σε μία ευρεία κορυφή. Αυτό συμβαίνει όταν, αυξανόμενης της θερμοκρασίας, η σταθερά ταχύτητας k προσεγγίζει την τιμή $\delta\nu = |\nu_A - \nu_B|$. Συγκεκριμένα, για τη σταθερά της ταχύτητας στο σημείο σύμπτωσης των δύο κορυφών (coalescence point) k_C ισχύει η συνθήκη σύμπτωσης:

$$k_C = \frac{\pi \delta\nu}{\sqrt{2}} \approx 2,22\delta\nu \quad (6.13)$$

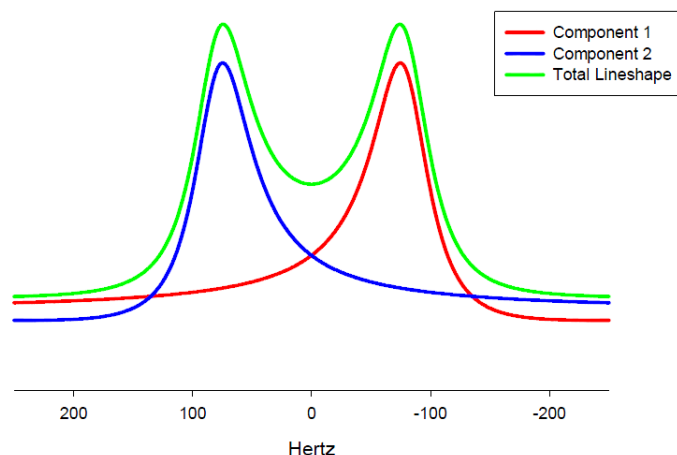
Οπότε ο μέσος χρόνος ζωής στο σημείο σύμπτωσης είναι:

$$\tau_C = \frac{\sqrt{2}}{\pi \delta\nu} \approx \frac{0,450}{\delta\nu} \quad (6.14)$$

Έτσι, θεωρούμε ότι ταχεία ανταλλαγή συμβαίνει όταν $k > k_C$ και βραδεία ανταλλαγή όταν $k < k_C$.

Η αντίστοιχη θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται πειραματικά το σημείο σύμπτωσης, δηλαδή για την οποία το $\delta\nu = 0$, ονομάζεται θερμοκρασία σύμπτωσης T_C (coalescence temperature).^{183,185,186}

Η ευρεία φασματική κορυφή της ενδιάμεσης ανταλλαγής μπορεί να αναλυθεί ως άθροισμα δύο εκτός φάσης καμπυλών Lorentz (Σχήμα 6.3) και έχουν αναπτυχθεί σχετικά εμπορικά προγράμματα προσομοίωσης των φασματικών γραμμών (π.χ. MEXICO¹⁸⁷, SPINEVOLUTION¹⁸⁸, κ.α) συστημάτων όπου παρατηρείται στο φάσμα NMR η ταχεία, ενδιάμεση και βραδεία ανταλλαγή στην κλίμακα χρόνων NMRⁱⁱⁱ.



Σχήμα 6.3¹⁸⁴: Μια ευρεία φασματική κορυφή της ενδιάμεσης ανταλλαγής μπορεί να αναλυθεί στο άθροισμα δύο εκτός φάσης καμπυλών Lorentz.

6.4.4 Περιοχή ταχείας ανταλλαγής

Εάν η θερμοκρασία συνεχίσει να αυξάνεται πέραν της θερμοκρασίας σύμπτωσης ($T > T_C$), αυτό θα οδηγήσει στην εμφάνιση μίας οξείας φασματικής κορυφής, με συχνότητα συντονισμού ν ίση με τον αριθμητικό μέσο των συχνοτήτων ν_A , ν_B δηλαδή $\nu = \frac{1}{2} (\nu_A + \nu_B)$. Αυτές είναι οι συνθήκες της ταχείας ανταλλαγής. Η τελική κορυφή, αν και δε θα είναι ευρεία όπως στο σημείο σύμπτωσης, θα είναι διευρυμένη συγκριτικά με την κορυφή με φυσικό εύρος Δ_0 . Συγκεκριμένα, η διεύρυνση της φασματικής κορυφής στο ημιύψος θα είναι:

$$\Delta_e = \frac{\pi \delta \nu^2}{2k} = \frac{\pi \tau \delta \nu^2}{2} \quad (6.15)$$

Σε αντίθεση με τη βραδεία ανταλλαγή όπου οι χωριστές κορυφές διευρύνονται με αύξηση της ταχύτητας ανταλλαγής, στην ταχεία ανταλλαγή η διεύρυνση ανταλλαγής της μοναδικής κορυφής συντονισμού γίνεται μικρότερη όσο αυξάνει η ταχύτητα ανταλλαγής.^{183,185,186}

ⁱⁱⁱ Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 6.4.2, γενικά η φασματική γραμμή αποτελεί άθροισμα μεταπτώσεων. Πάνω σε αυτή την αρχή στηρίζεται η ανάπτυξη προγραμμάτων προσομοίωσης. Σύμφωνα με την κβαντομηχανική θεώρηση, κάθε σήμα στο NMR εξαρτάται από τη συχνότητα και την πυκνότητα πιθανότητας της μετάπτωσης. Συγκεκριμένα, από τη συχνότητα της μετάπτωσης εξαρτάται η θέση και το εύρος της κορυφής, ενώ από την πυκνότητα πιθανότητας εξαρτάται η ένταση και η φάση του σήματος. Σε ένα δυναμικό σύστημα, η συχνότητα και η πυκνότητα πιθανότητας είναι μιγαδικοί αριθμοί, με πραγματικό και φανταστικό μέρος.^{181,182}

6.4.5 Μορφή φασματικών γραμμών και παρακολούθηση της ανταλλαγής

Η απλούστερη μορφή της χημικής ανταλλαγής περιλαμβάνει σήματα χωρίς συζεύξεις J (scalar coupling), π.χ. singlets μεθυλίου σε ένα φάσμα ^1H ή κορυφές σε ένα αποσυνζευγμένο φάσμα ^{13}C (spin decoupled ^{13}C) κλπ.

Εάν το σύστημα περιλαμβάνει συζεύξεις J , η κατάσταση περιπλέκεται καθώς η σχέση 1:1 μεταξύ των πυρήνων και των κορυφών σε ένα φάσμα δεν υφίσταται πλέον. Επειδή σε ένα έντονα συζευγμένο φάσμα μια απλή φασματική κορυφή μπορεί να αφορά πολλούς πυρήνες, ο μελετώμενος πυρήνας μπορεί να είναι συζευγμένος με πολλές φασματικές κορυφές. Συνεπώς, όταν το μαγνητικό περιβάλλον του πυρήνα αυτού αλλάζει, δύναται να επιφέρει αλλαγές και στα σήματα πολλών άλλων πυρήνων στο φάσμα.

Η φασματοσκοπία ^{13}C επιτρέπει την παρακολούθηση ταχύτερων ανταλλαγών συγκριτικά με τη φασματοσκοπία ^1H . Αυτό εξαιτίας της μεγαλύτερης διαχωριστικότητας (resolution) των αποσυνζευγμένων φασμάτων ^{13}C ώστε η τιμή του $\delta\nu$ μεταξύ ανταλασσομένων κορυφών να είναι πενταπλάσια για τη φασματοσκοπία ^{13}C συγκριτικά με τη φασματοσκοπία ^1H . Επίσης, η τιμή της θερμοκρασίας σύμπτωσης T_C μεταξύ δύο σημάτων ^{13}C είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την T_C για τα δύο σήματα ^1H που ανταλλάσσονται μεταξύ των ίδιων θέσεων A και B επιτρέποντας τη παρακολούθηση του φαινομένου για μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών.

6.5 Ασύμμετρη ανταλλαγή

Σε περιπτώσεις ασύμμετρης ανταλλαγής ισχύουν:

- 1) Στην περιοχή βραδείας ανταλλαγής, οι διευρύνσεις ανταλλαγής δίνονται προσεγγιστικά από τις παρακάτω σχέσεις:

$$\Delta_A = k_{A \rightarrow B} / \pi = 1 / \pi \tau_A \quad \text{και} \quad \Delta_B = k_{B \rightarrow A} / \pi = 1 / \pi \tau_B \quad (6.16)$$

- 2) Στην περιοχή ταχείας ανταλλαγής, παρατηρείται μια κορυφή σε συχνότητα:

$$\nu_{av} = p_A \nu_A + p_B \nu_B \quad (5.17)$$

Ενώ η διεύρυνση ανταλλαγής για καθένα από τα σήματα προσεγγίζεται από τις σχέσεις:

$$\Delta_{e,A} = \frac{4\pi p_A p_B^2 \delta\nu^2}{k_{A \rightarrow B}} \quad \text{και} \quad \Delta_{e,B} = \frac{4\pi p_B p_A^2 \delta\nu^2}{k_{B \rightarrow A}} \quad (6.18)$$

Οι αντίστοιχες εξισώσεις για την ασύμμετρη ανταλλαγή θέσεων απλοποιούνται σε αυτές που ισχύουν στη συμμετρική ανταλλαγή όπως περιγράφηκαν παραπάνω, αν τεθεί $p_A = p_B = 1/2$ και $k_{A \rightarrow B} = k_{B \rightarrow A}$.

6.6 Παρακολούθηση διαμορφωτικών αλλαγών με φασματοσκοπία DNMR

6.6.1 Γενικά

Όπως αναφέρθηκε ένα πλήθος διαμορφωτικών αλλαγών μπορούν να αναλυθούν με φασματοσκοπία DNMR με συνήθεις στη βιβλιογραφία την αναστροφή εξαμελών αλειφατικών δακτυλίων π.χ. κυκλοεξανίου, πιπεριδίνης κλπ, την αναστροφή στερεοδιάταξης του πυραμιδικού αζώτου τριτοταγών αμινών, την περιστροφή γύρω από απλούς δεσμούς κλπ. Σε όλες τις περιπτώσεις πρέπει η δομή του μορίου να είναι τέτοια ώστε η διαμορφωτική αλλαγή να είναι δύσκολη σχετικά. Παραδείγματος χάριν αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ηλεκτρονικής δομής (π.χ. αμιδικός δεσμός), στερεοχημικής παρεμπόδισης οπότε λόγω των συνωστισμένων ατόμων η κίνηση είναι παρεμποδισμένη κλπ. Παρακάτω θα αναλυθεί μόνο η περίπτωση της παρεμποδισμένης περιστροφής γύρω από δίδρη γωνία ή απλό δεσμό που αφορά την παρούσα διπλωματική εργασία.

6.6.2 Περιστροφή γύρω από απλούς δεσμούς

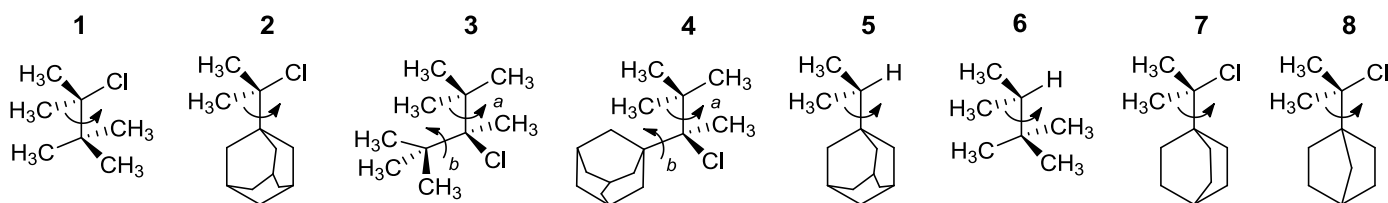
Στα απλά υποκατεστημένα παράγωγα του αιθανίου, το ενεργειακό φράγμα της περιστροφής γύρω από το δεσμό C-C είναι πολύ χαμηλό ($\Delta G^\ddagger = 3-5 \text{ kcal/mol}$), οπότε το φάσμα NMR των ενώσεων αυτών βρίσκεται πάντα στην περιοχή ταχείας ανταλλαγής στην κλίμακα χρόνου του NMR. Το φάσμα που παρατηρείται είναι ο μέσος όρος των φασμάτων από όλα τα διαφορετικά διαμορφομερή και παραμένει ίδιο και στις χαμηλές θερμοκρασίες (π.χ. 25 έως $-120 \text{ }^\circ\text{C}$). Μεταβολές στο σχετικό πληθυσμό των διαμορφομερών με μικρές αλλαγές των υποκαταστατών, αλλάζουν κυρίως τις παρατηρούμενες μέσες τιμές των χημικών μετατοπίσεων και των σταθερών σύζευξης.

Με κατάλληλη υποκατάσταση οι στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να γίνουν τόσο μεγάλες ώστε το ενεργειακό φράγμα να αυξηθεί και το φάσμα NMR των ενώσεων αυτών με ελάττωση της θερμοκρασίας να βρεθεί στην περιοχή ενδιάμεσης και βραδείας ανταλλαγής στην κλίμακα χρόνου του NMR, με αποτέλεσμα η πορεία της περιστροφής να είναι παρατηρήσιμη με Φασματοσκοπία DNMR. Εφόσον η αλληλομετατροπή σε θερμοκρασία δωματίου είναι ταχεία ανταλλαγή, η σχετική ένταση των φασματικών κορυφών στο φάσμα χαμηλής θερμοκρασίας δίνει την αναλογία των διαμορφομερών και επομένως την ενεργειακή διαφορά τους.¹⁸⁹⁻¹⁹¹

6.6.3 Διαμορφωτικές μελέτες αδαμαντανικών παραγώγων με DNMR

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η περιστροφή γύρω από απλούς δεσμούς σε παράγωγα του αδαμαντανίου. Στο σχήμα 5.4 αναφέρονται οι τιμές των ενεργειακών φραγμάτων για την

παρεμποδισμένη περιστροφή C-C διαφόρων αλειφατικών ενώσεων από προηγούμενες σχετικές μελέτες:

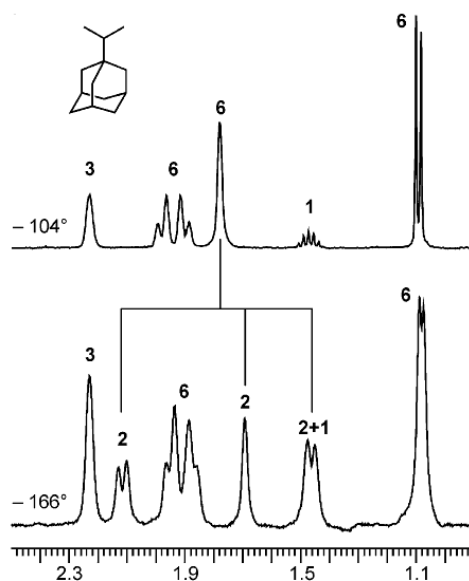


Σχήμα 6.4: $\Delta G_1^\ddagger = 10.4 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_2^\ddagger = 9.3 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_{3a}^\ddagger = 11.4 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_{3b}^\ddagger = 11.4 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_{4a}^\ddagger = 12.2 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_{4b}^\ddagger = 10.6 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_5^\ddagger = 6.1 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_6^\ddagger = 6.9 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_7^\ddagger = 9.8 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_8^\ddagger = 8.2 \text{ kcal/mol}$.

Το ενεργειακό φράγμα περιστροφής στην ένωση **1** είναι υψηλότερο από ότι όταν το *tert*-βουτύλιο αντικαθίσταται από ένα αλκύλιο με δομή πολυκυκλικού υδρογονάνθρακα (1-αδαμαντυλίο, 1-δικυκλοοκτύλιο, 1-δικυκλοεπτύλιο). Αυτό φαίνεται αν συγκριθούν οι περιπτώσεις **1-2** και **3b-4b** (σχήμα 5.4). Το ενεργειακό φράγμα περιστροφής είναι περίπου 1 kcal/mol χαμηλότερο για το 1-αδαμαντύλιο συγκριτικά με το *tert*-βουτύλιο (**1, 2** και **3b, 4b**). Σε αυτές τις ενώσεις τα αλκύλια με πολυκυκλική δομή εμφανίζονται «μικρότερα» από ότι μια ομάδα *tert*-βουτυλίου. Είναι ενδιαφέρον ότι, το υψηλότερο ενεργειακό φράγμα περιστροφής βρέθηκε στο πιο ευέλικτο μόριο από τα προαναφερθέντα τέσσερα, δηλαδή στο **1** –με το υποκατεστημένο με 1-δικυκλοοκτύλιο μόριο **7** να έρχεται δεύτερο. Αυτό υποδηλώνει ότι η ευελιξία μπορεί να είναι εξίσου σημαντική με οποιαδήποτε άλλη επίδραση μεταβατικής κατάστασης για τον προσδιορισμό των σχετικών μεγεθών των φραγμών. Ανάλογο είναι το αποτέλεσμα της σύγκρισης του φράγματος περιστροφής των δεσμών 1-Ad-(CHMe₂) και *t*Bu-(CHMe₂) στις ενώσεις **5** και **6**.

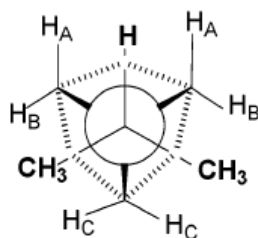
Αντίθετα, όταν οι ομάδες αυτές ενεργούν ως υποκαταστάτες επί ενός δεσμού αιθανίου (**3a, 4a**), η ομάδα 1-αδαμαντυλίου παρεμποδίζει την περιστροφή περισσότερο από την ομάδα *tert*-βουτυλίου. Άρα, το σχετικό μέγεθος του υποκαταστάτη εξαρτάται από τη χημική δομή στο υπόλοιπο μόριο.¹⁹²

Παραδείγματος χάριν, το φάσμα ¹H NMR της **5** σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι ουσιαστικά αμετάβλητο έως τους -100 °C, υποδεικνύοντας ταχεία περιστροφή του απλού δεσμού μεταξύ 1-Ad και ισοπροπυλίου στην κλίμακα χρόνου NMR. Κάτω από αυτή τη θερμοκρασία, η κορυφή των έξι ισοδύναμων υδρογόνων των τριών ομάδων CH₂ (2', 8', 9') δίπλα στην ισοπροπυλομάδα διευρύνεται σημαντικά και τελικά διαχωρίζεται σε τρεις κορυφές ίσης έντασης εξαιτίας της βραδείας περιστροφής του απλού δεσμού μεταξύ 1-Ad και ισοπροπυλίου στην κλίμακα χρόνου NMR σε θερμοκρασία -166 °C, όπως φαίνεται στο φάσμα στους -166 °C (σχ. 6.5).



Σχήμα 6.5¹⁹³: Το φάσμα ^1H NMR της ένωσης 5 στους -104°C και -166°C . Οι αριθμοί πάνω από τις κορυφές υποδεικνύουν τον αριθμό υδρογόνων για κάθε σήμα. Η απλή κορυφή για τα έξι μεθυλικά υδρογόνα ($\delta = 1.75$) που γειτνιάζουν με τον ισοπρόπυλο υποκαταστάτη, διαχωρίζεται σε τρεις κορυφές.

Η περιστροφή του δεσμού ισοπροπύλιο-αδαμαντύλιο γίνεται βραδεία στους -166°C , οπότε στην διαμόρφωση με μεγάλο σχετικά χρόνο ζωής στην κλίμακα χρόνων NMR διακρίνονται τρεις διευθετήσεις των CH_2 ($2'$, $8'$, $9'$) με δύο διαφορετικά είδη ανισότιμων ομάδων μεθυλενίου. Η μία ομάδα περιέχει τα δύο μεθυλένια (CH_AH_B) και η άλλη το μεθυλένιο (CH_2C) (σχ. 6.6)



Σχήμα 6.6¹⁹³: Οι ανισότιμες μεθυλενομάδες της ένωσης 5.

Η ομάδα μεθυλενίου που βρίσκεται σε θέση αντί προς το CH υδρογόνο του ισοπροπυλίου έχει ισότιμα εναντιοτοπικά πρωτόνια (H_C) και εμφανίζεται ως ευρεία απλή κορυφή ($\delta = 1.70$ ppm) στο φάσμα του σχήματος 6.5, ενώ καθεμιά από τις δύο ισοδύναμες ομάδες μεθυλενίου που βρίσκονται σε θέση gauche ως προς το CH υδρογόνο, έχει διαστεροτοπικά υδρογόνα (H_A και H_B). Καθένα από τα υδρογόνα H_A , H_B και εμφανίζονται ως dd με $J = 11.5$ Hz (η σταθερά σύζευξης οφείλεται στη σύζευξη του H_A από το H_B και αντίστροφα, ενώ η δεύτερη μικρή σύζευξη με το C-H δεν είναι ορατή στο φάσμα) στα 2.13 και 1.48 ppm (το τελευταίο σήμα επικαλύπτεται, εν μέρει, με το σήμα του ισοπροπυλικού μεθινίου στα 1.46 ppm). Κανένα από τα άλλα σήματα δεν δείχνει επιπτώσεις αυτής της δυναμικής διαδικασίας, και ειδικότερα, οι δύο ομάδες μεθυλίου του υποκαταστάτη

ισοπροπυλίου παραμένουν εναντιοτοπικές, εμφανιζόμενες ως μια διπλή κορυφή (λόγω σύζευξης με το υδρογόνο του ισοπροπυλικού μεθινίου) γεγονός που συμφωνεί με τη διαμόρφωση του σχήματος 6.6.¹⁹³

Συμφωνώντας με τις παραπάνω παρατηρήσεις, το ενεργειακό φράγμα περιστροφής της ένωσης **5**¹⁹³ είναι περίπου 1 kcal/mol χαμηλότερο από αυτό της αντίστοιχης άκυκλης ένωσης **6**^{194,195}, η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη ευελίξια ως προς την περιστροφή αυτή.

7 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΒΔΟΜΟ: ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A - ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

7.1 Υπολογισμοί μοριακού ελλιμενισμού

7.1.1 Γενικά

Αυτό το τμήμα της εργασίας αναφέρεται στην εκτέλεση και την ανάλυση των αποτελεσμάτων των υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού (molecular docking) στο διαμεμβρανικό τμήμα του τετραμερούς της πρωτεΐνης M2 WT.

Έχει βρεθεί γενικά ότι οι μέθοδοι μοριακού ελλιμενισμού με συναρτήσεις βαθμολογίας είτε βασίζονται σε πεδία δυνάμεων είτε είναι εμπειρικές, αδυνατούν ή έχουν γενικά μικρή απόδοση ως προς την περιγραφή των σχετικών συγγενειών σύνδεσης συμπεριλαμβανομένων και των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.^{54,168} Ένας σημαντικός λόγος που οφείλεται η αδυναμία αυτή είναι η χρησιμοποίηση άκαμπτης δομής για την πρωτεΐνη κατά τους υπολογισμούς αυτούς, ενώ το φαινόμενο σύνδεσης προκαλεί τη μεταβολή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης.

Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί μοριακού ελλιμενισμού στην πρωτεΐνη WT A/M2TM, αφενός μεν ώστε η καλύτερα διαμόρφωση σύνδεσης κάθε προσδέτη να επιλεγεί για εναρκτήρια δομή των προσομοιώσεων FEP/MD, και αφετέρου, προκειμένου να γίνει σύγκριση με παλαιότερη εργασία του εργαστηρίου μας⁵³ όπου χρησιμοποιήθηκε διαφορετική λιπιδική διπλοστιβάδα. Αν και αυτή καθαυτή η λιπιδική διπλοστιβάδα δεν ενδιαφέρει τους υπολογισμούς μοριακής προσάραξης, εντούτοις, δύναται να επηρεάσει τη θέση της πρωτεΐνης στο χώρο.

7.1.2 Η σημασία των μορίων νερού στους υπολογισμούς μοριακού ελλιμενισμού

Η τοποθέτηση μορίων νερού εντός του πρωτεϊνικού διαύλου φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόβλεψη της πειραματικής θέσης σύνδεσης. Σε μελέτη προσομοιώσεων μοριακού ελλιμενισμού που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας χωρίς τη χρήση μορίων νερού εντός του πόρου¹⁹⁶ πριν γίνουν γνωστά η θέση της αμανταδίνης και ο προσανατολισμός της αμινομάδας της^{15,43} τα αποτελέσματα των υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού, αναμενόμενα οδήγησαν στο λανθασμένο προσανατολισμό της αμινομάδας προς το N-τελικό άκρο προκειμένου να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τη S31 έναντι του ορθού προσανατολισμού της προς το C-τελικό άκρο. Ένα

δίκτυο μορίων νερού σταθεροποιεί τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ της αμινομάδας της αμανταδίνης και της H37 οδηγώντας στον προσανατολισμό της αμινομάδας προς το C-τελικό άκρο^{15,43}

Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι ο αριθμός των κρυσταλλογραφικών μορίων νερού που εντοπίζεται στις δομές πρωτεϊνών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ευκρίνεια προσδιορισμού της δομής, δηλαδή με ευκρίνεια 2 Å αναμένεται ένας μέσος όρος 1.0 κρυσταλλογραφικού νερού, αλλά όταν η ευκρίνεια φτάσει το 1 Å αναμένονται 1.6 – 1.7 κρυσταλλογραφικά μόρια νερού ανά αμινοξύ.¹⁹⁷ Στα κρυσταλλογραφικά, δηλαδή αποτελέσματα, φαίνονται μόνο εκείνα τα μόρια νερού που έχουν «καλή διάταξη». Προκειμένου λοιπόν να βρεθούν οι θέσεις που μπορούν να ενυδατωθούν χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής μηχανικής.

7.1.3 Προετοιμασία πρωτεϊνών

Η τριτοταγής δομή που χρησιμοποιήθηκε στις προσομοιώσεις MD, FEP/MD και στους υπολογισμούς μοριακής προσάραξης ήταν η (2KQT.pdb) που έχει προσδιοριστεί με φασματοσκοπία ssNMR σε pH = 7.5.¹⁵ Υπενθυμίζεται ότι η αλληλουχία του πεπτιδίου M2TM είναι SSDPLVVAASIIIGILHLILWILDRL. Η δομή αυτή είναι συμπλοκοποιημένη με την αμανταδίνη **1** και αναπαριστά το διαμεμβρανικό διάυλο της M2 (A/M2TM) σε κλειστή μορφή. Όπως λαμβάνεται η δομή αυτή από τη βάση δεδομένων πρωτεϊνών (PDB), δεν περιλαμβάνει άτομα υδρογόνου. Έτσι, χρησιμοποιώντας το λογισμικό Maestro 9.3, αρχικά προστέθηκαν άτομα υδρογόνου και μεταβλήθηκε ο υβριδισμός του αζώτου της αμινομάδας ώστε να αντιστοιχεί στην πρωτονιωμένη του μορφή [sp³(+)]. Αντίθετα, οι H37 στη δομή του κλειστού διαύλου είναι αποπρωτονιωμένες και για το λόγο αυτό δεν πρωτονιώθηκαν κατά την εκτέλεση των προσομοιώσεων. Ακολούθως, προστέθηκε άμιδο τερματική ομάδα (CONH₂) στο C-τελικό άκρο για καλύτερη μίμηση των πειραματικών συνθηκών, αφού αυτή είναι η δομή του C-τελικού άκρου των συνθετικών πεπτιδίων. Στο N-τελικό άκρο προστέθηκε ακετύλιο. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το πακέτο λογισμικού MacroModel για τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας όλων των δεσμών X-H, δηλαδή όλων των υδρογόνων του συμπλόκου M2TM – **1**. Εφαρμόστηκε πεδίο δυνάμεων AMBER* χρησιμοποιώντας διηλεκτρική σταθερά εξαρτώμενη από την απόσταση ίση με 4.0. Οι ελαχιστοποιήσεις μοριακής μηχανικής πραγματοποιήθηκαν με αλγόριθμο συζυγούς βαθμίδας και τιμή διακύμανσης ενέργειας ίση με 10⁻⁴ kJ·Å⁻¹ ως κριτήριο σύγκλισης.

7.1.4 Προετοιμασία και εκτέλεση υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού

Σχεδιάστηκαν οι προσδέτες στην πρωτονιωμένη τους μορφή χρησιμοποιώντας το λογισμικό Maestro και ελαχιστοποιήθηκαν με το MacroModel 9.6 και το πεδίο δυνάμεων MMFFs χρησιμοποιώντας τη μέθοδο σύζευξης βαθμίδων (*Conjugate Gradient*), CG, και διηλεκτρική σταθερά εξαρτώμενη από την απόσταση με τιμή 4.0 μέχρι να επιτευχθεί σύγκλιση 0.0001 kJ/Å. Στη συνέχεια, η δομή που προέκυψε από την προετοιμασία που περιγράφηκε παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε για τους υπολογισμούς. Στους υπολογισμούς μοριακού ελλιμενισμού συμπεριλήφθηκαν μόνο τα μόρια νερού που βρίσκονταν εντός 8 Å από την αμανταδίνη. Τα λιπίδια και τα ιόντα δε μας «ενδιαφέρουν» στις προσομοιώσεις μοριακής προσάραξης καθώς δε λαμβάνονται υπόψη από τους αλγόριθμους.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί μοριακού ελλιμενισμού των βελτιστοποιημένων γεωμετριών των ενώσεων **1 – 17**, αναφορικά με τη θέση σύνδεσης της αμανταδίνης εντός του πόρου M2TM στα σύμπλοκα αναφοράς. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GOLD, έκδοση 3.2, και δοκιμάστηκαν οι συναρτήσεις βαθμολόγησης ChemScore, GoldScore και ASP. Η περιοχή ενδιαφέροντος που χρησιμοποιεί το λογισμικό αυτό για έρευνα ευνοϊκών διαμορφώσεων πρόσδεσης (grid) προσδιορίστηκε στα 15 Å από την αμανταδίνη και στα δύο σύμπλοκα αναφοράς.

Για τα μόρια νερού που λαμβάνονται υπόψη στους υπολογισμούς το πρόγραμμα έχει δύο επιλογές, είτε την *on – spin* κατά την οποία η θέση τους παραμένει ακλόνητη κατά τη διάρκεια των υπολογισμών και τα μόρια νερού επιτρέπεται να περιστρέφονται, είτε την επιλογή *toggle – spin* κατά την οποία το λογισμικό αποφασίζει αν ένα μόριο νερού είναι ευνοϊκό για την ενέργεια πρόσδεσης, οπότε ή παραμένει ή δε λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό.

Οι υπόλοιποι παράμετροι χρησιμοποιήθηκαν όπως είναι προεπιλεγμένες από το GOLD και οι ενώσεις υποβλήθηκαν σε 10 κύκλους διαφορετικής έρευνας με γενετικό αλγόριθμο.

7.1.5 Παρουσίαση αποτελεσμάτων υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού

Μετά την εκτέλεση των υπολογισμών μοριακού ελλιμενισμού προκύπτουν διάφορες λύσεις για κάθε προσδέτη εντός του πρωτεϊνικού πόρου για κάθε μία από τις συναρτήσεις βαθμολογίας σε συνδυασμό με τις επιλογές για τα μόρια νερού. Οι προσανατολισμοί αυτοί βαθμολογούνται από το πρόγραμμα αυτόματα καθώς προκύπτουν. Οι μεγαλύτερες βαθμολογίες (*scores* για την ASP και την ChemScore ή *fitness* στην περίπτωση της GoldScore) κάθε υπολογισμού συσχετίστηκαν με τις σταθερές συγγένειας που προέκυψαν από τις μετρήσεις ITC.

Οι συσχετίσεις που προέκυψαν για τους υπολογισμούς δεν ήταν καλές, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες⁵⁴. Η καλύτερη αυτών ήταν ($R^2 = 0.12$). Τα αποτελέσματα των υπολογισμών μοριακής προσάραξης και τα διαγράμματα συσχέτισης για όλες τις συναρτήσεις βαθμολογίας παρατίθενται στο παράρτημα.

7.2 Υπολογισμοί FEP/MD για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς που αφορούν τα σύμπλοκα προσδέτη – πρωτεΐνης και τους προσδέτες σε διάλυμα

7.2.1 Γενικά

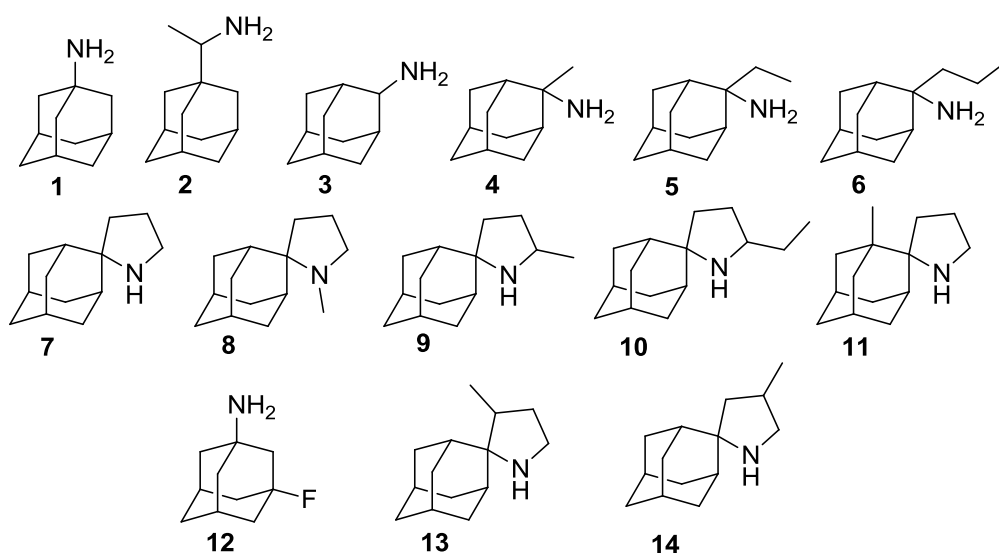
Στο παρόν τμήμα της εργασίας θα περιγραφούν οι λεπτομέρειες εκτέλεσης και τα αποτελέσματα των υπολογισμών διατάραξης ελεύθερης ενέργειας (Free Energy Perturbation, FEP) σε συνδυασμό με προσομοιώσεις MD, FEP/MD, για τα σύμπλοκα αμινοαδαμαντανικών προσδετών με την M2TM, που αντιστοιχεί στην πρωτεϊνική αλληλουχία της διαμεμβρανικής περιοχής της M2 πρωτεΐνης του WT ιού της *influenza* A. Θα εκτεθούν οι λεπτομέρειες εκτέλεσης των υπολογισμών FEP/MD για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς που αφορούν τα σύμπλοκα προσδέτη – πρωτεΐνης (bound state) και τους προσδέτες σε διάλυμα (unbound state).

Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας^{53,54} πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί FEP/MD σε πληθώρα ενώσεων, οι συνθέσεις των οποίων έχουν δημοσιευτεί στο παρελθόν¹⁹⁸⁻²⁰³ και πολλές από αυτές ήταν ιδιαίτερα δραστικές έναντι του ιού της *influenza* A στα στελέχη H3N2, H2N2 και H1N1 και έγινε δυνατόν να αιτιολογηθεί η θερμοδυναμική προέλευση της προτίμησης σύνδεσης των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων στον πόρο A/M2TM. Συγκεκριμένα, η πρώτη μελέτη⁵⁴ που δημοσιεύτηκε αφορούσε προσομοιώσεις στον διαμεμβρανικό διάυλο της πρωτεΐνης M2 του ιού της *influenza* σε όξινο pH, οπότε ο διάυλος είναι ανοικτός. Οι τιμές των σχετικών ελευθέρων ενεργειών σύνδεσης είχαν υψηλή συσχέτιση ($R^2 = 0.85$) με τις πειραματικές οι οποίες υπολογίστηκαν με βάση τις τιμές σταθερών σύνδεσης (K_d), αν και οι μετρήσεις για τις τελευταίες περιλάμβαναν ολόκληρη την πρωτεΐνη M2 και όχι μόνο το διαμεμβρανικό τμήμα M2TM που προσομοιώθηκε υπολογιστικά. Ακόμα τα αμινοξέα His37 στους παραπάνω υπολογισμούς ήταν διπλά πρωτονιωμένα, ενώ η αμανταδίνη παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης όταν αυτά είναι αποπρωτονιωμένα.

Για τους παραπάνω λόγους, στην επόμενη μελέτη⁵³ πραγματοποιήθηκε υπολογισμός ελευθέρων ενεργειών σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών παραγώγων έναντι της A/M2TM σε pH 8 (καθώς, σε αντίθεση με ολόκληρη την M2 πρωτεΐνη, το M2TM δε σχηματίζει σταθερά τετραμερή σε όξινο pH) χρησιμοποιώντας πειραματικές σταθερές σύνδεσης των προσδετών που μετρήθηκαν με ITC για την

αξιολόγηση των υπολογισμών, ώστε το μοντέλο να καταστεί πιο ρεαλιστικό. Για τις παραπάνω μετρήσεις ITC συντέθηκαν πεπτίδια M2TM, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα εργασία.

Στους παραπάνω υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε η διπλοστιβάδα λιπιδίων διπαλματούλοφοσφατιδυλχολίνης (Dipalmitoylphosphatidylcholine – DPPC). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία^{15,45,204,205} η βέλτιστη λιπιδική διπλοστιβάδα για μελέτες της A/M2TM είναι διπλοστιβάδα 1,2-διμυριστούλ-γλυκερο-3-φοφορυλχολίνης (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine - DMPC), η οποία και δεν ήταν διαθέσιμη στις προηγούμενες εκδόσεις του λογισμικού Desmond που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις αναφερθείσες μελέτες. Στα πλαίσια της παρούσης εργασίας πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί FEP/MD στις παραπάνω ενώσεις (σχ. 7.1) με σκοπό την επικύρωση και περαιτέρω βελτιστοποίηση του προαναφερθέντος μοντέλου. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη λιπιδική διπλοστιβάδα DMPC.



Σχήμα 7.1: Ενώσεις-προσδέτες που μελετήθηκε πειραματικά (ITC) και υπολογιστικά (molecular docking, FEP/MD) η σύνδεση τους με την WT A/M2TM στα πλαίσια επικύρωσης και βελτιστοποίησης του υπολογιστικού μοντέλου.

Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε η πρωτονιωμένη μορφή των αμινοαδαμαντανίων, διότι σε pH 8 η αμανταδίνη βρίσκεται κυρίως στην πρωτονιωμένη μορφή της σε διάλυμα. Έχει επίσης βρεθεί ότι η τιμή της pK_a του κατιόντος αλκυλαμμωνίου της αμανταδίνης επίσης αυξάνεται κατά τη σύνδεση της αμανταδίνης με τον πόρο M2TM²⁰⁶. Επίσης, πρόσφατοι υπολογισμοί FEP/MD που αφορούν τη μελέτη πρωτονίωσης αμανταδίνης και ιμιδαζολίου δείχνουν ότι για την αμανταδίνη και το ιμιδαζόλιο His37 εννοείται η πρωτονιωμένη και ουδέτερη μορφή σε pH 8 αντίστοιχα^{iv}.

^{iv} (manuscript in preparation)

7.2.2 Προετοιμασία πρωτεϊνών

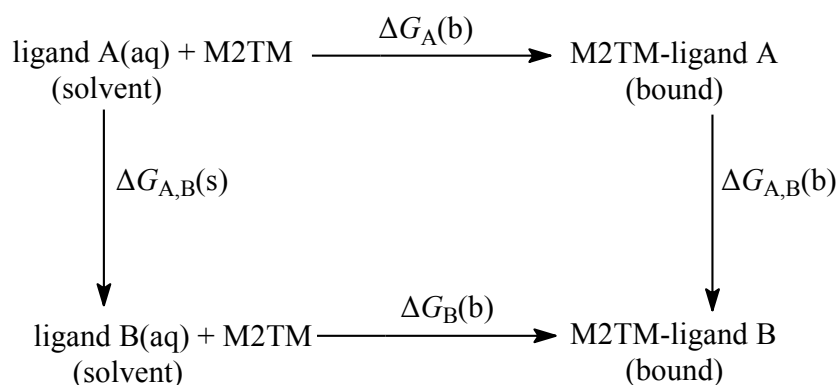
Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 7.1.3 και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την έκδοση του Desmond 3.1 (Desmond2012), η πρωτεΐνη τοποθετήθηκε σε μια πλήρως ενυδατωμένη διπλοστιβάδα λιπιδίων DMPC, όπου για την αναπαράσταση των μορίων νερού (υδάτινο περιβάλλον του συμπλόκου M2TM-προσδέτη εντός της λιπιδικής μεμβράνης) χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο TIP3P.¹¹³ Χρησιμοποιήθηκαν περιοδικές συνοριακές συνθήκες σε ορθορομβικό κουτί προσομοίωσης που εκτείνεται κατά $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$ από το πιο απομακρυσμένο άτομο του συστήματος. Οι αμινοαδαμαντανικοί προσδέτες του σχήματος κατασκευάστηκαν με το λογισμικό Maestro, και η αρχική τους πόζα λήφθηκε από τους υπολογισμούς μοριακού ελλιμενισμού.

Για τη διατήρηση της ουδετερότητας του φορτίου προστέθηκαν τρία ιόντα νατρίου ως αντισταθμιστικά στο αρνητικό φορτίο του τετραμερούς M2TM, που προκύπτει από το άθροισμα των οκτώ αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων του αμινοξέος ασπαρτικό οξύ, από τις τέσσερις θετικά φορτισμένες αργινίνες καθώς και από τη θετικά φορτισμένη αμινομάδα του αμινοαδαμαντανικού προσδέτη. Ακόμη, προς μίμηση των πειραματικών συνθηκών ITC προστέθηκαν ιόντα νατρίου και χλωρίου συγκέντρωσης 150 mM, με όλα τα ιόντα να έχουν τοποθετηθεί τυχαία, εξωτερικά του πρωτεϊνικού διαύλου A/M2TM. Ο συνολικός αριθμός των ατόμων ήταν 17000 άτομα, με μικρές διαφοροποιήσεις κατά περίπτωση, ανάλογα με το μέγεθος του προσδέτη.

7.2.3 Υπολογισμοί FEP/MD

Οι σχετικές ελεύθερες ενέργειες σύνδεσης υπολογίστηκαν με τη χρήση του Θερμοδυναμικού Κύκλου του σχήματος 7.2 σύμφωνα με την έκφραση (7.1)

$$\Delta\Delta G_{\text{ligand A} \rightarrow \text{ligand B}} = \Delta G_{\text{A,B}}(\text{b}) - \Delta G_{\text{A,B}}(\text{s}) \quad (7.1)$$



Σχήμα 7.2: Θερμοδυναμικός κύκλος που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των σχετικών ελευθέρων ενεργειών σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδέτων (που σχετίζονται μέσω αλχημικών μετασχηματισμών) έναντι της wt A/M2TM με υπολογισμούς (FEP/MD). (b: bound, μορφή προσδέτη στο σύμπλοκο, s: solvent ή unbound, μορφή προσδέτη στο διάλυμα).

Υπολογισμοί FEP σε συνδυασμό με προσομοιώσεις MD (FEP/MD) – όπου όλα τα άτομα του συστήματος αφήνονται ευκίνητα– πραγματοποιήθηκαν με το πακέτο λογισμικού Desmond MD, έκδοση 3.1 (Desmond 2012), όπως διανέμεται από την Schrödinger.

Για την προσομοίωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS 2005^{207–209}. Για τον υπολογισμό ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεγάλης εμβέλειας εφαρμόστηκε η μέθοδος PME²¹⁰ με απόσταση πλέγματος 0.8 Å. Για τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μικρής εμβέλειας καθώς και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals εφαρμόστηκε απόστασης αποκοπής 9.0 Å. Για τη διατήρηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης MD χρησιμοποιήθηκε ο θερμοστάτης Nosé-Hoover, ενώ για τον έλεγχο της πίεσης η μέθοδος Martina-Tobias-Klein.²¹¹ Η ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης έγινε με τον ολοκληρωτή πολλαπλών σταδίων RESPA²¹² με εσωτερικό βήμα χρόνου 2.0 fs, τόσο για τις δεσμικές όσο και για τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις, εντός της μικράς εμβέλειας απόστασης αποκοπής. Εκτός της απόστασης αποκοπής χρησιμοποιήθηκε εξωτερικό βήμα χρόνου 6.0 fs.

7.2.4 Πρωτόκολλο για τις προσομοιώσεις FEP/MD σε σύμπλοκο και σε διάλυμα

Τόσο για τους υπολογισμούς FEP/MD σε σύμπλοκο όσο και για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο ελαχιστοποιήσεις ενέργειας με αλγόριθμο απότομης κατάβασης (steepest descent) με πλήθος βημάτων 2000 και 10000, αντίστοιχα, και εφαρμόστηκε αρμονικός περιορισμός (harmonic restraint) 50 kcal/mol/Å² σε όλα τα άτομα της διαλυμένης ουσίας (σύμπλοκο M2TM-προσδέτης + μεμβράνη). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια σειρά τεσσάρων προσομοιώσεων MD. Η πρώτη προσομοίωση πραγματοποιήθηκε στους 10 K στο κανονικό στατιστικό σύνολο NVT, με όλα τα βαριά άτομα

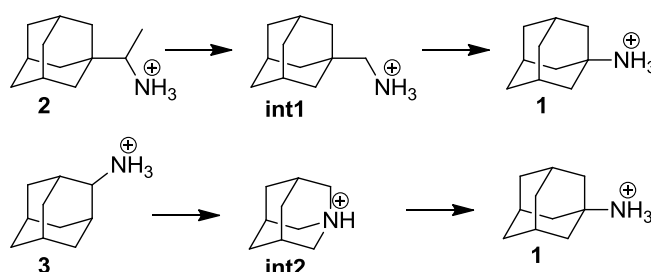
συγκρατημένα με σταθερά δύναμης $50 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$. Ακολουθεί προσομοίωση στο στατιστικό σύνολο NPT. Εν συνεχεία, η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 310 K – ώστε να είναι αρκετά ψηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης των λιπιδίων DMPC (η οποία είναι 297 K) στο στατιστικό σύνολο NPT και η σταθερά δύναμης διατηρήθηκε. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εξισορρόπηση (equilibration) για 2 ns , 3 ns ή 4 ns για τους μεγαλύτερους προσδέτες στο στατιστικό σύνολο NPT, με άρση όλων των περιορισμών.

Την παραπάνω εξισορρόπηση ακολούθησε μια προσομοίωση NPT διάρκειας 2 ns για κάθε παράθυρο των υπολογισμών FEP ή και μεγαλύτερης διάρκειας στις περιπτώσεις που χρειάστηκε, δηλαδή χρειαζόταν μεγαλύτερος χρόνος για να επέλθει σύγκλιση. Στο χρόνο αυτό, η ελεύθερη ενέργεια του συστήματος και η τιμή RMSD (Root mean square deviation of atomic positions - το μέσο των τετραγώνων των μετατοπίσεων των ατόμων του συστήματος) βρέθηκαν να φθάνουν σε πλάτωμα σταθερών τιμών και ο υπολογισμός για τα συστήματα θεωρήθηκε ότι έφθασε σε σύγκλιση (βλ. Παράρτημα).

Εφαρμόστηκε σταδιοποίηση μέσω της μεταβλητής σύζευξης λ και δυαδική τοπολογία (βλ. ενότητα 5.3). Για τον υπολογισμό της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας που αφορά τον αλχημικό μετασχηματισμό των ζευγών ενώσεων που μελετήθηκαν εφαρμόστηκε σταδιοποίηση 12 παραθύρων – τιμών λ (βλ. Παράρτημα). Οι διαμορφώσεις των συστημάτων αποθηκευόταν κάθε 4 ps .

7.2.5 Αλχημικοί μετασχηματισμοί πολλαπλών βημάτων (Multistage FEP)

Όλες οι μεταλλάξεις που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία αφορούν στους προσδέτες του σχήματος 7.1. Υπήρξαν περιπτώσεις μεταλλάξεων, όπου ήταν αναγκαία η μελέτη και ενδιάμεσων βημάτων-αλχημικών μετασχηματισμών ώστε να επιτευχθεί ο μελετώμενος αλχημικός μετασχηματισμός (σχ. 7.3).



Σχήμα 7.3: Αλχημικοί μετασχηματισμοί πολλαπλών βημάτων.

Με άλλα λόγια, όταν είναι επιθυμητή η μετάλλαξη από έναν προσδέτη A σε έναν άλλο B, οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, εισάγονται ενδιάμεσα μόρια και τα σχετικά βήματα-στάδια που

είναι κατάλληλα για απλούς αλχημικούς υπολογισμούς FEP. Έτσι, «εκμεταλλεζόμενοι» ότι η ελεύθερη ενέργεια είναι μια συνάρτηση κατάστασης, η ολική σχετική ελεύθερη ενέργεια (ΔG) θα δίνεται από το άθροισμα των αλλαγών κάθε σταδίου. Η επιλογή των ενδιάμεσων βημάτων θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε τελικά να εξασφαλιστεί η μεγαλύτερη δυνατή επικάλυψη μεταξύ των διαμορφωτικών χώρων. Παραδείγματος χάριν, τα ενδιάμεσα στάδια στους μεταλλαγμένους μετασχηματισμούς του σχήματος 7.3 επιλέχθηκαν έτσι ώστε το φορτίο του κάθε συστήματος να παραμένει σταθερό^{53,54}.

7.3 Παρουσίαση αποτελεσμάτων επικύρωσης και βελτιστοποίησης του υπολογιστικού μοντέλου

7.3.1 Γενικά

Ελέγχθηκε η σύγκλιση όλων των υπολογισμών FEP/MD με διαγράμματα των σχετικών ελευθέρων ενεργειών συναρτήσει του χρόνου (βλ. Παράρτημα). Για τον υπολογισμό της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας από τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BAR (βλ. Παράρτημα).²¹³ Τα σφάλματα των υπολογιστικών σχετικών ελευθέρων ενεργειών υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Bootstrap²¹⁴ χρησιμοποιώντας τον προεπιλεγμένο αλγόριθμο που υπάρχει στο Desmond. Η μέθοδος αυτή υπολογίζει την αβεβαιότητα των υπολογισμών, που προκύπτει από την πεπερασμένη φύση της προσομοίωσης, τόσο σε χώρο όσο και σε χρόνο. Στους υπολογισμούς που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκαν μικρές διακυμάνσεις, γεγονός που φανερώνει μια καλά εξισορροπημένη προσομοίωση και καλή δειγματοληψία του στατιστικού συνόλου.^{215,216} Για τον υπολογισμό των σφαλμάτων των πειραματικών μετρήσεων από την ITC χρησιμοποιήθηκε το σφάλμα διάδοσης (propagation error) (βλ. Παράρτημα).

7.3.2 Αξιολόγηση των υπολογισμών FEP/MD - Συσχέτιση με τις σταθερές διάστασης των συμπλόκων M2TM-προσδέτη που προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο ITC

7.3.2.1 Γενικά

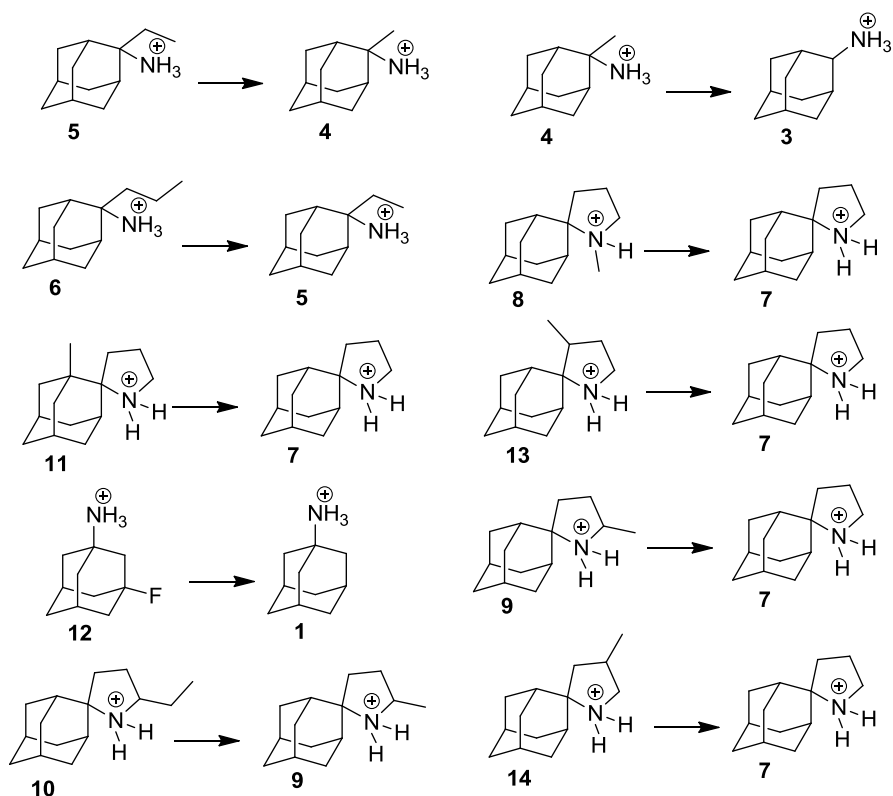
Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας που πραγματοποιήθηκε στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 σε όξινο pH, έγινε αρχικά η προσπάθεια εξοικονόμησης υπολογιστικού χρόνου με την εκτέλεση υπολογισμών διατηρώντας άκαμπτο τον πεπτιδικό σκελετό (backbone) της πρωτεΐνης ενσωματωμένης σε λιπιδική διπλοστιβάδα DPPC. Η συσχέτιση μεταξύ υπολογιστικών και πειραματικών αποτελεσμάτων ήταν χαμηλή ($R^2 = 0.20$). Για το λόγο αυτό στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί FEP/MD σε πλήρως ευκίνητη πρωτεΐνη, όπου τα αποτελέσματα

των υπολογισμών αυτών παρουσίασαν καλή συσχέτιση ως προς τα πειραματικά αποτελέσματα και η συσχέτιση βελτιώθηκε⁵⁴. Η ίδια τακτική εφαρμόστηκε και σε επόμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, όπου οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε βασικό pH. Η συσχέτιση ήταν και πάλι καλή ($R^2 = 0.85$) για τις μεταλλάξεις 5→4, 4→3, 6→5, 8→7, 11→7, 13→7, 12→1, 2→1, 3→1 (οι δύο τελευταίοι αλχημικοί μετασχηματισμοί πραγματοποιήθηκαν μέσω ενδιάμεσου βήματος).⁵³ Όμως μετά την πραγματοποίηση και των υπολογισμών 9→7, 14→7, 10→9 υπό τις ίδιες συνθήκες, η συσχέτιση έπεσε στο ($R^2 = 0.48$).

7.3.2.2 Αποτελέσματα υπολογισμών FEP/MD για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν οι κάτωθι υπολογισμοί FEP/MD (σχήμα 7.4) -συν αυτούς που πραγματοποιήθηκαν μέσω ενδιάμεσου σταδίου, όπως περιγράφηκε παραπάνω (σχήμα 7.3)- σε πλήρως ευέλικτο σύστημα ενσωματωμένο σε λιπιδική διπλοστιβάδα DMPC, όπου η πρωτεΐνη αφήνεται να κινηθεί ελεύθερα χωρίς κανέναν περιορισμό στους βαθμούς ελευθερίας των βαριών ατόμων, όπως επίσης και σε ρυθμιστικό διάλυμα –απουσία πρωτεΐνης και λιπιδίων.

Συγκεκριμένα για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς 2→int1, int1→1, 3→int2, int2→1 εφαρμόστηκαν συνολικοί χρόνοι εξισορρόπησης-παραγωγής 12 ns, 12 ns, 6 ns και 6 ns αντίστοιχα, ενώ για όλους τους υπόλοιπους εφαρμόστηκαν χρόνοι 4 ns για κάθε παράθυρο των υπολογισμών FEP στο σύμπλοκο προσδέτη-πρωτεΐνης. Στους υπολογισμούς FEP σε διάλυμα εφαρμόστηκαν συνολικοί χρόνοι εξισορρόπησης-παραγωγής 2 ns για κάθε παράθυρο, για όλους τους αλχημικούς μετασχηματισμούς.



Σχήμα 7.4: Αλχημικοί μετασχηματισμοί των οποίων υπολογίστηκε η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας για το σύμπλοκο με M2TM και σε διάλυμα με τη μέθοδο FEP/MD.

Υπολογίστηκαν οι διαφορές ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης $\Delta\Delta G$. Σύμφωνα με τον θερμοδυναμικό κύκλο του σχήματος 7.2 και την εξίσωση (7.1) υπολογίστηκαν οι τιμές ΔG για τις αλχημικές μεταβολές από όπου προκύπτει η διαφορά για τις ελεύθερες ενέργειες σύνδεσης. Από τις πειραματικές σταθερές σύνδεσης K_B , K_A για τα αντίστοιχα ζεύγη προσδετών B και A προκύπτει επίσης η σχετική ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης σύμφωνα με τη σχέση (7.2)

$$\Delta\Delta G_{\text{bind, exp}} = -RT \ln \frac{K_A}{K_B} = \Delta G_B - \Delta G_A \quad (7.2)$$

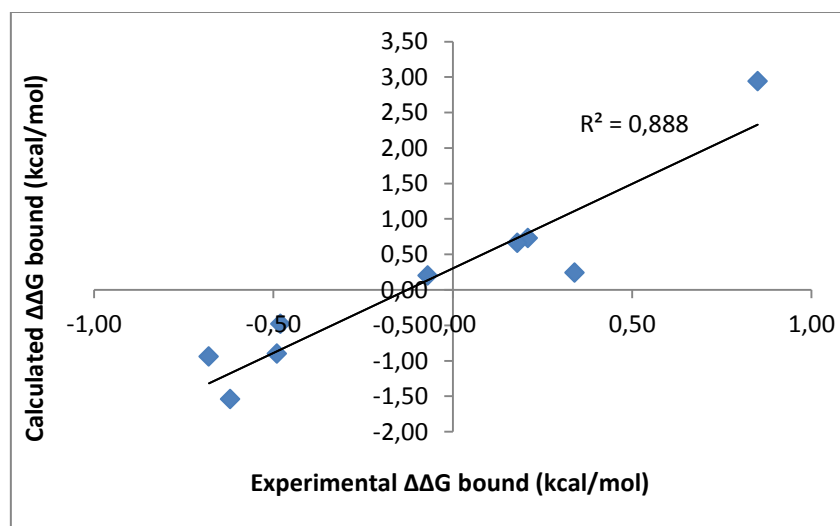
Στον πίνακα 7.1 παρατίθενται τα αποτελέσματα των υπολογισμένων τιμών, $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ (FEP/MD), μαζί με τα αντίστοιχα πειραματικά αποτελέσματα ITC, $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ (ITC). Οι πειραματικές ελεύθερες ενέργειες προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη σχέση $\Delta\Delta G_{\text{bind, exp}} = \Delta G_B - \Delta G_A$ και τις σταθερές σύνδεσης για τους προσδέτες A, B που προκύπτουν από τις μετρήσεις ITC (βλ. Κεφάλαιο 10).

Πίνακας 7.1: Υπολογιστικές (FEP/MD) και πειραματικές τιμές (ITC) της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης μεταξύ προσδετών για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς των σχημάτων 7.3 και 7.4.

Mutation	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ FEP/MD (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ ITC (kcal/mol)
5→4	0.73 ± 0.13	0.21 ± 0.18
13→7	-0.48 ± 0.13	-0.48 ± 0.23
12→1	-1.54 ± 0.12	-0.62 ± 0.20
14→7	-0.49 ± 0.12	-0.79 ± 0.27
8→7	-0.90 ± 0.36	-0.49 ± 0.29
6→5	0.20 ± 0.14	-0.07 ± 0.18
4→3	0.24 ± 0.14	0.34 ± 0.18
2→1	2.94 ± 0.63	0.85 ± 0.33
11→7	-0.94 ± 0.17	-0.68 ± 0.27
10→9	0.84 ± 0.13	-0.02 ± 0.36
9→7	-0.15 ± 0.15	-1.15 ± 0.30
3→1	0.66 ± 0.46	0.24 ± 0.19

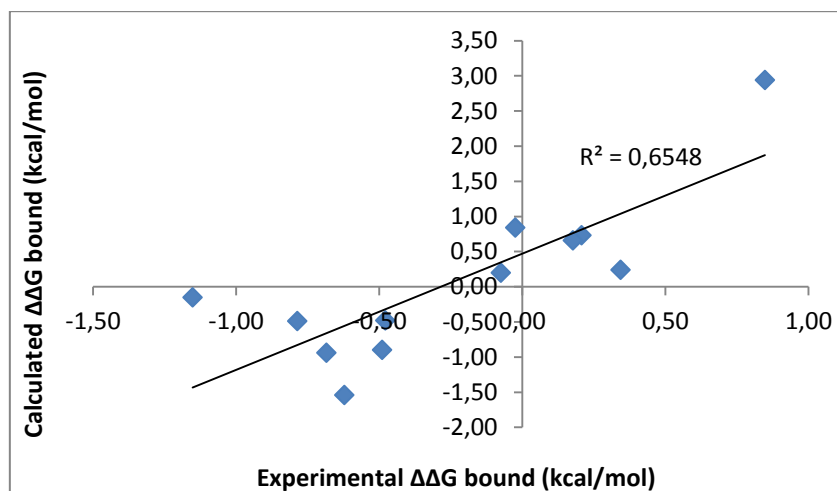
7.3.2.3 Διαγράμματα συσχέτισης υπολογισμών FEP/MD με τις πειραματικές τιμές για αλχημικούς μετασχηματισμούς

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των υπολογισμών της παρούσας εργασίας με την προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας⁵³ όπου χρησιμοποιήθηκε DPPC αντί του DMPC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τις μεταλλάξεις 5→4, 4→3, 6→5, 8→7, 11→7, 13→7, 12→1, 2→1, 3→1 παρατηρείται ελαφρά βελτίωση της συσχέτισης, από ($R^2 = 0.85$) σε ($R^2 = 0.89$) (σχήμα 7.5).



Σχήμα 7.5: Συσχέτιση μεταξύ υπολογισμένων και πειραματικών τιμών $\Delta\Delta G_{\text{b}}$. Ελήφθησαν υπόψη οι αλχημικοί μετασχηματισμοί 5→4, 4→3, 6→5, 8→7, 11→7, 13→7, 12→1, 2→1, 3→1.

Όμως, λαμβάνοντας υπόψιν και τους υπολογισμούς για τις μεταλλάξεις 9→7, 14→7, 10→9, η συσχέτιση αυξάνεται σημαντικά, από $R^2 = 0.48$ με DPPC σε $R^2 = 0.66$ με DMPC (σχήμα 7.6).



Σχήμα 7.6: Συσχέτιση μεταξύ υπολογισμένων και πειραματικών τιμών $\Delta\Delta G_b$. Ελήφθησαν υπόψη οι αλχημικοί μετασχηματισμοί 5→4, 4→3, 6→5, 8→7, 11→7, 13→7, 12→1, 2→1, 3→1 και οι 9→7, 14→7, 10→9 που δεν ελήφθησαν υπόψη στην προηγούμενη μελέτη.

7.4 Σχεδιασμός νέων αμινοαδαμαντανικών ενώσεων

Η περαιτέρω επικύρωση του υπολογιστικού μοντέλου, καθώς και η βελτιστοποίησή του με την αντικατάσταση της διπλοστιβάδας DPPC από την DMPC, δίνει καλή συσχέτιση με $R^2 = 0.66$ (πιο αναλυτικά στο εδάφιο 10.4) και εξαιρετικό δείκτη πρόβλεψης $PI = 0.97$.

Ο δείκτης πρόβλεψης PI (predictive index) έχει προταθεί από τους Pearlman και Charifson²¹⁷ ως μέτρο ορθότητας της σχετικής κατάταξης μιας σειράς προσδετών με βάση την ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης, και υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση 7.3:

$$PI = \frac{\sum_{j>i} \sum_i w_{ij} C_{ij}}{\sum_{j>i} \sum_i w_{ij}} \quad (7.3)$$

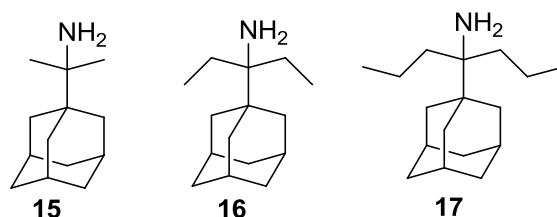
$$w_{ij} = |E(j) - E(i)|$$

$$C_{ij} = \begin{cases} -1 & \text{if } \frac{E(j) - E(i)}{P(j) - P(i)} < 0 \\ +1 & \text{if } \frac{E(j) - E(i)}{P(j) - P(i)} > 0 \\ 0 & \text{if } P(j) - P(i) = 0 \end{cases}$$

όπου $E(i)$ και $P(i)$ είναι η πειραματικά προσδιορισμένη και η υπολογιστικά προβλεπόμενη ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης της ένωσης i αντίστοιχα. Ο δείκτης PI κυμαίνεται μεταξύ -1 και $+1$, ανάλογα με το πόσο καλά η υπολογιστική κατάταξη ταιριάζει με το πειραματική. Η τιμή $+1$ υποδηλώνει τέλεια συσχέτιση του υπολογιστικού μοντέλου με τις πειραματικές τιμές (άρα και καλή προβλεπτική ικανότητα), η τιμή -1 υποδηλώνει ότι οι τιμές του υπολογιστικού μοντέλου είναι ακριβώς αντίθετες από τις πειραματικές τιμές, και η τιμή 0 υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ του υπολογιστικού μοντέλου και των πειραματικών τιμών (τυχαία αποτελέσματα). Στην ουσία, η μέθοδος θεωρεί κάθε ζεύγος των ενώσεων i και j σε σειρά. Μεγάλες διαφορές στις πειραματικές ελεύθερες ενέργειες σύνδεσης του ζεύγους (ΔG_{exp_j} , ΔG_{exp_i}) έχουν μεγάλο συντελεστή w_{ij} ο οποίος παρέχει μια μεγάλη θετική συμβολή στην τελική PI , εάν η κατάταξη της υπολογιστικής σχετικής ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης του ζεύγους ($\Delta\Delta G_{fer_{ij}}$) είναι σύμφωνη με τα πειραματικά δεδομένα ($\Delta\Delta G_{exp_{ij}}$). Αν η διαφορά μεταξύ ΔG_{exp_j} και ΔG_{exp_i} είναι μικρή, τότε συμβαίνει το αντίθετο, ώστε ακόμα και μια ενδεχόμενη λανθασμένη υπολογιστική τιμή $\Delta\Delta G_{fer_{ij}}$ για τον προσδέτη με τη μεγαλύτερη πειραματική συγγένεια σύνδεσης, να έχει μικρή επίδραση στον τελικό δείκτη PI . Αυτό αντανακλά ότι ένα καλό υπολογιστικό μοντέλο είναι πολύ σημαντικό να μπορεί να διακρίνει μεταξύ σχετικών $\Delta\Delta G_{fer_{ij}}$ που επιφέρουν μεγάλη αλλαγή στη σύνδεση (δηλαδή στην πειραματική τιμή) από τον ένα προσδέτη του ζεύγους στον άλλο. Αντίθετα, η διάκριση μιας μικρής σχετικής μεταβολής στη σύνδεση με μετατροπή του προσδέτη i στον j είναι λιγότερο σημαντική για ένα υπολογιστικό μοντέλο, καθώς δε συνεπάγεται κάποια δραματική αλλαγή στο πειραματικό αποτέλεσμα.

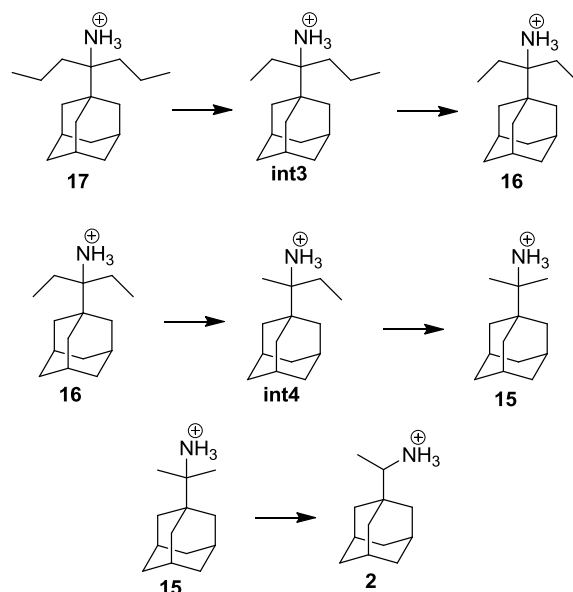
Τα παραπάνω ενθάρρυναν τη χρήση του μοντέλου αυτού για το σχεδιασμό νέων φαρμακομορίων. Συγκεκριμένα, ο σχεδιασμός αποσκοπούσε στη διερεύνηση της επίδρασης της αύξησης του μεγέθους των αλκυλίων σε παράγωγα της ριμανταδίνης **2** (σχ. 7.1): α) στη συγγένεια σύνδεσης (binding affinity) με την $A/M2TM$, β) στη δραστηκότητα *in vitro* έναντι ιών WT καθώς επίσης και μεταλλαγμένων ιών.

Με βάση τα παραπάνω σχεδιάστηκαν οι ενώσεις **15-17**:



Σχήμα 7.7: Αμινοαδαμαντάνια που σχεδιάστηκαν με χρήση του υπολογιστικού μοντέλου FEP/MD

Οι υπολογισμοί FEP/MD για τις προτεινόμενες δομές πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο που αναλύθηκε παραπάνω για τις υπόλοιπες ενώσεις.



Σχήμα 7.8: Αλχημικοί μετασχηματισμοί των νέων ενώσεων για τις οποίες υπολογίστηκε η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας για το σύμπλοκο με M2TM και σε διάλυμα με τη μέθοδο FEP/MD.

Συγκεκριμένα για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς 17→int3, int3→16, 16→int4, int4→15, 15→2 (σχ. 7.8) εφαρμόστηκαν στο σύμπλοκο προσδέτη-πρωτεΐνης ενσωματωμένης σε λιπιδική διπλοστιβάδα DMPC συνολικοί χρόνοι εξισορρόπησης-παραγωγής 6 ns, 12 ns, 6 ns, 6 ns και 12 ns για κάθε παράθυρο αντίστοιχα, ενώ για τους υπολογισμούς σε διάλυμα εφαρμόστηκαν 2 ns ανά παράθυρο. Οι τιμές που ελήφθησαν παρατίθενται στον πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2: : Υπολογιστικές (FEP/MD) της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης μεταξύ προσδετών για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς του σχήματος 8.8

Mutation	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ FEP/MD (kcal/mol)
17→16	1.20 ± 0.19
16→15	-0.21 ± 0.18
15→2	0.68 ± 0.15

Συνεπώς αναμένεται ο προσδέτης **15** να έχει μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα από τη ριμανταδίνη **2**, ο προσδέτης **17** μεγαλύτερη συγγένεια σύνδεσης από τον **16** και ο προσδέτης **16** μικρότερη συγγένεια σύνδεσης από τον **15**.

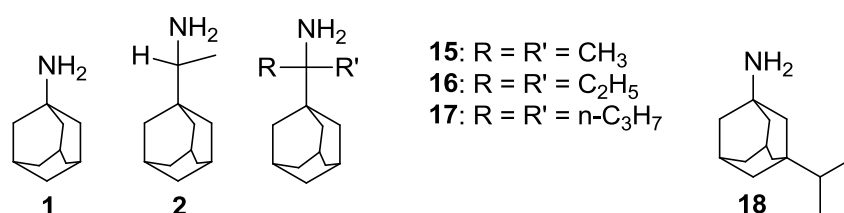
Συνολικά για όλους τους υπολογισμούς FEP/MD που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία (σε διάλυμα και σε σύμπλοκο προσδέτη-πρωτεΐνης) πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 1872 ns δειγματοληψίας.

Οι ενώσεις **15-17** συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσης εργασίας και αξιολογήθηκαν με ITC, όπως περιγράφεται στα κεφάλαια που ακολουθούν.

8 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΟΓΔΟΥ: ΠΟΡΕΙΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΝΕΩΝ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

8.1 Δομές των νέων ενώσεων

Αναφέρεται ότι το αμινοδαμαντάνιο **15** έχει συντεθεί (με διαφορετικό τρόπο από αυτόν που παρουσιάζεται εδώ) και έχει αξιολογηθεί *in vitro* ως προς την αναστολή του ιού WT από τους Aldrich et al.²¹⁸



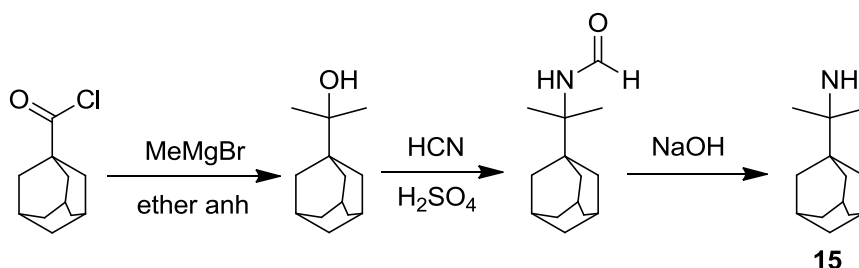
Σχήμα 8.1: Αμινοαδαμαντανικά παράγωγα που συντέθηκαν σε αυτή την εργασία

8.2 Σύνθεση των νέων ενώσεων

8.2.1 Σύνθεση των νέων αμινοαδαμαντανίων μέσω αναγωγής *tert*-αλκυλαζιδίων

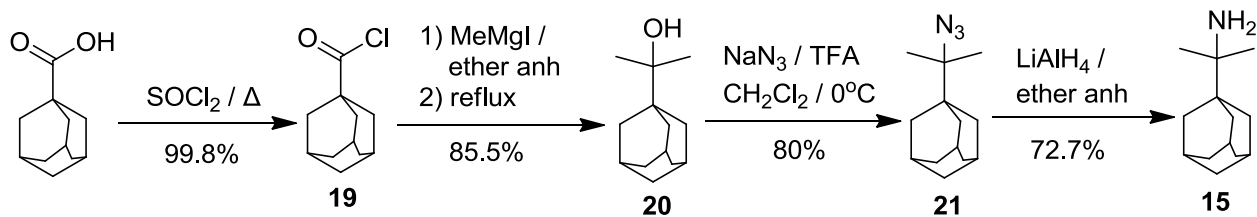
8.2.1.1 2-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-2-προπαναμίνη **15**

Η 2-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-2-προπαναμίνη **15** έχει συντεθεί στο παρελθόν¹ μέσω αντίδρασης Ritter σύμφωνα με τις αντιδράσεις του σχήματος 8.2.



Σχήμα 8.2: Σύνθεση της ένωσης **15** μέσω αντίδρασης Ritter²¹⁸.

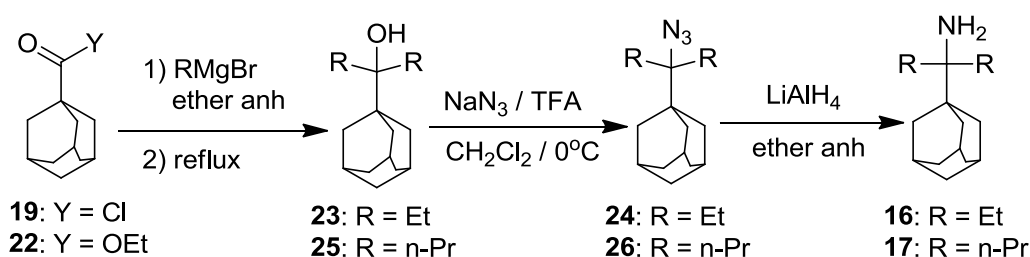
Η 2-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-2-προπαναμίνη **15** συντέθηκε στην παρούσα μελέτη σύμφωνα με τις αντιδράσεις του σχήματος 8.3.



Σχήμα 8.3: Σύνθεση της ένωσης 15 μέσω αναγωγής του αντίστοιχου *tert*-αλκυλαζιδίου.

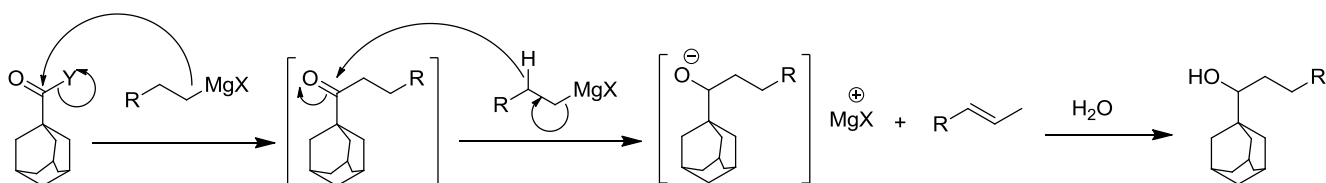
8.2.1.2 3-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-3-πενταναμίνη 16 και 4-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-4-επταναμίνη 17

Επιχειρήθηκε ανάλογη παρασκευή των αμινοαδαμαντανίων **16** (3-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-3-πενταναμίνη) και **17** (4-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-4-επταναμίνη) με βάση το παρακάτω σχήμα 8.4.



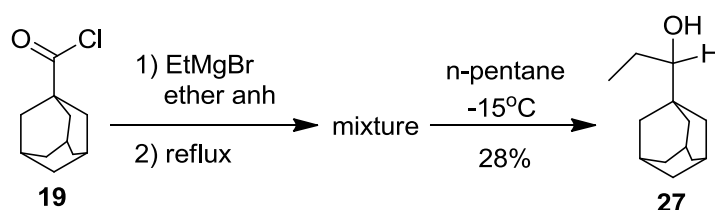
Σχήμα 8.4: Σχεδιασμός συνθετικής οδού για τη σύνθεση των ενώσεων 16 και 17 μέσω αναγωγής των αντίστοιχων *tert*-αλκυλαζιδίων.

Όμως οι αντιδράσεις Grignard των σχετικών οργανομαγνησιακών αντιδραστηρίων (αιθυλομαγνησιοβρωμίδιο και προπυλομαγνησιοβρωμίδιο), με το χλωρίδιο του 1-αδαμαντονοκαρβοξυλικού οξέος **19** και τον 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό αιθυλεστέρα **22** αντίστοιχα, οδήγησαν στον σχηματισμό σε σημαντικό ποσοστό προϊόντος αναγωγής του υποστρώματος, μαζί με την τριτοταγή αλκοόλη. Το προϊόν αναγωγής σχηματίζεται μέσω β-απόσπασης υδριδίου (β-hydride transfer) του μαλακού οργανομαγνησιακού αντιδραστηρίου (σχήμα 8.5) που ευνοείται με την αύξηση του όγκου γύρω από το καρβονύλιο (ηλεκτρονιόφιλο κέντρο) ώστε να ληφθεί μείγμα δευτεροταγούς και τριτοταγούς αλκοόλης.



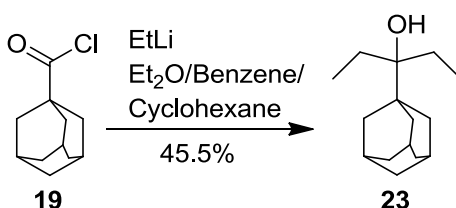
Σχήμα 8.5: β-απόσπαση υδριδίου στην αντίδραση οργανομαγνησιακού αντιδραστήριου και σταθεροποιημένα παραμποδιμένου ηλεκτρονιόφιλου κέντρου (στην παραπάνω περίπτωση 1-αδαμαντονοκαρβονυλοχλωριδίου και 1-αδαμαντονοκαρβοξυλικού αιθυλεστέρα

Πράγματι κατά την αντίδραση του 1-αδαμαντονοκαρβονυλοχλωριδίου με αιθυλομαγνησιοβρωμίδιο ελήφθη μείγμα τριτοταγούς αλκοόλης **23** και δευτεροταγούς αλκοόλης **27**. Η δευτεροταγής αλκοόλη **27** (σχήμα 8.6) απομονώθηκε μέσω κρυστάλλωσης πολύ αραιού διαλύματος του μείγματος (συνολική απόδοση 28%) και η δομή της διευκρινίστηκε με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR.



Σχήμα 8.6: Σχηματισμός 1-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-1-αιθανόλης **27** από την αντίδραση αιθυλομαγνησιοβρωμιδίου με το 1-αδαμαντονοκαρβονυλοχλωρίδιο **19**

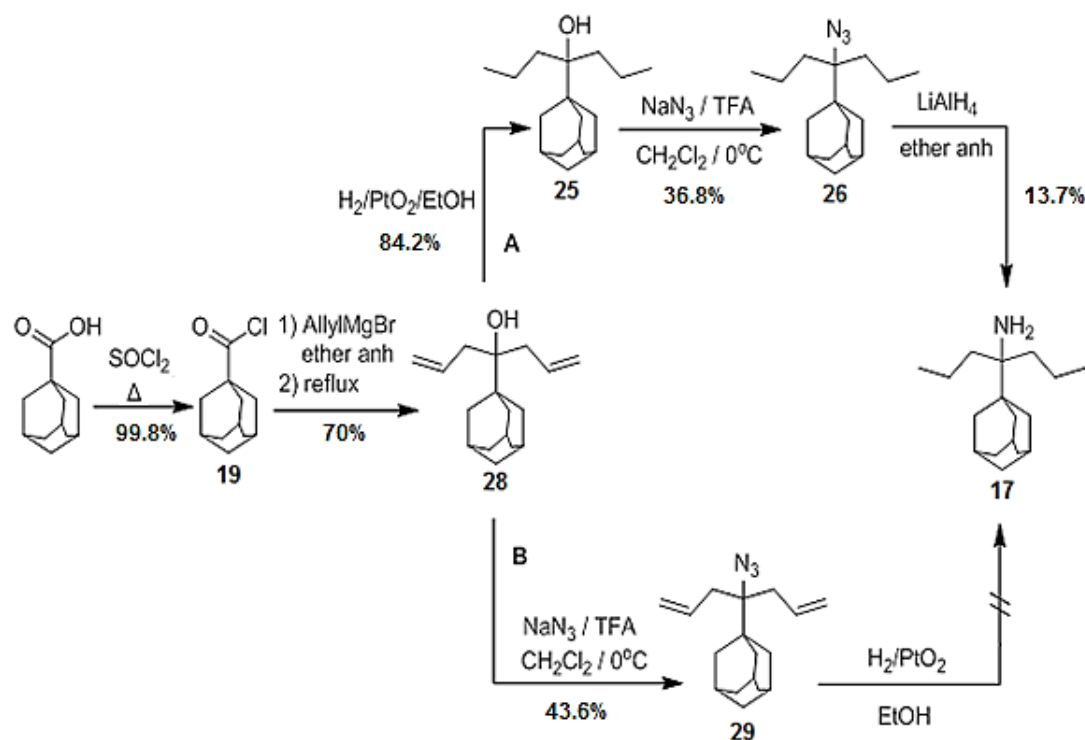
Για να αποφευχθεί η β-απόσπαση για την παρασκευή της τριτοταγούς αλκοόλης **23**, που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση της 3-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-3-πενταμίνης **16**, χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία το δραστηκότερο αιθυλλίθιο (σχήμα 8.7).



Σχήμα 8.7: Σύνθεση της 3-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-3-πεντανόλης **23** από το 1-αδαμαντονοκαρβονυλοχλωρίδιο **19**.

Για την παρασκευή της 4-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-4-επταμίνης **17** εξετάστηκε η παρασκευή μέσω της διαλλυλαλκοόλης **28** και η ακόλουθη καταλυτική υδρογόνωση. Επιλέχθηκε η χρήση αλλυλομαγνησιοβρωμιδίου και καταλυτική υδρογόνωση με την προσδοκία ότι θα μπορούσε μέσω αυτής της συνθετικής οδού να συντεθεί και η αντίστοιχη διαλλυλαμίνη. Το αλλυλομαγνησιοβρωμίδιο δεν δίνει αντιδράσεις β-μετάθεσης υδριδίου, συνεπώς η παρασκευή της τριτοταγούς αλκοόλης πραγματοποιείται σε καλή απόδοση από την αντίδραση του 1-αδαμαντονοκαρβονυλοχλωριδίου **19** με το αλλυλομαγνησιοβρωμίδιο (σχήμα 8.8). Στο σχήμα 8.8

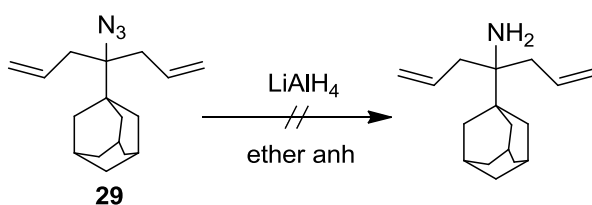
φαίνονται οι πιθανές πορείες που μελετήθηκαν για τη σύνθεση της 4-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-4-επταναμίνης **17**.



Σχήμα 8.8: Σύνθεση της 4-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-4-επταναμίνης **17** από το 1-αδαμαντανοκαρβόνυλοχλωρίδιο **19**.

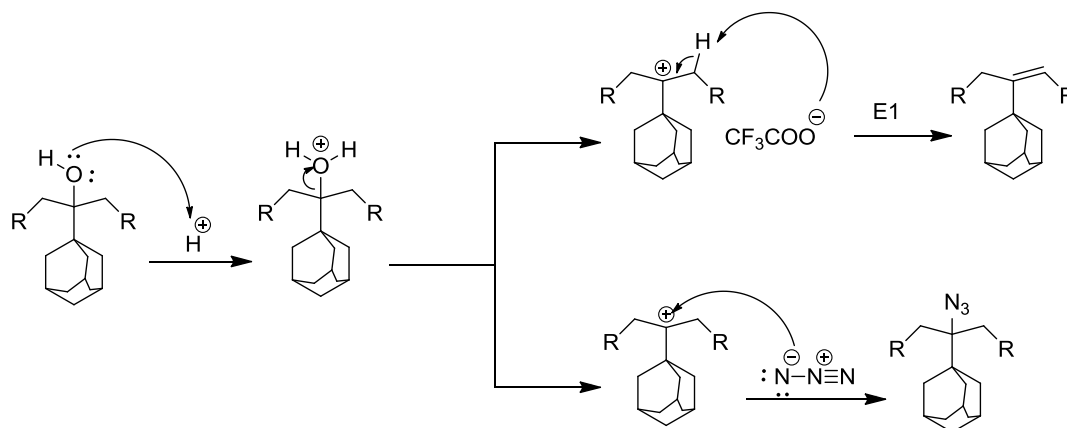
Η πορεία B περιλαμβάνει το σχηματισμό του διαλλυλοαζιδίου **29** το οποίο όμως με καταλυτική υδρογόνωση οδηγεί σε διάσπαση και πολύπλοκο μείγμα προϊόντων. Στην πορεία A πρώτα σχηματίζεται η κορεσμένη αλκοόλη **25** μέσω καταλυτικής υδρογόνωσης υπεράνω οξειδίου του λευκοχρύσου (H₂/PtO₂), η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται στην επιθυμητή *tert*-αλκυλαμίνη **17** μέσω σχηματισμού του *tert*-αλκυλοαζιδίου **26** και αναγωγής του με LiAlH₄.

Η αναγωγή του διαλλυλοαζιδίου **29** για τη σύνθεση και απομόνωση του αντίστοιχου διάλλυλο αμινοαδαμαντανίου έδωσε πολύπλοκο μίγμα προϊόντων (σχ. 8.9)



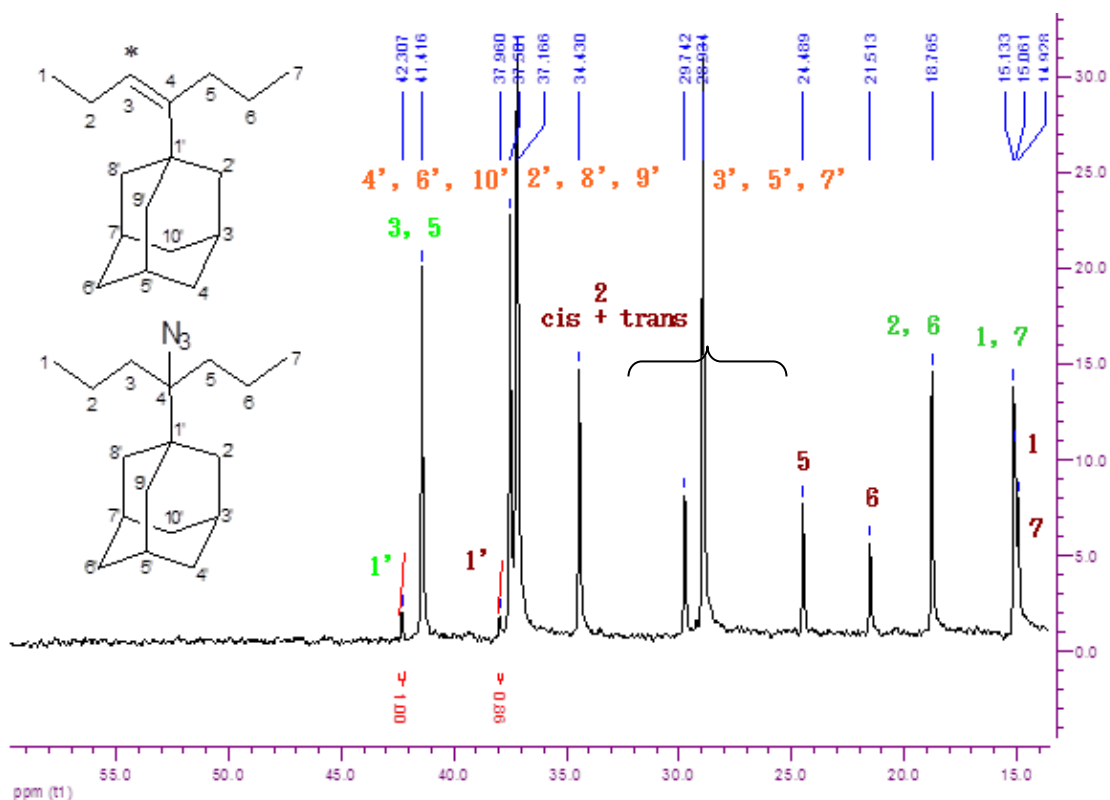
Σχήμα 8.9: Αναγωγή του διαλλυλοαζιδίου **29** με LiAlH₄.

Για υποκαταστάτες μεγαλύτερους του μεθυλίου, η αντίδραση μετατροπής της τριτοταγούς αλκοόλης AdCR_2OH προς το αντίστοιχο αζίδιο, έδωσε σημαντικό ποσοστό ολεφινικού παραπροϊόντος απόσπασης σύμφωνα με τον παρακάτω μηχανισμό (σχ. 8.10):



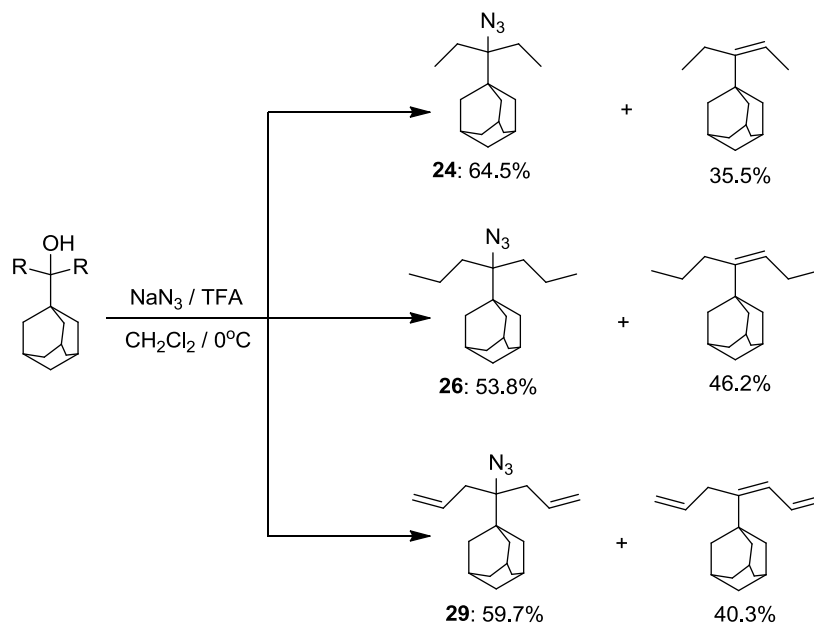
Σχήμα 8.10: Μηχανισμός σχηματισμού μίγματος αζιδίου αλκενίου κατά την κατεργασία της αλκοόλης 24 ή 25 με $\text{NaN}_3/\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$.

Το ποσοστό του ολεφινικού παραπροϊόντος υπολογίστηκε με βάση την ολοκλήρωση των φασμάτων ^{13}C NMR όπως φαίνεται στο σχήμα 8.11 για την περίπτωση του AdPr_2CN_3 26.



Σχήμα 8.11: Φάσμα ^{13}C NMR μίγματος του AdPr_2CN_3 26 και του αντίστοιχου αλκενίου $\text{AdPrC}(=\text{CHCH}_2\text{CH}_3)$ όπως προκύπτει κατά την κατεργασία της αλκοόλης AdPr_2COH 25 με $\text{TFA}/\text{NaN}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$. Με πράσινο χρώμα επισημαίνονται οι κορυφές του αζιδίου και με καφέ οι κορυφές του αλκενίου. Στο σχήμα φαίνονται οι κορυφές που χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση. Με πορτοκαλί χρώμα επισημαίνονται οι κορυφές του αδαμαντανίου που δεν διαχωρίζονται για το αζίδιο και αλκένιο.

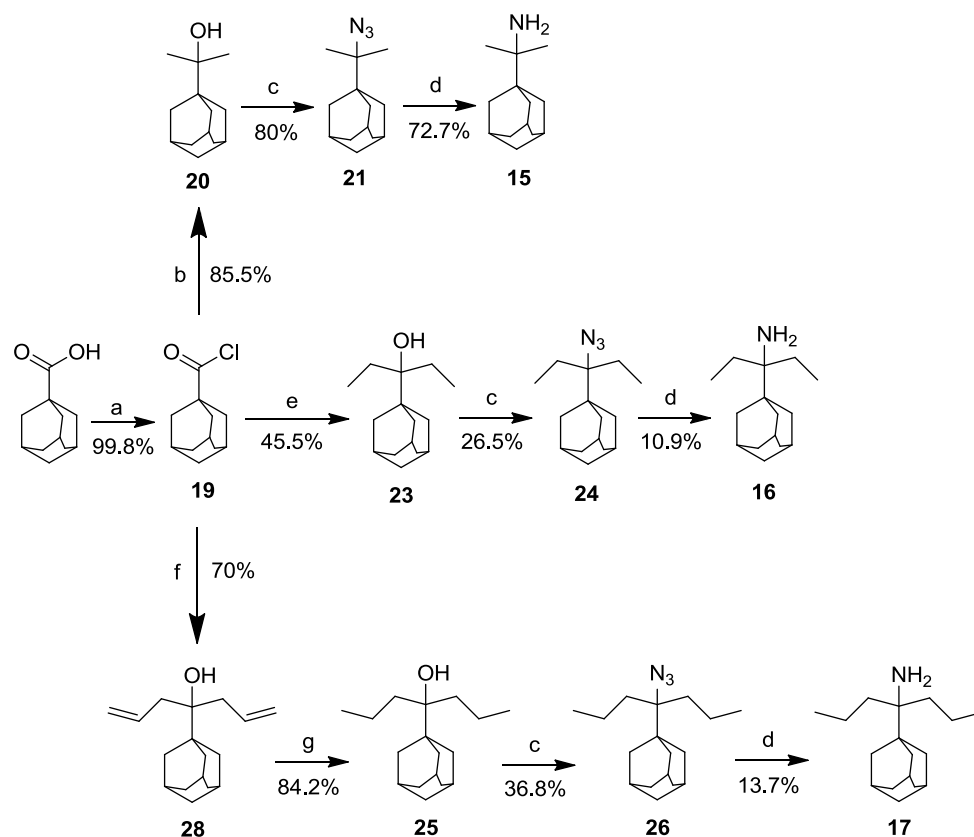
Το ποσοστό του ολεφινικού παραπροϊόντος υπολογίστηκε με βάση την ολοκλήρωση των φασμάτων ^{13}C NMR σε 35.5%, 46.2% και 40.3% του μείγματος κατά την παρασκευή των **24**, **26** και **29** αντίστοιχα (σχ. 8.12).



Σχήμα 8.12: Σχηματισμός μείγματος αζιδίου-αλκενίου κατά την κατεργασία της αλκοόλης **24** ή **25** ή **28** σε διαφορετικές αναλογίες αζιδίου:αλκενίου.

Το μείγμα αζιδίου-ολεφίνης χρησιμοποιήθηκε χωρίς να διαχωριστεί ή να υποστεί άλλο καθαρισμό στην αντίδραση αναγωγής προς αμίνη, η οποία για τα υποστρώματα AdR_2CN_3 ($\text{R} = \text{Et}, \text{Pr}$) εμφανίζει χαμηλή απόδοση.

Στο σχήμα 8.13 συνοψίζονται οι πορείες σύνθεσης των αμινοαδαμαντανίων **15-17** με τη συγκεκριμένη συνθετική οδό.



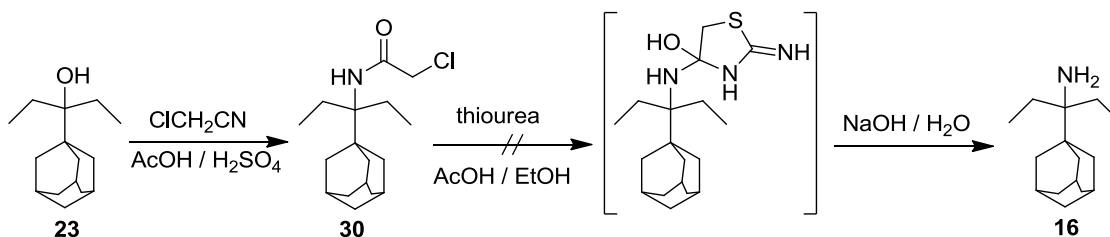
Σχήμα 8.13: Πορείες σύνθεσης των πρωτοταγών *tert*-αλκυλαμινών 15-17 AdR_2CNH_2 μέσω αναγωγής αζιδίου. Reagents and Conditions: (a) SOCl_2 , reflux, 2 h. (b) i. MeMgI , dry ether ii. gentle reflux, Ar, 4 h. (c) NaN_3 , TFA, CH_2Cl_2 , 0°C , 4 h. (d) LiAlH_4 , dry ether, reflux, 5 h. (e) EtLi , dry ether, benzene, cyclohexane, Ar, 26 h. (f) i. AllylMgBr , dry ether ii. gentle reflux, Ar, 4 h (g) H_2 , PtO_2 , EtOH , 20 h.

8.2.2 Σύνθεση των νέων αμινοαδαμαντανίων μέσω τροποποιημένης αντίδρασης Ritter και μέσω προσθήκης σε σουλφινίμη

8.2.2.1 Τροποποιημένη αντίδραση Ritter

Λόγω της σχετικά χαμηλής απόδοσης του σταδίου αναγωγής του αζιδίου (σχ. 8.13), αναζητήθηκαν εναλλακτικές συνθετικές οδοί για την παρασκευή των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων **16** και **17**.

Εφαρμόστηκε η σειρά αντιδράσεων του σχήματος 8.14 που περιλαμβάνει μια τροποποιημένη αντίδραση Ritter²¹⁹.



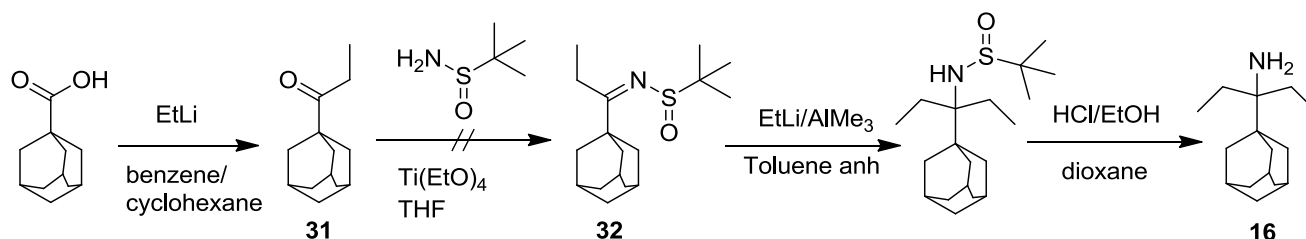
Σχήμα 8.14: Εφαρμογή τροποποιημένης αντίδρασης Ritter για τη σύνθεση της AdEt₂CNH₂ 16

Η σειρά αντιδράσεων του σχήματος 8.14 δεν ήταν αποδοτική. Η αντίδραση Ritter έδωσε το επιθυμητό χλωρακεταμίδιο (ως μείγμα με ολεφινικό προϊόν όπως προηγουμένως), όμως η απόμάκρυνση της χλωρακετυλομάδας μέσω της αντίδρασης του χλωρακεταμιδίου **30** με θειουρία οδήγησε σε μείγμα με ίχνη αμινικού προϊόντος, από το οποίο δεν παρελήφθη καθαρή η αμίνη **16** (το αμινικό προϊόν απομονώνεται μέσω υδροχλωρικού άλατος και ακολουθεί καθαρισμός μέσω ανακρυστάλλωσης φουμαρικού άλατος).

Η αποτυχία παρασκευής της ένωσης **16** πιθανώς οφείλεται στην αδυναμία σχηματισμού σταθερού ενδιάμεσου της ένωσης **30** με θειουρία. Υπολογισμοί MM2 φανερώνουν τη στερεοχημική παρεμπόδιση μεταξύ δακτυλίου και τριτοταγούς ομάδας (AdCEt₂NH₂).

8.2.2.2 Πυρηνόφιλη προσθήκη οργανομεταλλικού αντιδραστήριου σε *t*-βουτυλοσουλφινιμίνη

Σχεδιάστηκε επίσης η πορεία του σχήματος 8.15 που περιλαμβάνει την πυρηνόφιλη προσθήκη οργανομεταλλικού αντιδραστήριου στη σουλφινιμίνη **32**.



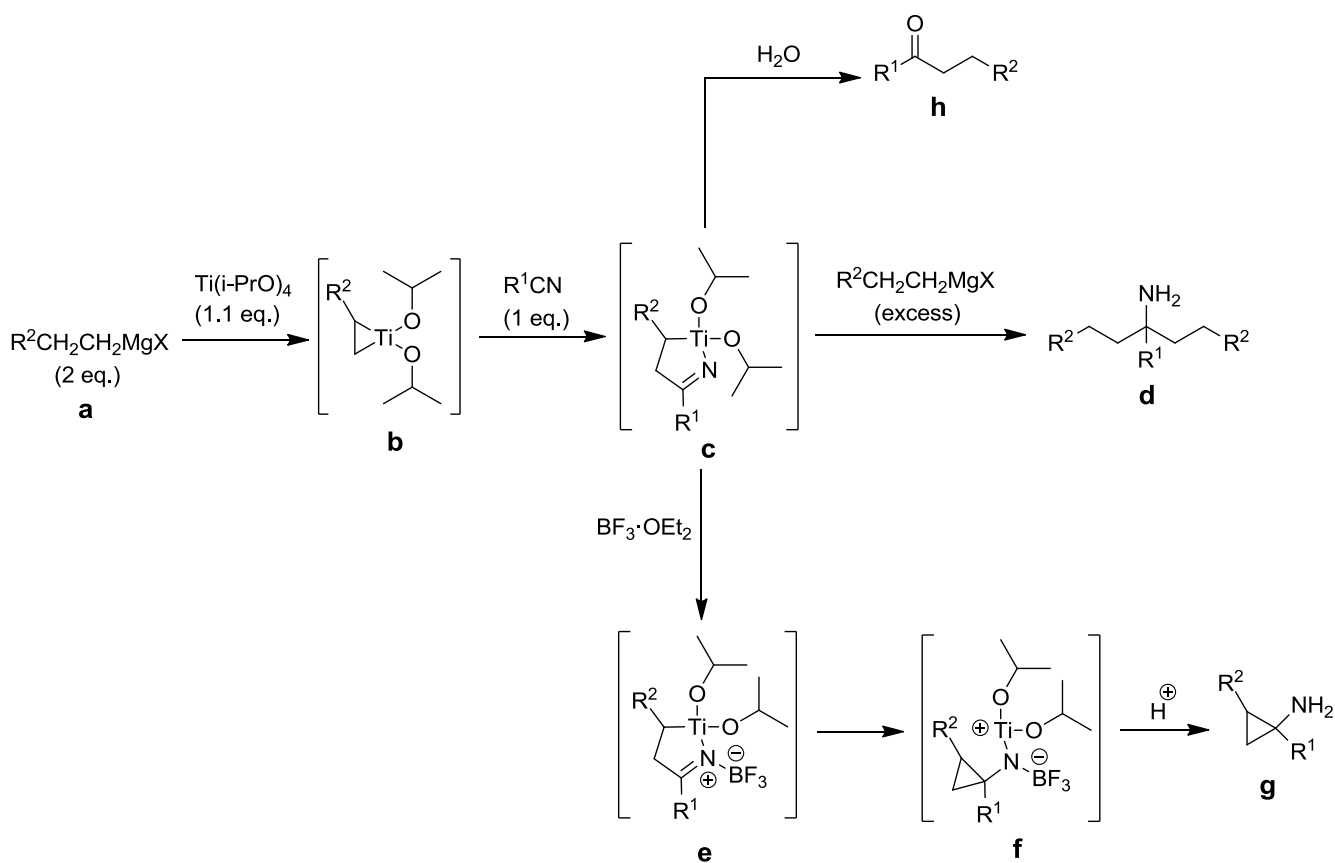
Σχήμα 8.15: Συνθετική οδός για την παρασκευή της AdCEt₂NH₂ 15 μέσω πυρηνόφιλης προσθήκης οργανομεταλλικού αντιδραστήριου στην *t*-βουτυλοσουλφινιμίνη **32**.

Το παραπάνω συνθετικό σχήμα^{220–222} δεν ήταν αποδοτικό, καθώς η σουλφινιμίνη **32** δεν σχηματίστηκε πιθανότατα λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης.

8.2.3 Σύνθεση των νέων αμινοαδαμαντανίων μέσω αντίδρασης οργανομεταλλικού αντιδραστήριου και νιτριλίου παρουσία τετραϊσοπροπόξυτιτανίου

8.2.3.1 Αντίδραση Kulinkovich-Szymoniak

Στη συνέχεια εξετάστηκε η σύνθεση των επιθυμητών αμινοαδαμαντιών με μια συνθετική πορεία μίας φιάλης (one-flask synthesis). Συγκεκριμένα μελετήθηκε η εφαρμογή της αντίδρασης Kulinkovich-Szymoniak, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για την παρασκευή κυκλοπροπυλαμινών και άλλων κυκλοαλκαναμινών μέσω της αντίδρασης οργανομεταλλικού αντιδραστήριου επί νιτριλίου. Για την αντίδραση Kulinkovich-Szymoniak έχει προταθεί ο μηχανισμός του σχήματος 8.16.^{223–226}

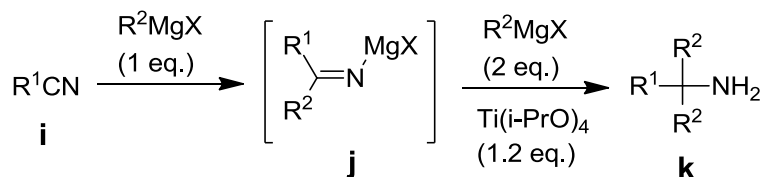


Σχήμα 8.16: Προτεινόμενος μηχανισμός της αντίδρασης Kulinkovich-Szymoniak.

Όπως παρατηρήθηκε από την ομάδα του Szymoniak²²³, σε συνθήκες περίσσειας του οργανομαγνησιακού και χωρίς προσθήκη οξέος κατά Lewis (π.χ. $BF_3 \cdot OEt_2$), σχηματίζεται αποκλειστικά και σε καλή απόδοση μια α,α,α -τρισυποκατεστημένη πρωτοταγής αμίνη **d**. Αντίθετα με την προσθήκη $BF_3 \cdot OEt_2$ σχηματίζεται η κυκλοπροπαναμίνη **g**. Σημειώνεται ότι στη συγκεκριμένη

εργασία παρασκευάστηκε η 1-(1'-αδαμαντανυλ)κυκλοπροπαναμίνη από 1-αδαμαντανοκαρβονιτρίλιο.

Στη συνέχεια οι ομάδες των de Meijere^{227,228} και Tymoshenko²²⁹, τροποποιώντας το πειραματικό πρωτόκολλο της αντίδρασης Kulinkovich-Szymoniak, πέτυχαν την σύνθεση α,α,α-τρισυποκατεστημένων πρωτοταγών αμινών προτείνοντας την αλληλουχία αντιδράσεων του σχήματος 8.17.



Σχήμα 8.17: Σχηματική περιγραφή του σχηματισμού μιας πρωτοταγούς *tert*-αλκυλαμίνης από την αντίδραση νιτρίλιου με περίσσεια οργανομαγνησιακού αντιδραστήριου παρουσία Ti(OPr-i)₄.

Το πρώτο στάδιο της αντίδρασης στην αλληλουχία αντιδράσεων του σχήματος 8.17 είναι η προσθήκη ενός αντιδραστήριου Grignard στο υπόστρωμα-νιτρίλιο **i** προς σχηματισμό ενός ιμινικού ενδιάμεσου συμπλόκου του μαγνησίου **j**. Ακολούθως, προστίθεται σε περίσσεια το αντιδραστήριο Grignard και το τετραϊσοπροποξυτιτάνιο που δρα ως οξύ Lewis για την ενεργοποίηση του ιμινικού ενδιάμεσου **j** ως προς την πυρηνόφιλη προσθήκη ενός ακόμα μορίου οργανομαγνησιακού αντιδραστήριου προς σχηματισμό της πρωτοταγούς α,α,α-τρισυποκατεστημένης αμίνης **k**. Επισημαίνεται ότι το οργανομαγνησιακό αντιδραστήριο προστίθεται σε ισομοριακή ποσότητα στο πρώτο στάδιο και, στις συνθήκες de Meijere, το τετραϊσοπροποξυτιτάνιο χρησιμοποιείται κυρίως ως ήπιο οξύ κατά Lewis αυξάνοντας την ηλεκτρονιοφιλία του ιμινικού άνθρακα, παρά για το σχηματισμό ενδιάμεσων κυκλικών συμπλόκων όπως στην κλασική Kulinkovich-Szymoniak. Στις συνθήκες de Meijere η προσθήκη του τετραϊσοπροποξυτιτανίου πραγματοποιείται μετά την πρώτη προσθήκη του οργανομαγνησιακού αντιδραστήριου οπότε έχει σχηματιστεί η ιμίνη **j**. Στη συνέχεια προστίθεται διμοριακή περίσσεια του οργανομαγνησιακού αντιδραστήριου. Έχει βρεθεί ότι το δεύτερο στάδιο είναι το κρίσιμο και για την πραγματοποίησή του απαιτείται βρασμός έως 24 ώρες. Αντίθετα το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται ταχέως. Στο δεύτερο στάδιο είναι δυνατή η χρήση διαφορετικών οργανομαγνησιακών αντιδραστηρίων (R³MgX) και οργανολιθιακών αντιδραστηρίων.²²⁷⁻²²⁹

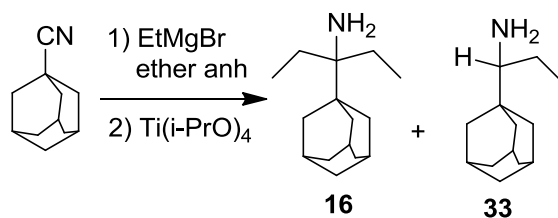
Θα πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερος πως σε όλες τις παραπάνω εργασίες, τα νιτρίλια που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την παρασκευή α,α,α-τρισυποκατεστημένων πρωτοταγών αμινών ήταν πρωτοταγή, δευτεροταγή ή αρωματικά (βενζονιτρίλιο). Δεν έχει αναφερθεί στη

βιβλιογραφία η σύνθεση α,α,α-τρισυποκατεστημένων πρωτοταγών αμινών με χρήση των συνθηκών της αντίδρασης Kulinkovich-Szymoniak ή των συνθηκών de Meijere με υπόστρωμα τριτοταγές νιτρίλιο.

8.2.3.2 Αντίδραση οργανομεταλλικών αντιδραστηρίων και αδαμαντανοκαρβοιτριλίου παρουσία τετραϊσοπροπόξυτιτανίου

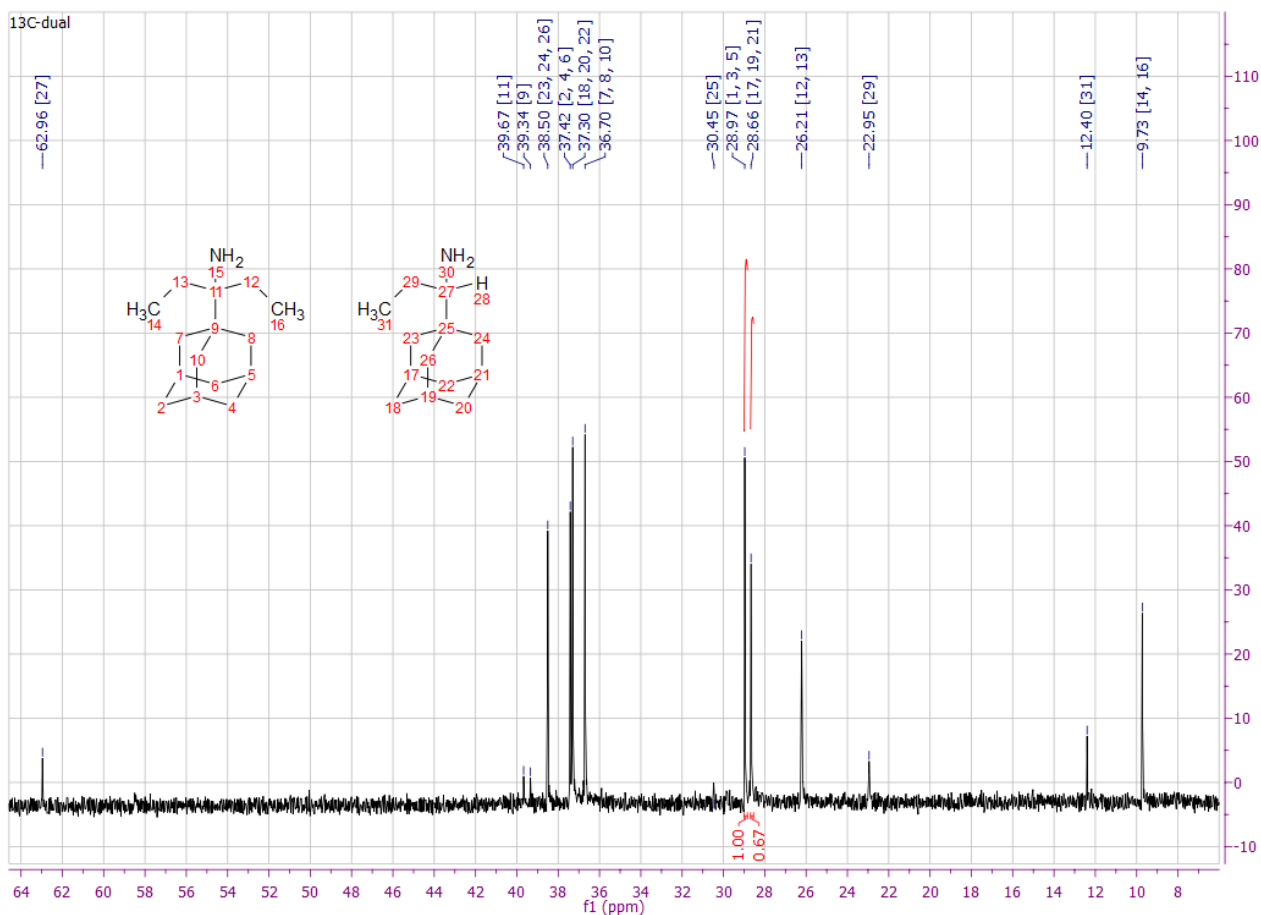
A) Συνθήκες de Meijere

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, εφαρμόστηκε η συνθετική πορεία του σχήματος 8.18 χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το τριτοταγές και στερεοχημικά παρεμποδισμένο 1-αδαμαντανονιτρίλιο σε συνθήκες de Meijere (βλ. σχ. 8.17).



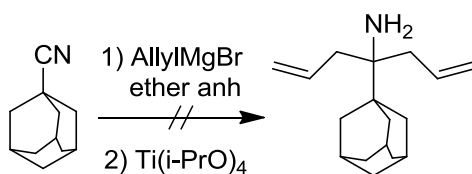
Σχήμα 8.18: Αντίδραση του 1-αδαμαντανοκαρβοιτριλίου με περίσσεια EtMgBr παρουσία Ti(OPr-i)₄ σε συνθήκες de Meijere.

Από την αντίδραση ελήφθη μαζί με το επιθυμητό α,α,α-τρισυποκατεστημένο αμινοαδαμαντάνιο **16** και το α,α-δισυποκατεστημένο αμινοαδαμαντάνιο **33** σε αναλογία 60:40 σύμφωνα με το φάσμα ¹³C NMR του σχήματος 8.19. Η τελευταία μπορεί να σχηματιστεί μέσω αναγωγής που προκαλείται από τη β απόσπαση υδριδίου από το οργανομαγνησιακό αντιδραστήριο στο πρώτο ή δεύτερο στάδιο της αντίδρασης του σχ. 8.18 (το αμινικό προϊόν απομονώνεται μέσω υδροχλωρικού άλατος και ακολουθεί καθαρισμός μέσω ανακρυστάλλωσης φουμαρικού άλατος). Ο διαχωρισμός των παραπάνω μέσω ανακρυστάλλωσης φουμαρικού άλατος δεν κατέστη δυνατός. Η απόδοση της αντίδρασης ως προς το αμινοαδαμαντάνιο **16** είναι 4%.



Σχήμα 8.19: Φάσμα ^{13}C NMR του προϊόντος αντίδρασης του 1-αδαμαντανοκαρβονιτριλίου με περίσσεια οργανομαγνησιακού αντιδραστήριου παρουσία $\text{Ti}(\text{OPr-}i)_4$ όπου ελήφθη μείγμα του α,α -τρισυποκατεστημένου αμινοαδαμαντανίου 16 και του α,α -δισυποκατεστημένου αμινοαδαμαντανίου 33 σε αναλογία 60:40. Επισημαίνονται οι κορυφές που χρησιμοποιήθηκαν για την σχετική ολοκλήρωση που περιγράφει προσεγγιστικά την αναλογία σχηματισμού 16 : 33.

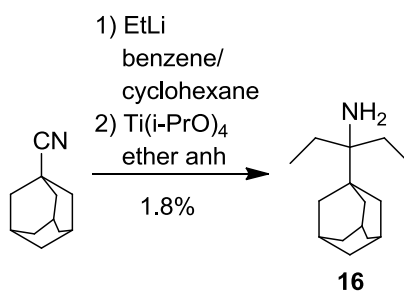
Στη συνέχεια δοκιμάστηκε αλλυλομαγνησιοβρωμίδιο, που η δομή του δεν επιτρέπει β απόσπαση υδριδίου με στόχο την παρασκευή του διάλλυλο αμινικού παραγώγου $\text{Ad}(\text{allyl})_2\text{CNH}_2$ (σχ. 8.20). Δοκιμάστηκε τριμοριακή και πενταμοριακή περίσσεια allylMgBr όμως δεν παρελήφθη η επιθυμητή αμίνη.



Σχήμα 8.20: Αντίδραση του 1-αδαμαντανοκαρβονιτριλίου με περίσσεια allylMgBr παρουσία $\text{Ti}(\text{OPr-}i)_4$ σε συνθήκες de Meijere.

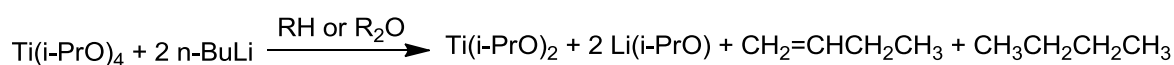
Επίσης, δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση μείγματος ούτε κάποιο ευδιάκριτο μείγμα α,α -τρισυποκατεστημένου και α,α -δισυποκατεστημένου αμινοαδαμαντανίου από τα φάσματα NMR. Πιθανώς το τετραϊσοπροπόξυ τιτάνιο σχηματίζει σύμπλοκα με τον αλλυλικό διπλό δεσμό αλλάζοντας τη δραστηριότητα των αντιδρώντων, οδηγώντας σε αδιευκρίνιστο μείγμα προϊόντων.

Σύμφωνα με την πορεία του σχ. 8.17, με την επίδραση του τετραΐσοπροπόξυ τιτανίου ως οξέος κατά Lewis, ο μινικός άνθρακας καθίσταται περισσότερο ηλεκτρονιόφιλος με αποτέλεσμα να προσβάλλεται ευκολότερα από το $R^{\delta-}-Mg^{\delta+}X$. Εφόσον ο σχηματισμός του μείγματος α,α,α-τρισυποκατεστημένης πρωτοταγούς αμίνης και α,α-δισυποκατεστημένης πρωτοταγούς αμίνης στην αντίδραση 1-AdCN με EtMgBr οφείλεται πιθανώς σε β απόσπαση υδριδίου από το οργανομαγνησιακό, στην αντίδραση του σχήματος 8.21 χρησιμοποιήθηκε μόνο οργανολιθιακό αντιδραστήριο που είναι σκληρό πυρηνόφιλο (hard nucleophile):



Σχήμα 8.21: Αντίδραση του 1-αδαμαντανοκαρβονιτριλίου με περίσσεια EtLi παρουσία Ti(OPr-i)₄ σε συνθήκες de Meijere.

Η εικονιζόμενη συνθετική πορεία ήταν επιτυχής και η AdEt₂CNH₂ **16** ελήφθη χωρίς παραπροϊόντα (μετά από απομόνωση μέσω υδροχλωρικού άλατος και καθαρισμό μέσω ανακρυστάλλωσης φουμαρικού άλατος), αλλά με μικρή απόδοση (1.8%), που είναι όμως συγκρίσιμη με τη συνολική απόδοση της πορείας 4 σταδίων μέσω αζιδίου (2%) (βλ. σχήμα 8.13). Η χαμηλή απόδοση μπορεί να δικαιολογηθεί εξαιτίας της δραστηκότητας που εμφανίζουν τα οργανολιθιακά αντιδραστήρια με το τετραΐσοπροπόξυτιτάνιο²³⁰, όπως φαίνεται στο παράδειγμα του σχήματος 8.22. Η δραστηκότητα αυτή έχει ως συνέπεια την κατανάλωση του EtLi στην αντίδραση του σχήματος 8.21 από το τετραΐσοπροπόξυτιτάνιο.



Σχήμα 8.22: Αντίδραση του τετραΐσοπροπόξυτιτανίου με n-BuLi

B) Συνθήκες Kulinkovich-Szymoniak

Επειδή με τις συνθήκες de Meijere δεν ελήφθη η αμίνη AdEt₂CNH₂ **16** σε ικανοποιητική απόδοση, επανεξετάστηκαν οι συνθήκες της αντίδρασης Kulinkovich-Szymoniak για τη σύνθεση πρωτοταγών tert-αλκυλαμινών R₃CNH₂. Υπενθυμίζεται ότι η συνθετική πορεία 4 σταδίων μέσω αζιδίου οδηγεί στην αμίνη **16** με συνολική απόδοση 2% (βλ. σχήμα 8.13).

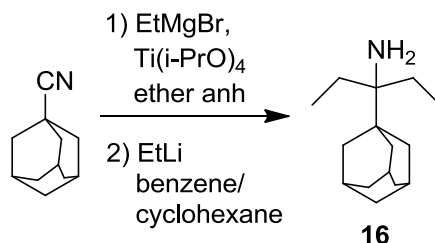
Στην κλασική αντίδραση Kulinkovich-Szymoniak, το τετραϊσοπροπόξυτιτάνιο σχηματίζει ένα αρχικά το δραστικό σύμπλοκο **b** αντιδρώντας με την οργανομαγνησιακή ένωση (σχ. 8.16). Το τιτάνιο σε αυτή την αντίδραση ανάγεται από κατάσταση οξειδωσης VI σε II. Στη συνέχεια, ακολουθεί μια αντίδραση 1,2-προσθήκης μεταξύ του δραστικού κυκλικού τιτανοκενίου **b** και νιτρίλιου με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός ενδιάμεσου κυκλικού ιμινικού τιτανοκενίου **c**. Αν το αντιδραστήριο Grignard βρίσκεται σε περίσσεια (π.χ. αν αρχικά προστέθηκαν στην αντίδραση 4 eq. αντιδραστήριου Grignard, βλ. σχ. 8.16), ένα ισοδύναμο αυτού πραγματοποιεί πυρηνόφιλη προσβολή στον ιμινικό άνθρακα του συμπλόκου, προς σχηματισμό της επιθυμητής αμίνης **d**. Από τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι, σε αντίθεση με τις συνθήκες de Meijere, στο κλασικό σχήμα Kulinkovich-Szymoniak η κύρια λειτουργία του τετραϊσοπροπόξυτιτανίου είναι ο σχηματισμός των κυκλικών συμπλόκων **b** και **c**. Προκειμένου να σχηματιστεί το πρώτο ενδιάμεσο **b**, θα πρέπει το τετραϊσοπροποξυτιτάνιο να αντιδράσει με το οργανομαγνησιακό αντιδραστήριο και όχι με το νιτρίλιο.

Δηλαδή στο πειραματικό πρωτόκολλο των συνθηκών de Meijere, αρχικά σχηματίζεται το οργανομαγνησιακό αντιδραστήριο, κατόπιν προστίθεται το νιτρίλιο και στη συνέχεια το τετραϊσοπροπόξυτιτάνιο. Το οργανομαγνησιακό μπορεί να έχει σχηματιστεί εξαρχής σε περίσσεια, ώστε να εξασφαλιστεί στο επόμενο στάδιο η προσθήκη ενός ακόμα ισοδυνάμου στο ιμινικό ενδιάμεσο **j**, που ευνοείται από την παρουσία του τετραϊσοπροπόξυτιτανίου (σχ. 8.17). Διαφορετικά, το οργανομαγνησιακό μπορεί να έχει σχηματιστεί αρχικά σε αναλογία 1:1 με το νιτρίλιο και το τετραϊσοπροπόξυτιτάνιο, και να προστεθεί στη συνέχεια περίσσεια οργανομαγνησιακού ή οργανολιθιακού για τη δεύτερη προσθήκη στο ιμινικό ενδιάμεσο **j** (σχ. 8.17). Στο πρωτόκολλο των συνθηκών Kulinkovich-Szymoniak προστίθεται αρχικά στη φιάλη αντίδρασης τετραϊσοπροπόξυτιτάνιο και στη συνέχεια το αντιδραστήριο Grignard (αντίστροφη προσθήκη) οπότε εξασφαλίζεται με αυτόν τον τρόπο ο σχηματισμός του τριμελούς τιτανοκενίου **b** (σχ. 8.16). Κατόπιν προστίθεται το νιτρίλιο οπότε σχηματίζεται το ιμινικό τιτανοκένιο **c** στο οποίο προστίθεται στη συνέχεια περίσσεια οργανομαγνησιακού ή οργανολιθιακού αντιδραστήριου που εξασφαλίζει την πυρηνόφιλη προσθήκη ενός ακόμα ισοδυνάμου στο ιμινικό τιτανοκένιο **c** (σχ. 8.16).

Για να συμπληρωθεί η περιγραφή του σχήματος 8.16, επισημαίνεται ότι στην αντίδραση Kulinkovich-Szymoniak προς παρασκευή κυκλοπροπυλαμινών, είναι απαραίτητη η προσθήκη οξέος κατά Lewis (π.χ. $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) το οποίο αντιδρά με το sp^2 άζωτο του κυκλικού ιμινικού τιτανοκενίου **e**, ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την κυκλοπροπυλίωση δηλαδή το σχηματισμό του **g** σε υψηλή απόδοση. Παρολαυτά αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ότι και χωρίς την παρουσία ισχυρότερου οξέος κατά Lewis, με μόνη την παρουσία των ήπιων οξέων Mg, Ti στο μείγμα της αντίδρασης, η

αντίστοιχη κυκλοπροπυλαμίνη παράγεται σε ποσοστό έως 30%^{223,224}. Αν το ιμινικό τιτανοκένιο αντιδράσει με νερό τότε από την αντίδραση παράγεται η κετόνη **h**.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, σχεδιάστηκε η συνθετική πορεία του σχήματος 8.23:



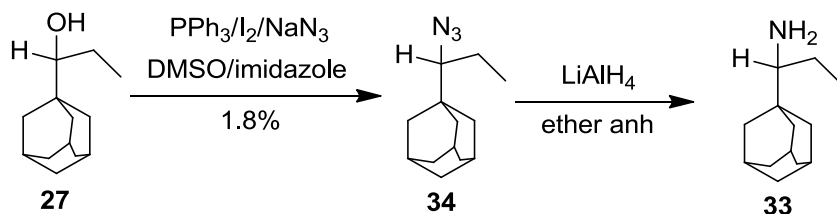
Σχήμα 8.23: : Αντίδραση του 1-αδαμαντανοκαρβονιτριλίου με EtMgBr και περίσσεια EtLi παρουσία Ti(OPr-i)₄ σε συνθήκες Kulinkovich-Szymoniak.

Στο δεύτερο στάδιο της αντίδρασης επιλέχθηκε η χρήση οργανολιθιακού αντί οργανομαγνησιακού, επειδή α) τα οργανολιθιακά είναι σκληρά πυρηνόφιλα (hard nucleophiles) συγκριτικά με τα μαλακά οργανομαγνησιακά αντισραστήρια, οπότε αποφεύγεται η β απόσπαση υδριδίου και β) για να διατηρηθεί σε χαμηλό επίπεδο η συγκέντρωση του όξινου Mg. Μάλιστα χρησιμοποιήθηκε τετραμοριακή περίσσεια ώστε, πέραν της απαιτούμενης περισσειας για το σχηματισμό του αμινοαδαμαντανίου **16**, να υπάρχει αρκετό οργανολιθιακό για να εξουδετερώσει τυχόν όξινο τετραίσοπροπόξυ τιτάριο που δεν συμπλοκοποιήθηκε, σύμφωνα με την αντίδραση που περιγράφηκε παραπάνω. Με αυτόν τον τρόπο ελαχιστοποιείται η πιθανότητα σχηματισμού κυκλοπροπυλαμίνης ως παραπροϊόντος.

Η εικονιζόμενη συνθετική πορεία ήταν επιτυχής και το αμινοαδαμαντάνιο **16** παρελήφθη μετά από καθαρισμό του μείγματος της αντίδρασης μέσω ανακρυστάλλωσης φουμαρικού άλατος, με απόδοση 10%.

8.2.4 Σύνθεση άλλων ενώσεων

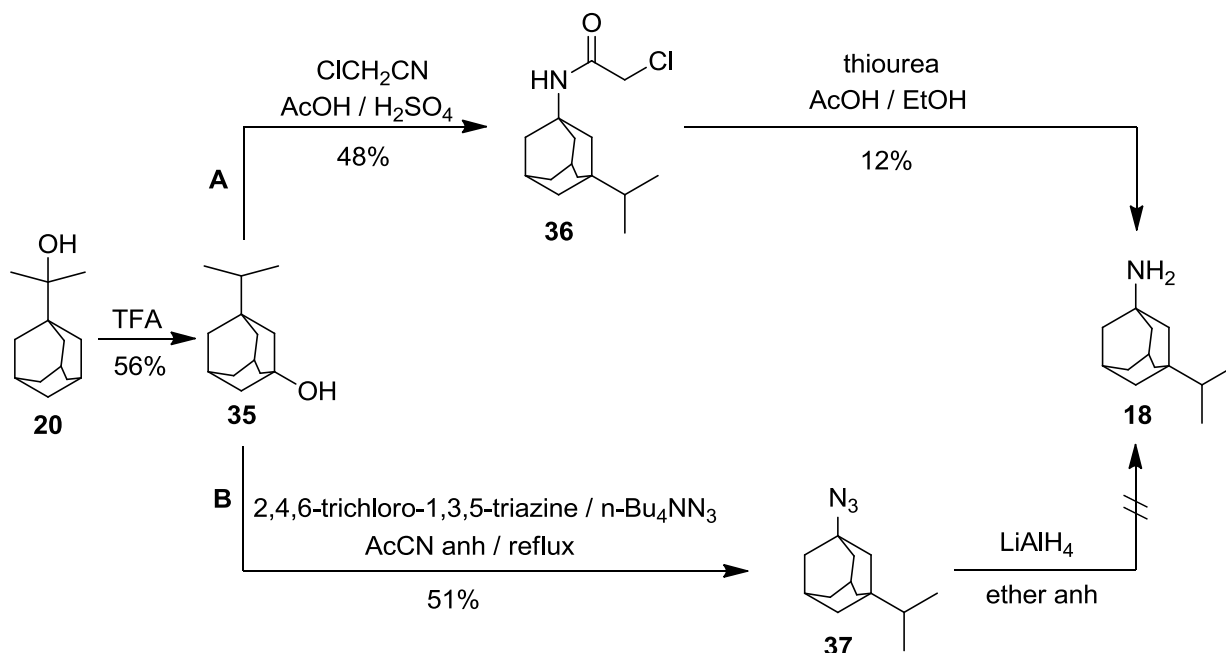
Με βάση την δευτεροταγή αλκοόλη **27** που απομονώθηκε μέσω κρυστάλλωσης, σχεδιάστηκε η συνθετική πορεία του σχήματος 8.24²³¹:



Σχήμα 8.24: Σχεδιασμός συνθετικής οδού για τη σύνθεση της ένωσης **33** μέσω αναγωγής του *sec*-αλκυλαζιδίου **34**.

Όμως η αντίδραση μετατροπής της αλκοόλης στο αζίδιο **34** κρίθηκε ασύμφορη, καθώς παρουσίασε πολύ μικρή απόδοση (1.8%).

Στην αλκοόλη **20** πραγματοποιήθηκε αντίδραση μετάθεσης²³², με προϊόν την αλκοόλη **35**. Η ισομερείωση πραγματοποιείται μέσω διαμοριακής μετάθεσης υδριδίου²³²⁻²³⁵. Για τη μετατροπή της αλκοόλης **35** στο αμινοαδαμαντάνιο **18**, προτάθηκαν οι συνθετικές οδοί του σχήματος 8.25.



Σχήμα 8.25: Σύνθεση της 3-ισοπροπυλ-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκαναμίνης **18**

από την 3-ισοπροπυλ-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανόλη **35**

Τελικά επιλέχθηκε η πορεία A²¹⁹, καθώς το φάσμα μάζας του τελικού προϊόντος της πορείας B²³⁶ δεν αντιστοιχεί στην αμίνη **18**.

9 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΑΤΟ: ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΩΝ ΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΜΕ ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

9.1 Γενικά

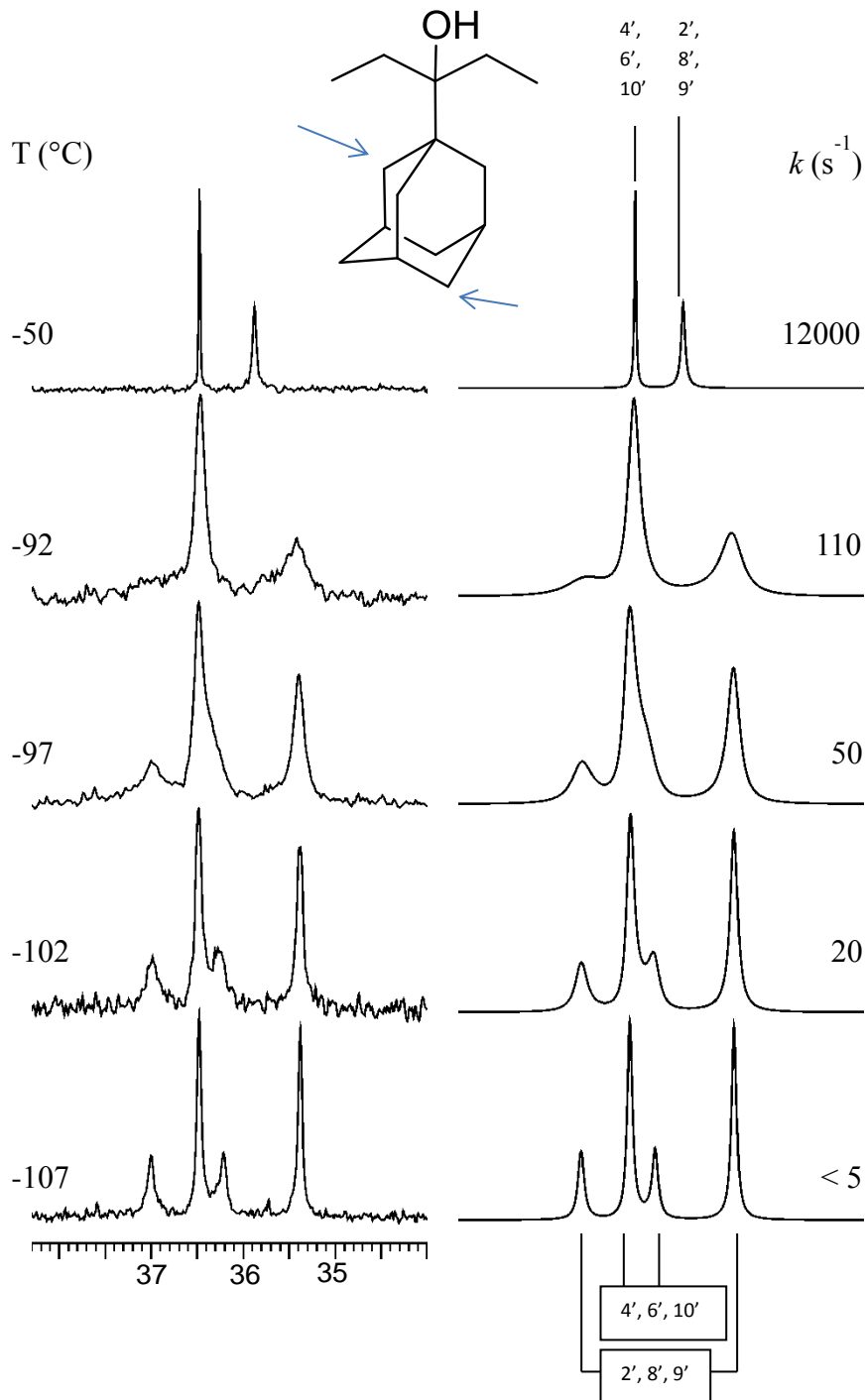
Κάποια από τα αδαμαντανικά παράγωγα που συντέθηκαν σε αυτή την εργασία εμφάνισαν ενδιαφέρουσες διαμορφωτικές ιδιότητες που αντανακλώνται στα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

Η 3-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-3-πεντανόλη **23** μελετήθηκε με Δυναμική Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Andrea Mazzanti στο Τμήμα Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου της Bologna. Οι ταχείες ανταλλαγές μπορούν να μελετηθούν καλύτερα με φασματοσκοπία ¹³C εξαιτίας της πενταπλάσιας γενικά τιμής του δν.

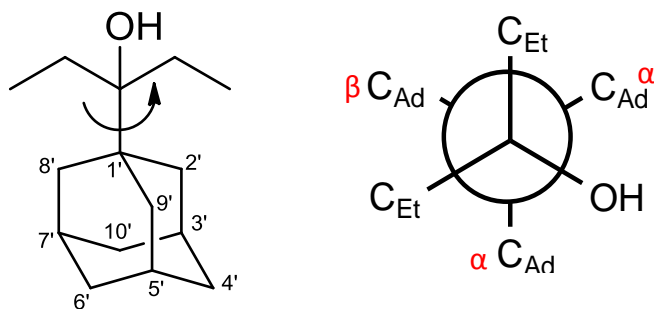
9.2 Μελέτη της 3-(1'-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκυλ)-3-πεντανόλης **23** με Δυναμική Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

9.2.1 Περιγραφή και σχολιασμός του φάσματος ¹³C DNMR

Ελαττώνοντας τη θερμοκρασία διαλύματος της αλκοόλης **23** σε CDCl₂ παρατηρείται μεταβολή των σημάτων των ανθράκων 2', 8', 9'-C και 4', 6', 10'-C. Στους -92 °C παρατηρείται διεύρυνση των σημάτων των ανθράκων αυτών που οδηγεί χαμηλώνοντας τη θερμοκρασία σε σχάση των σημάτων ώστε στους -107 °C κάθε αρχικό σήμα να έχει διαχωριστεί σε δύο κορυφές σε αναλογία 2:1 (σχ. 9.1). Το δυναμικό φαινόμενο οφείλεται στην επιβράδυνση της περιστροφής του απλού C-C δεσμού με ελάττωση της θερμοκρασίας με αποτέλεσμα στους -107 °C οι άνθρακες 2', 8', 9'-C γίνονται ανισότροποι διότι ένας άνθρακας της ομάδας των 2', 8', 9'-C έχει σε θέση gauche δύο άνθρακες αιθυλίου ενώ οι άλλοι δύο έχουν σε θέση gauche ένα άνθρακα αιθυλίου και την ομάδα υδροξυλίου (σχ. 9.2). Ανάλογα συμβαίνουν για την ομάδα των ανθράκων 4', 6', 10'-C όμως οι άνθρακες 2', 8', 9'-C βρίσκονται πιο κοντά στην περιστροφή του δεσμού ώστε το μαγνητικό τους περιβάλλον επηρεάζεται εντονότερα από το δυναμικό φαινόμενο της βραδείας περιστροφής ώστε ο διαχωρισμός των ανισότροπων κορυφών (δν) να είναι 1.7 ppm για το ζεύγος των κορυφών 2', 8', 9'-C αλλά μόνο 0.3 ppm για το ζεύγος των κορυφών 4', 6', 10'-C. Για τους άνθρακες 4', 6', 10'-C η θερμοκρασία σύμπτωσης είναι περίπου T_c = -100 °C (173 K) ενώ για τους άνθρακες 2', 8', 9'-C είναι περίπου T_c = -95 °C (178 K)



Σχήμα 9.1: Τμήμα φάσματος ^{13}C NMR διαφόρων θερμοκρασιών της αλκοόλης 23. Αριστερά φαίνεται το πειραματικό φάσμα και δεξιά οι σχετικές φασματικές γραμμές μετά από υπολογιστική προσομοίωση με στόχο τον ακριβή υπολογισμό της κινητικής σταθεράς. Καθώς μειώνεται η θερμοκρασία, παρατηρείται ότι πρώτα διαχωρίζεται η κορυφή των ανθράκων 2', 8', 9' καθώς αυτοί βρίσκονται πιο κοντά στον απλό δεσμό του οποίου επιβραδύνεται η περιστροφή. Στη συνέχεια, σε χαμηλότερη θερμοκρασία, διαχωρίζεται η φασματική κορυφή των ανθράκων 4', 6', 10'. Ο διαχωρισμός $\Delta\nu$ του σήματος των ανισότροπων ανθράκων είναι μεγαλύτερος του αντίστοιχου διαχωρισμού για το ζεύγος των ανισότροπων ανθράκων 4', 6', 10'.



Σχήμα 9.2: Διαμόρφωση για τη δίεδρη γωνία C2'-C1'-C(OH)-C(Et). Κατά την επιβράδυνση της περιστροφής του απλού δεσμού, οι άνθρακες 2', 8', 9' γίνονται ανισότροποι και χωρίζονται σε 2 ομάδες α, β

9.2.2 Υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας περιστροφής

Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα αυτά, εφαρμόζεται ο παρακάτω απλοποιημένος τύπος της εξίσωσης Eyring:

$$\Delta G^\ddagger(\text{cal/mol}) = 1.9872 T_C (23.76 + \ln T_C - \ln k_C)$$

$$k_{C_\alpha} = 2\pi p_\beta \delta\nu = k_C$$

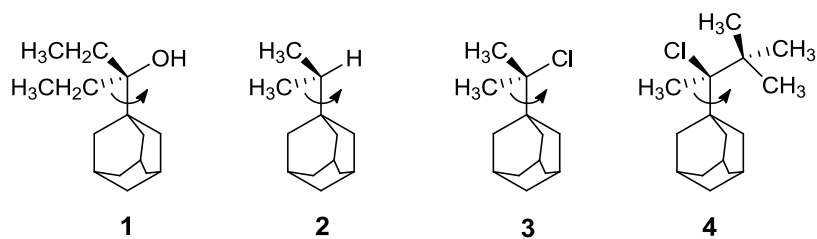
$$\delta\nu = 0.3 \text{ ppm} \times 150 \text{ Hz/ppm} = 45 \text{ Hz}$$

$$p_\beta = 0.33$$

$$k_C = 93.3 \text{ s}^{-1}$$

$$\text{Οπότε } \Delta G^\ddagger = 8.4 \text{ kcal/mol}$$

Η υπολογισθείσα από το λογισμικό υπολογιστικής προσομοίωσης (lineshape simulation) ελεύθερη ενέργεια περιστροφής είναι $\Delta G^\ddagger = 8.7 \pm 0.2 \text{ kcal/mol}$, τιμή που έρχεται σε συμφωνία με την παραπάνω που προκύπτει από τα πειραματικά δεδομένα.



Σχήμα 9.3: $\Delta G_1^\ddagger = 8.4 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_2^\ddagger = 6.1 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_3^\ddagger = 9.3 \text{ kcal/mol}$, $\Delta G_4^\ddagger = 10.6 \text{ kcal/mol}$

Η προηγούμενη τιμή για τον απλό δεσμό στην αδαμαντανική αλκοόλη **23** έρχεται σε συμφωνία με αυτές παρόμοιων ενώσεων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία (σχ. 9.3), όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 6.

10 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΚΑΤΟ: ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΑΜΙΝΟΑΔΑΜΑΝΤΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ INFLUENZA A (A/M2TM) ΜΕ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΙΚΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ

10.1 Γενικά

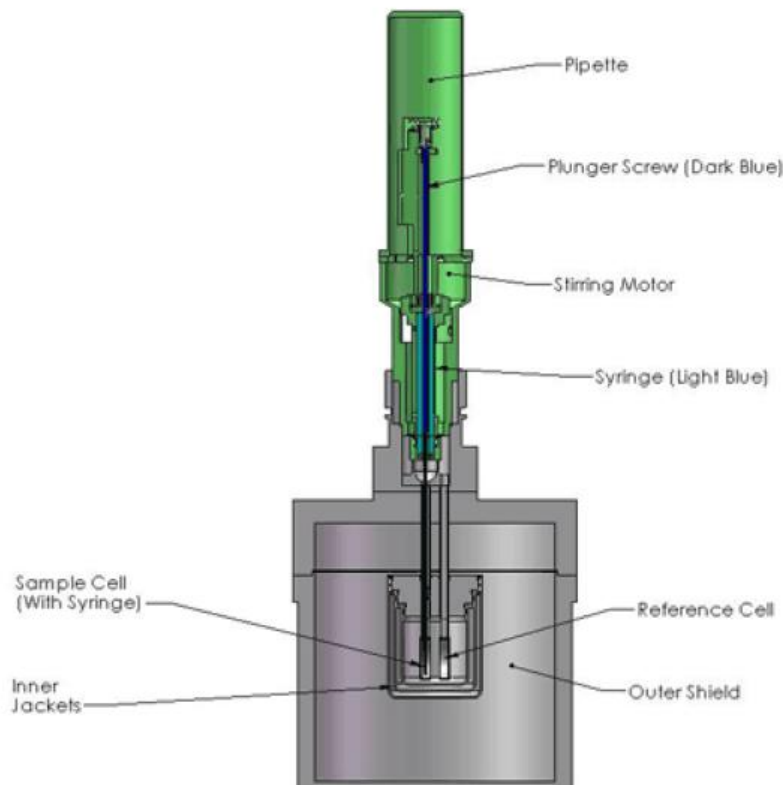
Η κατανόηση των χημικών αντιδράσεων και των ιδιοτήτων των χημικών ενώσεων έχει μεγάλη σημασία για την πρακτική εφαρμογή της θερμιδομετρίας. Για το λόγο αυτό έχουν σχεδιαστεί διάφορα θερμιδόμετρα, το καθένα για συγκεκριμένο σκοπό. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το μικροθερμιδόμετρο ισοθερμικής τιτλοδότησης, που χρησιμοποιεί σύγχρονα ηλεκτρονικά στοιχεία και πραγματοποιεί ανάλυση μέσω H/Y. Σχεδιάστηκε αρχικά να ποσοτικοποιεί αλληλεπιδράσεις ενζύμου – υποστρώματος, με συνέπεια να απαιτούνται μικρές ποσότητες χημικών ενώσεων εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας του οργάνου. Ακριβώς λόγω της υψηλής ευαισθησίας της μικροθερμιδομετρίας τιτλοδότησης, το εύρος των φυσικοχημικών εφαρμογών μεγάλωσε.

Τα πειράματα Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) διεξήχθησαν στο «Ινστιτούτο Φυσικοχημείας και Θεωρητικής Χημείας» του Πανεπιστημίου του Tübingen στη Γερμανία από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Günter Gauglitz.

10.2 Περιγραφή του θερμιδόμετρου

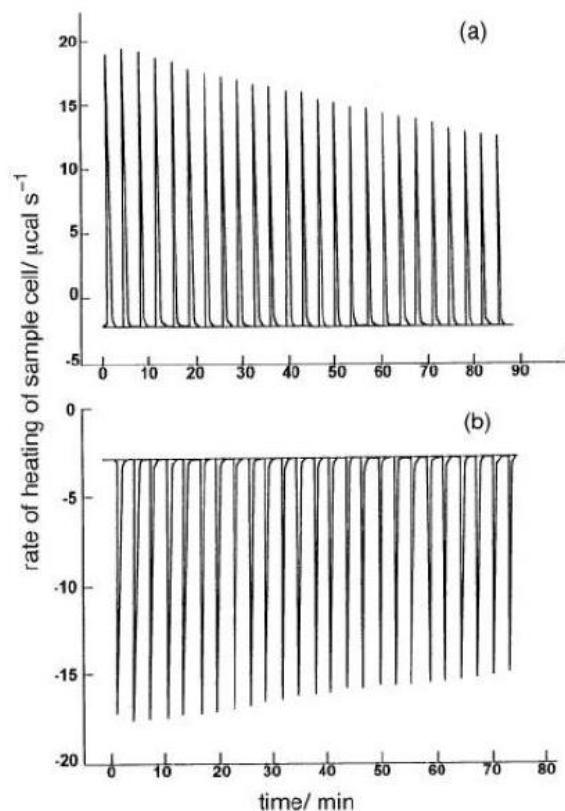
Η ακόλουθη περιγραφή αποτελεί λεπτομερέστερη παρουσίαση του θερμιδόμετρου συγκριτικά με εκείνη που παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο 3.

Το θερμιδόμετρο αποτελείται από ένα ζεύγος κελιών, δείγματος και αναφοράς, γνωστού όγκου που περιβάλλονται από αδιαβατικό τοίχωμα. Μια μικροσύριγγα – αναδευτήρας, η οποία ελέγχεται από H/Y, εισάγει στο κελί του δείγματος το διάλυμα της πρωτεΐνης, συγκέντρωσης $[R]_{\text{tot}}$ (R : receptor, υποδοχέας), και στη συνέχεια μικρούς όγκους διαλύματος του τιτλοδότη-προσδέτη L (L : ligand, προσδέτης) συγκέντρωσης $[L]$, ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα για την τιτλοδότηση. Εκεί λαμβάνει χώρα και η σύνδεση μεταξύ των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων και της πρωτεΐνης M2TM (σχήμα 10.1) με αποτέλεσμα το θερμιδόμετρο να μετρά τη θερμότητα q που εκλύεται ή απορροφάται.



Σχήμα 10.1: Τομή θερμιδόμετρου ITC στο οποίο διακρίνονται τα κελιά αναφοράς και δείγματος, το σύστημα ένεσης και ανάδευσης καθώς και τα εσωτερικά και εξωτερικά του τοιχώματα.

Το κελί αναφοράς, από την άλλη, περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα που είναι το ίδιο με εκείνο του κελιού του δείγματος (δηλαδή έχει ίδιο pH, ίδια σύσταση, συγκέντρωση κλπ), εκτός της ουσίας που αντιδρά. Το κελί αναφοράς θερμαίνεται με πολύ αργό ρυθμό χρησιμοποιώντας μικρό συνεχές ρεύμα. Το σύστημα ελέγχου παρακολουθεί τις θερμοκρασίες και των δύο κελιών και ρυθμίζει την ηλεκτρική ισχύ των θερμαντήρων των κελιών ώστε να διατηρούνται στην ίδια θερμοκρασία. Στην περίπτωση που η ένεση του διαλύματος προκαλέσει εξώθερμη αντίδραση, το σύστημα ελέγχου σταματά τη θέρμανση του κελιού του δείγματος μέχρι η θερμοκρασία του κελιού αναφοράς να τη φτάσει. Η **μετρούμενη ποσότητα** είναι ο **ρυθμός θέρμανσης του κελιού του δείγματος** για τη χρονική περίοδο που απαιτείται για να έρθουν τα κελιά αναφοράς και δείγματος στην ίδια θερμοκρασία (σχήματα 10.2, 3.3 § 3.3). Το σήμα από το σύστημα ελέγχου υφίσταται αριθμητική ολοκλήρωση για να προκύψει η θερμότητα q που σχετίζεται με την τιτλοδοτούμενη ποσότητα από τη σύριγγα (σχήμα 3.4, § 3.5). Στο σημείο αυτό σημειώνεται ότι οι θερμοότητες αυτές είναι της τάξης των mcal και οι θερμοκρασίες των κελιών μεταβάλλονται κατά μερικά mK. Το θερμιδόμετρο λειτουργεί σε **ισοβαρείς** και **ισοθερμικές** συνθήκες περιβάλλοντος (NPT).



Σχήμα 10.2⁶⁴: Διαγράμματα θερμοδομετρικής τιτλοδότησης για (α) μια ενδόθερμη και (β) για μια εξώθερμη αντίδραση.

10.3 Προετοιμασία πειράματος

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε $\text{pH} = 8$, όπου το πεπτιδίο μπορεί να βρεθεί σε μορφή τετραμερούς³⁵, σε ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 50 mM και 100 mM NaCl και οι μετρήσεις έγιναν με το θερμοδόμετρο TAM 2277 στους 20 °C (293,15 K). Το συνθετικό διαμεμβρανικό τμήμα M2TM (22 – 46) εισήχθη σε μικκύλια n-δωδεκυλφωσφοχολίνης (n-dodecylphosphocholine – DPC) σε αναλογία 1:40 μονομερούς/λιπιδίου σε $\text{pH} 8$, διότι όπως έχει αναφερθεί η αναλογία αυτή εξασφαλίζει το M2TM να βρεθεί αποκλειστικά σχεδόν σε τετραμερή μορφή. Πολύ μικρότερη αναλογία του M2TM οδηγεί σε μείγμα μονομερών, διμερών και τετραμερών μορφών (π.χ. M2TM:λιπιδίου <1:200). Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν διαλύματα 175 – 250 nmol πεπτιδίου με 40-φορές μοριακή περίσσεια DPC στο προαναφερθέν ρυθμιστικό διάλυμα με τη βοήθεια υπερήχων. Τα διαλύματα των προσδετών (8 – 15) μL τιτλοδοτήθηκαν στη θερμοδομετρική κυψελίδα στους 20 °C. Η θερμότητα από την πρώτη ένεση δε χρησιμοποιήθηκε στα αποτελέσματα διότι αναφέρεται στη διάλυση του προσδέτη ή σε αραίωση και όχι σε φαινόμενα σύνδεσης. Με ολοκλήρωση του διαφορικού σήματος ως προς το χρόνο προκύπτει η θερμότητα σύνδεσης και λαμβάνονται τα γραφήματα θερμότητας σύνδεσης (βλ. Παράρτημα). Η θερμότητα που σχετίζεται με τη σύνδεση των

προσδετών στην M2TM λήφθηκε αφαιρώντας την θερμότητα εξέλιξης από τη θερμότητα αντίδρασης, (βλ. εξίσωση 3.10 §3.4).^{65,237} Πειράματα ελέγχου πραγματοποιήθηκαν σε pH = 3 και δεν έδειξαν καμία αλληλεπίδραση αφού δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός τετραμερούς σε όξινο pH λόγω πρωτονίωσης των ιμιδαζολίων των ιστιδινών-37.³⁵ Οπότε ότι μετράται στα πειράματα σε pH 8 οφείλεται σε σύνδεση αμινοαδαμαντανικού προσδέτη-M2TM.

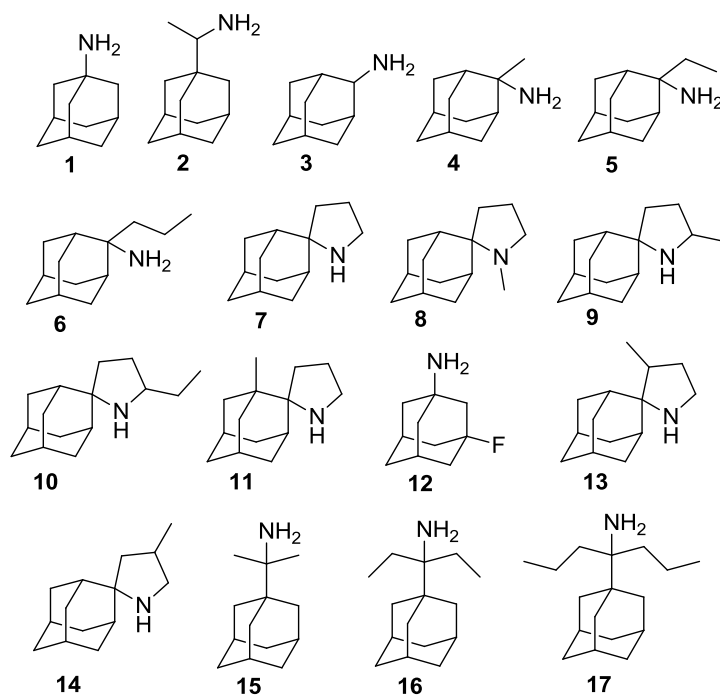
10.4 Αποτελέσματα μετρήσεων της σύνδεσης των νέων αμινοαδαμαντανικών προσδετών 15-17 στην A/M2TM σε pH 8 με ITC - Συσχέτιση μεταξύ υπολογιστικών (FEP/MD) και πειραματικών (ITC) τιμών $\Delta\Delta G_{bind}$

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η σύνδεση των αμινοαδαμαντανικών προσδετών **15 – 17** (σχήμα 10.3) με το τετραμερές WT (Udorn) A/M2TM της διαμεμβρανικής περιοχής της πρωτεΐνης influenza A που σχηματίζεται από τα πεπτίδια 25-αμινοξέων M2TM σε λιπιδικό περιβάλλον (DPC) σε pH 8. Για τη μελέτη της σύνδεσης προσδέτη-υποδοχέα εφαρμόστηκε θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης, τα αποτελέσματα της οποίας παρατίθενται στον πίνακα 10.1.

Πίνακας 10.1: Θερμοδυναμικά δεδομένα σύνδεσης των νέων προσδετών 15-17 με τα τετραμερή influenza A/M2TM.

Ligand	Temperature		K_a	K_d	ΔG°	ΔH°	ΔS°	$-T\Delta S$
	°C	K	M^{-1}	μM	kJ/mol	kJ/mol	J/mol·K	kJ/mol
15	20	293.15	814.575 ± 348.600	1.23 ± 0.53	-33.17 ± 1.04	-20.58 ± 1.38	42.97 ± 5.90	-12.60 ± 1.73
16	20	293.15	217.568 ± 104.537	4.59 ± 2.21	-29.95 ± 1.17	-13.48 ± 2.58	56.20 ± 9.66	-16.47 ± 2.83
17	20	293.15	291.700 ± 89.440	3.43 ± 1.05	-30.67 ± 0.75	-25.47 ± 1.87	17.74 ± 6.86	-5.20 ± 2.01

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας⁵³ πραγματοποιήθηκαν ανάλογοι υπολογισμοί ITC σε ένα σύνολο ενώσεων (**1-14**), οι συνθέσεις των οποίων έχουν δημοσιευτεί στο παρελθόν¹⁹⁸⁻²⁰³. Οι τιμές των θερμοδυναμικών χαρακτηριστικών τους (ΔG , ΔS , K_d , $-T\Delta S$, ΔH), που υπολογίστηκαν από τις παραπάνω μετρήσεις ITC, χρησιμοποιούνται και στην παρούσα εργασία (Πίνακες 10.2, 10.3).

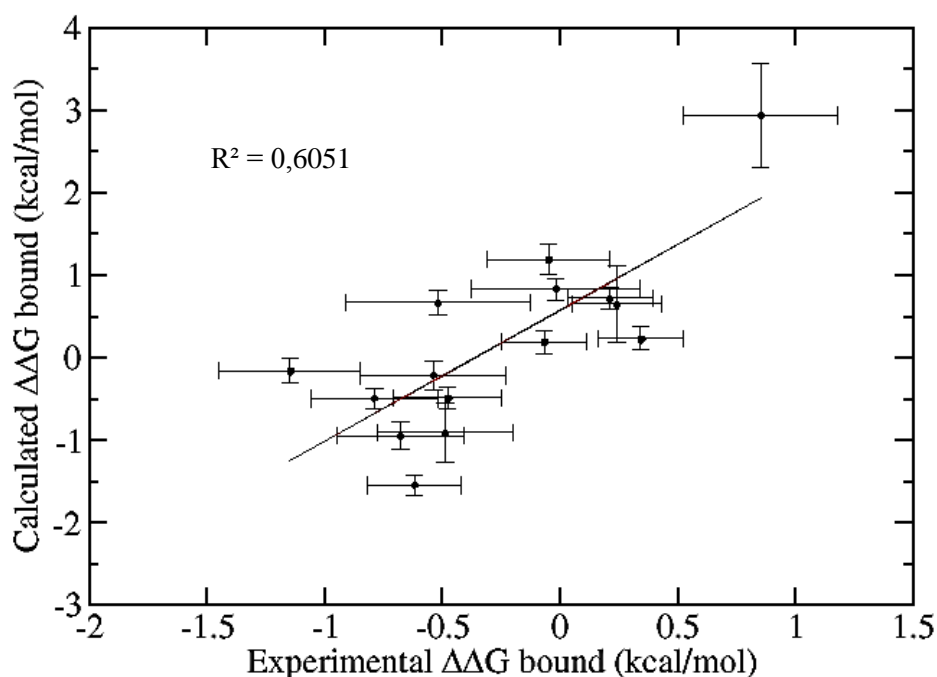


Σχήμα 10.3: Αμινοαδαμαντανικοί προσδέτες 1-17 που μελετήθηκε η σύνδεση τους με το τετραμερές wt influenza A/M2TM με θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης και υπολογισμούς FEP/MD.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 10.2, οι πειραματικές τιμές $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ για τους αλχημικούς μετασχηματισμούς $17 \rightarrow 16$, $16 \rightarrow 15$, $15 \rightarrow 2$ είναι γενικά σε συμφωνία με τις αντίστοιχες υπολογιστικές τιμές, επικυρώνοντας έτσι την υπολογιστική πρόβλεψη με FEP/MD. Αν και για το μετασχηματισμό $15 \rightarrow 2$ η πειραματική $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ υπαγορεύει ότι ο προσδέτης **15** θα έχει μικρότερη συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα σε σχέση με τη ριμανταδίνη **2** (σε αντίθεση δηλαδή με την υπολογιστική πρόβλεψη), εντούτοις οι υπολογιστικές τιμές $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ και για τους τρεις αλχημικούς μετασχηματισμούς ($17 \rightarrow 16$, $16 \rightarrow 15$, $15 \rightarrow 2$) βρίσκονται εντός του ορίου του 1 kcal/mol σε σχέση με τις πειραματικές τιμές $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ (λαμβάνοντας υπόψιν και το εύρος σφάλματος των μεθόδων). Σε αυτό οφείλεται και η καλή συσχέτιση και ο δείκτης πρόβλεψης του μοντέλου, όπως θα αναλυθεί αμέσως παρακάτω.

Πίνακας 10.2: Υπολογιστικές (FEP/MD) και πειραματικές τιμές (ITC) της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης μεταξύ προσδετών για το σύνολο των αλχημικών μετασχηματισμών της παρούσης εργασίας

Mutation	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ FEP/MD (kcal/mol)	$\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ ITC (kcal/mol)
5→4	0.73 ± 0.13	0.21 ± 0.18
13→7	-0.48 ± 0.13	-0.48 ± 0.23
12→1	-1.54 ± 0.12	-0.62 ± 0.20
14→7	-0.49 ± 0.12	-0.79 ± 0.27
8→7	-0.90 ± 0.36	-0.49 ± 0.29
6→5	0.20 ± 0.14	-0.07 ± 0.18
4→3	0.24 ± 0.14	0.34 ± 0.18
2→1	2.94 ± 0.63	0.85 ± 0.33
11→7	-0.94 ± 0.17	-0.68 ± 0.27
10→9	0.84 ± 0.13	-0.02 ± 0.36
9→7	-0.15 ± 0.15	-1.15 ± 0.30
3→1	0.66 ± 0.46	0.24 ± 0.19
17→16	1.20 ± 0.19	0.17 ± 0.33
16→15	-0.21 ± 0.18	-0.77 ± 0.38
15→2	0.68 ± 0.15	-0.52 ± 0.39



Σχήμα 10.4: Συσχέτιση μεταξύ υπολογιστικών και πειραματικών τιμών $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$. Ελήφθησαν υπόψη τα αποτελέσματα όλων των αλχημικών μετασχηματισμών που αναφέρονται στον Πίνακα 10.2

Η συσχέτιση μεταξύ υπολογισμένων τιμών και τις πειραματικών διαφορών ελεύθερης ενέργειας για το σύνολο των 15 αλχημικών μετασχηματισμών (Πίνακας 10.2) είναι $R^2 = 0.61$ (σχ. 10.4), ενώ ο δείκτης πρόβλεψης είναι $PI = 0.83$.

Το αποτέλεσμα συσχέτισης είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικά και υποσχόμενο διότι το εύρος των πειραματικών ελευθέρων ενεργειών σύνδεσης είναι μόνο 2 kcal mol^{-1} , τιμή που είναι κοντινή στο όριο ακρίβειας (1 kcal mol^{-1}) των υπολογισμών ελεύθερης ενέργειας FEP^{128,130,238}. Επίσης αν ληφθεί υπόψη το σφάλμα των πειραματικών τιμών $< 0.37 \text{ kcal mol}^{-1}$ και τα στατιστικά σφάλματα των υπολογιστικών τιμών $0.10 - 0.66 \text{ kcal mol}^{-1}$, ο συντελεστής συσχέτισης είναι ο μέγιστος δυνατός που αναμένεται σε αυτή την περίπτωση²³⁹.

Τα αποτελέσματα είναι εξαιρετικά συγκριτικά με άλλες μελέτες όπου η περιοχή σύνδεσης του υποδοχέα είναι πολύ πιο εντοπισμένη και καλά ορισμένη αν ληφθεί υπόψη η ευρύτητα της περιοχής σύνδεσης των προσδετών όπου ολόκληρος ο πρωτεϊνικός διάυλος είναι γεμάτος μόρια νερού που αυξάνουν σημαντικά τους βαθμούς ελευθερίας του συστήματος.

Ας σημειωθεί ότι συνήθως μεταξύ των outliers είναι αληθικοί μετασχηματισμοί που περιλαμβάνουν αλλαγές υποκαταστατών στον δακτύλιο της πυρρολιδίνης. Αντίθετα μετασχηματισμοί που περιλαμβάνουν τις γραμμικές αλυσίδες αλκυλίων δεν έχουν μεγάλες αποκλίσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη παραμέτρων του πεδίου δυνάμεων OPLS ειδικά για τον δακτύλιο της πυρρολιδίνης.

Αποδεικνύεται επίσης ότι το M2TM_{U_{dom}} DMPC μοντέλο προβλέπει με καλύτερη απόδοση συγκριτικά με το μοντέλο M2TM_{U_{dom}} DPPC. Αυτό αντανακλά το γεγονός ότι οι ακυλοαλυσίδες των λιπιδίων DMPC είναι βραχύτερες κατά δύο CH₂ συγκριτικά με τις ακυλοαλυσίδες των λιπιδίων DPPC -δηλαδή τα λιπίδια DMPC ομοιάζουν περισσότερο με τα λιπίδια DPC που χρησιμοποιούνται στο πείραμα. Αυτό δείχνει ότι είναι σημαντική η χρήση μοντέλων για υπολογισμού ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης που αναπαράγουν όσο το δυνατόν τις πειραματικές συνθήκες.

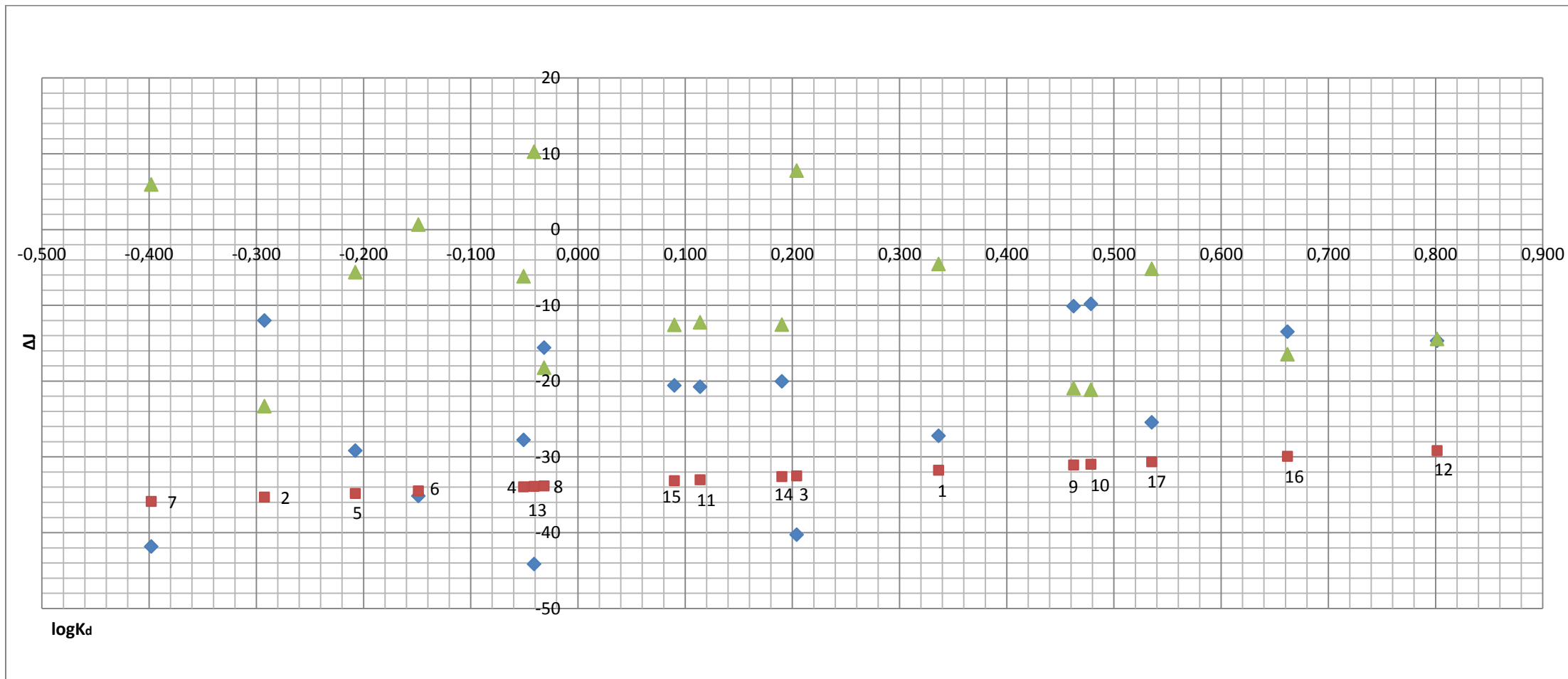
10.5 Αξιολόγηση του θερμοδυναμικού προφίλ των προσδετών 1-17

Αξιοποιώντας περαιτέρω τα αποτελέσματα των προηγούμενων μετρήσεων, σε συνδυασμό με τις νέες μετρήσεις, σχεδιάστηκαν οι παρακάτω πίνακες/σχήματα προς αξιολόγηση του θερμοδυναμικού προφίλ των ενώσεων.

Στον Πίνακα 10.3 παρατίθενται οι πειραματικές τιμές, όπως ελήφθησαν με τη μέθοδο ITC, των σταθερών διάστασης (K_d), ελεύθερων ενεργειών σύνδεσης (ΔG°) διαφοράς ενθαλπίας (ΔH°) και εντροπικής συνεισφοράς ($-T \cdot \Delta S^\circ$) της αλληλεπίδρασης (α) ενώσεων που έχουν μετρηθεί στο πρόσφατο παρελθόν⁵³ και (β) των νέων προσδετών **15-17** με τα τετραμερή WT A/M2TM.

Πίνακας 10.3: Θερμοδυναμικά δεδομένα σύνδεσης των προσδετών 1-17 με τα τετραμερή influenza A/M2TM.

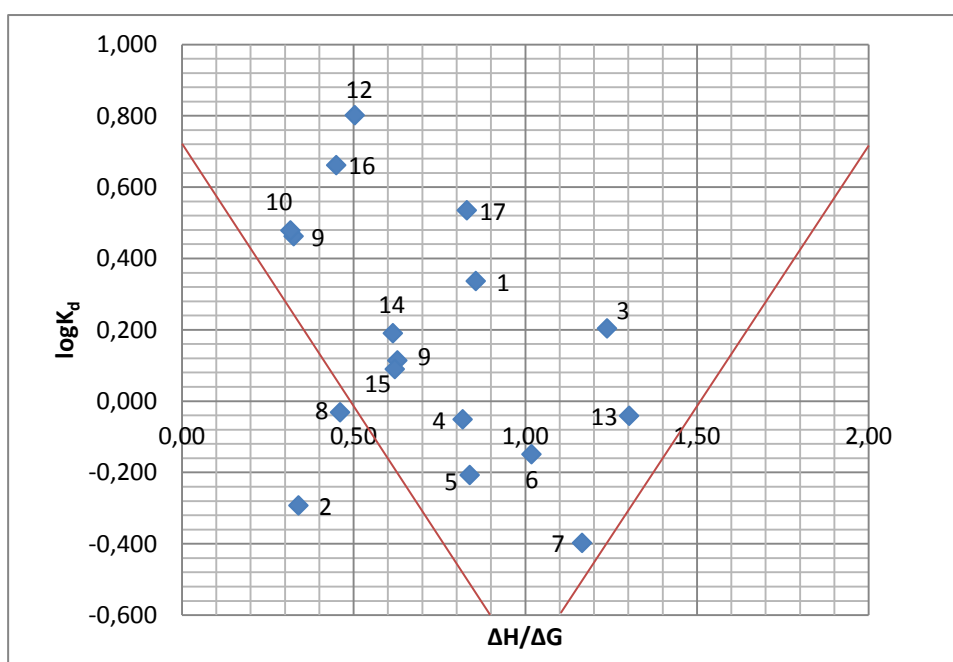
Ligand	K_d (μM)	$\log K_d$	ΔH° (kJ/mol)	ΔG° (kJ/mol)	$\Delta H/\Delta G$	$-T\Delta S$ (kJ/mol)
1	2.17 ± 0.52	0.336	-27.23 ± 2.05	-31.78 ± 0.59	0.86	-4.56 ± 2.13
2	0.51 ± 0.26	-0.292	-12.01 ± 0.71	-35.33 ± 1.24	0.34	-23.32 ± 1.43
3	1.60 ± 0.34	0.204	-40.27 ± 1.73	-32.52 ± 0.52	1.24	7.75 ± 1.80
4	0.89 ± 0.19	-0.051	-27.78 ± 1.08	-33.96 ± 0.53	0.82	-6.18 ± 1.20
5	0.62 ± 0.14	-0.208	-29.20 ± 0.87	-34.83 ± 0.54	0.84	-5.64 ± 1.02
6	0.71 ± 0.15	-0.149	-35.17 ± 1.13	-34.52 ± 0.50	1.02	0.65 ± 1.23
7	0.40 ± 0.13	-0.398	-41.84 ± 1.60	-35.90 ± 0.78	1.17	5.94 ± 1.77
8	0.93 ± 0.36	-0.032	-15.60 ± 1.15	-33.85 ± 0.95	0.46	-18.25 ± 1.49
9	2.90 ± 1.16	0.462	-10.14 ± 1.14	-31.08 ± 0.97	0.33	-20.94 ± 1.50
10	3.01 ± 1.42	0.479	-9.82 ± 1.49	-30.98 ± 1.14	0.32	-21.16 ± 1.88
11	1.30 ± 0.43	0.114	-20.76 ± 1.28	-33.04 ± 0.81	0.63	-12.27 ± 1.51
12	6.33 ± 1.53	0.801	-14.71 ± 1.25	-29.18 ± 0.59	0.50	-14.46 ± 1.38
13	0.91 ± 0.21	-0.041	-44.17 ± 2.01	-33.90 ± 0.57	1.30	10.27 ± 2.09
14	1.55 ± 0.52	0.190	-20.04 ± 1.51	-32.61 ± 0.82	0.61	-12.57 ± 1.72
15	1.23 ± 0.53	0.090	-20.58 ± 1.38	-33.17 ± 1.04	0.62	-12.60 ± 1.73
16	4.59 ± 2.21	0.662	-13.48 ± 2.58	-29.95 ± 1.17	0.45	-16.47 ± 2.83
17	3.43 ± 1.05	0.535	-25.47 ± 1.87	-30.67 ± 0.75	0.83	-5.20 ± 2.01



Σχήμα 10.5: Γράφημα θερμοδυναμικών ποσοτήτων που αφορούν τη σύνδεση προσδέτη-υποδοχέα ως συνάρτηση του $\log K_d$ για τις ενώσεις 1-17. Στο κατακόρυφο άξονα καταγράφονται οι τιμές των ΔH (μπλέ σημεία), ΔG (κόκκινα σημεία) και $-T\Delta S$ (πράσινα σημεία) και στον οριζόντιο άξονα οι τιμές $\log K_d$

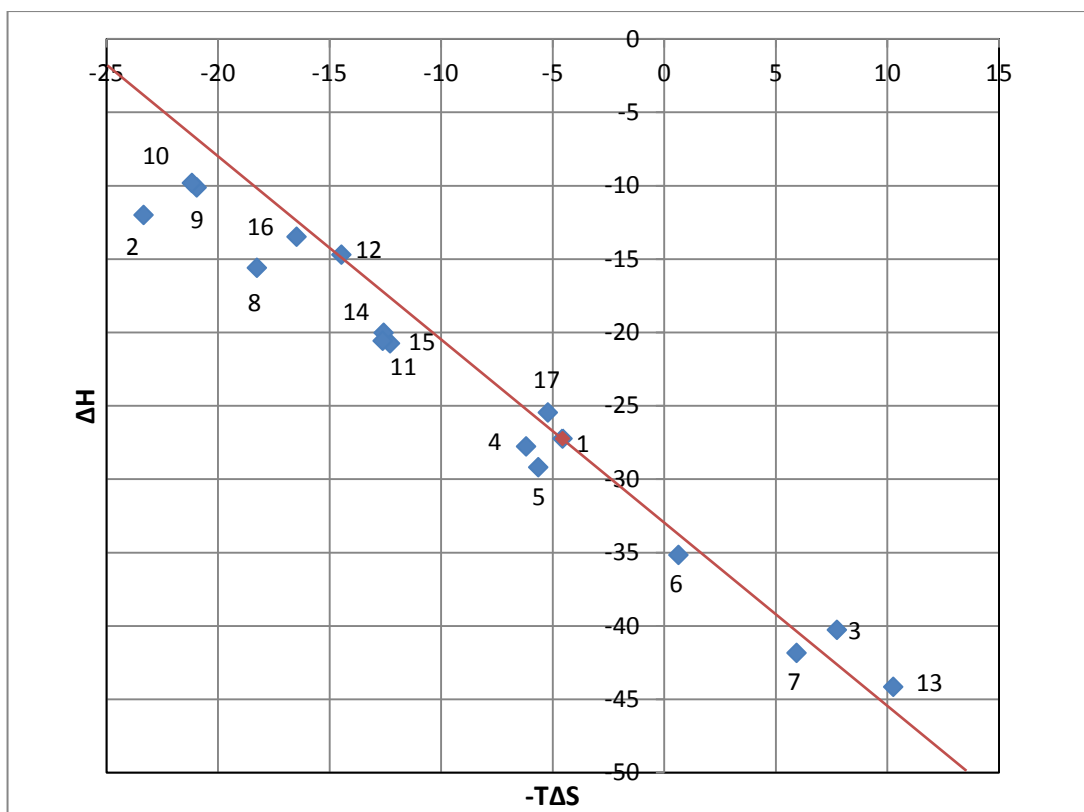
Όπως φαίνεται από τον πίνακα 10.3, η πλειοψηφία των υπό μελέτη προσδετών εμφανίζει μικρότερη σταθερά διάστασης K_d από την αμανταδίνη, άρα ισχυρότερη πρόσδεση για τον υποδοχέα, ενώ για επτά από τους δεκαεπτά προσδέτες (ενώσεις **2, 4, 5, 6, 7, 8, 13**) για τη σταθερά K_d ισχύει $K_d < 1 \mu\text{M}$. Οι προσδέτες που εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερά διάστασης από την αμανταδίνη (ασθενέστεροι προσδέτες) είναι οι ενώσεις **9, 10, 12, 16, 17**.

Όπως παρατηρείται στο σχήμα 10.5, για όλους τους προσδέτες ισχύουν $\Delta H < 0$ και $\Delta G < 0$, ενώ για την πλειοψηφία των προσδετών ισχύει $-T\Delta S > |\Delta H|$ (κατ' απόλυτη τιμή). Παρολαυτά, μόνο οι προσδέτες **3, 6, 7, 13** παρουσιάζουν $-T\Delta S > 0 \Rightarrow \Delta S < 0$. Οι προσδέτες στους οποίους παρατηρείται $\Delta H > -T\Delta S$ είναι οι **2, 8, 9, 10** και **16**, ενώ $\Delta H < \Delta G \Leftrightarrow |\Delta H| > |\Delta G|$, παρατηρείται για τους προσδέτες **3, 6, 7, 13**. Από τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύεται η μεγάλη διαφοροποίηση που προκαλεί η υποκατάσταση διαφορετικών θέσεων του πυρρολιδινικού δακτυλίου στα σπειροπυρρολιδινικά αμινοαδαμαντάνια.



Σχήμα 10.6: Ενθαλπική Χοάνη

Σύμφωνα με το «φιλτράρισμα» της Ενθαλπικής Χοάνης (σχ. 10.6), ο προσδέτης με τη βέλτιστη ενθαλπική συνεισφορά σύνδεσης είναι ο **7**, ενώ ακολουθούν οι **5, 6, 4** και **13**.



Σχήμα 10.7: Θερμοδυναμικό Διάγραμμα Βελτιστοποίησης

Στο Θερμοδυναμικό Διάγραμμα Βελτιστοποίησης (σχ. 10.7) παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των μελετώμενων ενώσεων εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια (αρνητικότερη ΔG σύνδεσης) για τον υποδοχέα από την αμανταδίνη, καθώς εμφανίζονται κάτω από τη γραμμή βελτιστοποίησης. Μόνο οι ενώσεις **3**, **13** και **17** έχουν μεγαλύτερη ΔG σύνδεσης από την αμανταδίνη, ενώ η ένωση **12** εμφανίζει παρόμοια συγγένεια σύνδεσης με την αμανταδίνη.

Συμπερασματικά, σε γενικές γραμμές, η υποκατάσταση επί του αδαμαντανικού δακτυλίου προς ενώσεις ογκωδέστερες της αμανταδίνης, φαίνεται να ευνοεί τη συγγένεια σύνδεσης με τον υποδοχέα.

11 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΕΝΔΕΚΑΤΟ: ΑΝΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

11.1 Γενικά

Για τον έλεγχο της αντικής δράσης in-vitro των νέων αμινοαδαμαντανικών παραγώγων πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της ανασταλτικής συγκέντρωσης των ενώσεων in-vitro έναντι διαφόρων στελεχών ιών influenza A. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν από τις ερευνητικές ομάδες των καθηγητών David Busath και Brent Johnson στο Πανεπιστήμιο Brigham Young των ΗΠΑ και από την ερευνητική ομάδα της Δρος Michaela Schmidtke στο Πανεπιστήμιο της Ιένας στη Γερμανία.

11.2 Αποτελέσματα αντικού ελέγχου έναντι του ιού Influenza A - Προσδιορισμός τιμών EC₅₀ και κυτταροτοξικότητας σε κύτταρα MDCK των νέων αμινοαδαμαντανικών παραγώγων 15-17

Εκτιμήθηκε η αναστολή που προκαλούν οι ενώσεις **15-17** έναντι των στελεχών S31N H1N1 *A/California/04/2009*, H1N1 *A/PR/8/34* και έναντι ιών WT H2N2 *A2/Taiwan/1/64*, H3N2 *A/Victoria/3/75*. Οι τιμές EC₅₀'s για τα παραπάνω δίνονται στον πίνακα 11.1 Στον πίνακα 11.2 δίνονται οι τιμές EC₅₀'s των ενώσεων για το S31N στέλεχος H1N1 *A/WSN/33*, καθώς επίσης και για το στέλεχος που προκύπτει από την αντίστροφη μετάλλαξη (N31S) του H1N1 *A/WSN/33*. Στους δύο πίνακες περιλαμβάνονται και οι τιμές EC₅₀ της αμανταδίνης (στον πίνακα 11.2 και της ριμανταδίνης) που είναι γνωστό ότι είναι ανενεργή έναντι των μεταλλαγμένων ιών.

Οι ιοί με μετάλλαξη S31N είναι πλέον αυτοί που κυριαρχούν παγκοσμίως και αποτελούν την αποκλειστική αιτία επιδημιών και πανδημιών γρίπης. Επίσης ο ιός *Calif/07/2009* είναι ο κύριος επιδημικός ιός στην Αμερική. Σε προηγούμενη εργασία^{240,241} του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι ενώ είναι σημαντικό να βρεθούν δραστικά αμινοαδαμαντανικά παράγωγα -μετά τη απενεργοποίηση αμανταδίνης και ριμανταδίνης έναντι των ιών S31N- εντούτοις αυτά δεν δρουν με αποκλεισμό του πόρου M2 στους μεταλλαγμένους ιούς, αλλά πιθανώς με άλλο τρόπο.

Επισημαίνεται ότι τα στελέχη S31N *A/WSN/33* και N31S *A/WSN/33* χρησιμοποιούνται πλέον για τη διάκριση της δραστηρότητας των αμινοαδαμαντανικών παραγώγων ως προς την αναστολή του διαύλου M2 έναντι του ιού S31N influenza και WT influenza.

Πίνακας 11.1: Αναστολή και κυτταροτοξικότητα in vitro διαφόρων στελεχών ιών influenza A από τα αμινοαδαμαντάνια 15-17 σε κύτταρα MDCK^A.

Ligand	A/Calif/07/2009 (H1N1) ^B S31N ^Γ EC ₅₀ ± SE (μM) ^Δ (N) ^E	A/Victoria/3/75 (H3N2) WT EC ₅₀ ± SE (μM) (N)	A/PR/8/34 (H1N1) V27T/S31N EC ₅₀ ± SE (μM) (N)	A2/Taiwan/1/64 (H2N2) WT EC ₅₀ ± SE (μM) (N)	MCC ₅₀ (μM) ^{ΣΤ}
15	24.13 ± 1.19 (2)	3.4 ± 1.7 (2)	<0.24 ± 0.24 (2)	1.1 ± 0,1 (2)	100
16	16.66 (2)	15%, 5 μM ^Z (2)	15%, 20 μM (2)	11%, 20 μM (2)	>100
17	14.7 (2)	2.2%, 5 μM (2)	11%, 20 μM (2)	9.9%, 20 μM (2)	97.8
Amantadine	240 ± 90 (13)	2.77 ± 0.29 (16)	24.1 ± 3.5 (21)	0.34 ± 0.01 (21)	>100

Πίνακας 11.2: Αναστολή in vitro των στελεχών ιών influenza A N31S και S31N από τα αμινοαδαμαντάνια 15-17 σε κύτταρα MDCK^A.

Ligand	A/WSN/33 S31N EC ₅₀ (μM) (N)	A/WSN/33 M N31S EC ₅₀ (μM) (N)
15	>100	0.022 (7)
16	>100	1.26 ± 0.33 (3)
17	>100	1.07 ± 0.19 (3)
Rimantadine	>100	0.05 (8)
Amantadine	>100	0.6 (8)

Επεξηγήσεις:

A: MDCK : κύτταρα Madin-Darby από νεφρά σκύλου.

B: Ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα προσβεβλημένα από το αντίστοιχο στέλεχος του ιού influenza.

Γ: Μεταλλάξεις που φέρει το ιικό στέλεχος στην M2 πρωτεΐνη. WT: άγριος τύπος της πρωτεΐνης.

Δ: Μέγιστη αποτελεσματική συγκέντρωση (EC₅₀) ή η συγκέντρωση που προκαλεί την επιθυμητή απόκριση (μη μόλυνση των κυττάρων από τον ιό) στο 50% του πληθυσμού. Αναγράφεται και το τυπικό σφάλμα που προκύπτει για την κάθε ένωση από τις μετρήσεις δόσης-απόκρισης με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων.

Ε: Το N είναι ο αριθμός των μετρήσεων. Η αμανταδίνη μετρήθηκε με τα παραπάνω στελέχη ως ένωση αναφοράς.

ΣΤ: Ελάχιστη κυτταροτοξική συγκέντρωση ή συγκέντρωση που απαιτείται για να προκαλέσει μικροσκοπικά ανιχνεύσιμη αλλοίωση στο 50% της μορφολογίας των φυσιολογικών κυττάρων.

Ζ: Ποσοστό του πληθυσμού που μολύνθηκε από το ικό στέλεχος, με παρουσία της ένωσης στην καλλιέργεια στην αναγραφόμενη συγκέντρωση.

Η ένωση **15** είναι αποκλειστής σε επίπεδο ναυμοριακής συγκέντρωσης για τον ιό H1N1 A/WSN/33, N31S στελέχους, ενώ εμφανίζει εξαιρετική δραστικότητα έναντι του H1N1 A/PR/8/34 στελέχους το οποίο φέρει διπλή μετάλλαξη στην M2 πρωτεΐνη, S31N και V27T. Οι ενώσεις **16, 17** είναι δραστικές έναντι των στελεχών H2N2, H3N2 και από τα στελέχη H1N1, στο A/PR/8/34. Όλες οι παραπάνω ενώσεις εμφανίζουν καλή δραστικότητα έναντι του στελέχους A/Calif/07/2009 και είναι αδρανείς έναντι του S31N στελέχους A/WSN/33. Στο στέλεχος A/Calif/07/2009 παρατηρείται ότι όσο αυξάνει η ανθρακική αλυσίδα των ενώσεων, αυξάνεται και η δράστικότητα σε συμφωνία με ότι έχει ήδη παρατηρηθεί σε προηγούμενη εργασία^{240,241}.

12 ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΩΔΕΚΑΤΟ: ΣΥΝΟΨΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Παράγωγα του αδαμαντανίου, όπως η αμανταδίνη και η ριμανταδίνη, δρουν ως αποκλειστές της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης M2 του ιού influenza A (A/M2TM), αλλά η χρήση τους έχει διακοπεί εξαιτίας εμφάνισης ανθεκτικών μεταλλαγμένων στελεχών του ιού. Η βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης των αμινοαδαμαντανικών προσδετών στην M2 πρωτεΐνη μπορεί να βοηθήσει στην ανάπτυξη νέων φαρμακομορίων, με δράση επί των μεταλλαγμένων αυτών στελεχών.

Στην παρούσα εργασία επικυρώνεται ότι ο υπολογισμός της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας σε συνδυασμό με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (FEP/MD) και τη μέθοδο BAR (Bennett acceptance ratio) μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τον καθορισμό της σχετικής συγγένειας σύνδεσης των αμινοαδαμαντανικών αποκλειστών της M2 πρωτεΐνης, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Αποδεικνύεται δε, πως με χρήση της λιπιδικής διπλοστιβάδας DMPC για την προσομοίωση της μεμβράνης, η συσχέτιση μεταξύ των θεωρητικών και πειραματικών τιμών είναι μεγαλύτερη από ότι για την DPPC που είχε χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν.

Η περαιτέρω συμπλήρωση και βελτιστοποίηση του υπολογιστικού μοντέλου ($R^2 = 0.66$, $PI = 0.97$), ενθάρρυνε τη χρήση του για το σχεδιασμό νέων φαρμακομορίων. Στα πλαίσια της παρούσης εργασίας εφαρμόστηκαν υπολογισμοί FEP/MD για την πρόβλεψη της σχετικής συγγένειας σύνδεσης τριών νέων αμινοαδαμαντανίων, ογκωδέστερων παραγώγων της ριμανταδίνης. Τα αμινοαδαμαντάνια αυτά στη συνέχεια συντέθηκαν και οι σταθερές σύνδεσής τους με το τετραμερές M2TM μετρήθηκαν με Ισοθερμική Θερμιδομετρία Τίτλοδότησης (ITC) σε pH 8, ενώ η φαρμακολογική τους δράση μελετήθηκε με αντικό έλεγχο. Ένα από αυτά τα παράγωγα αποδείχθηκε νανομοριακός αποκλειστής ισχυρότερος της ριμανταδίνης έναντι του ιικού στελέχους S31 WSN/33 και μικρομοριακός αποκλειστής του στελέχους A/PR/8/34. Το υπολογιστικό μοντέλο παραμένει αξιόπιστο μετά την προσθήκη των τιμών από τις νέες ενώσεις ($R^2 = 0.61$, $PI = 0.83$), ενώ στα πλαίσια της εργασίας αξιολογήθηκε και σχολιάστηκε το θερμοδυναμικό προφίλ όλων των ενώσεων του μοντέλου με βάση τις πειραματικές τιμές που ελήφθησαν από τις μετρήσεις ITC.

Αξίζει να αναφερθεί ότι στα πλαίσια της παρούσης εργασίας πραγματοποιήθηκε μελέτη ενός αδαμαντανικού παραγώγου με Δυναμική Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (DNMR) χαμηλών θερμοκρασιών. Επίσης δοκιμάστηκαν συνθετικές πορείες ενός δοχείου (one-flask synthesis) για την παρασκευή α,α,α-τρισυποκατεστημένων αμινών με υπόστρωμα τριτοταγές νιτρίλιο (1-αδαμαντανοκαρβονιτρίλιο) και χρήση συμπλόκων τιτανίου, γεγονός που αναφέρεται πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

13 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

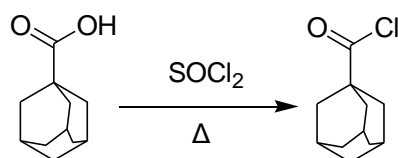
Χημεία

Τα φάσματα υπερύθρου ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer 833. Η ερμηνεία των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H και ^{13}C έγινε με την χρήση των φασμάτων δύο διαστάσεων 2D COSY, HMQC και οι πολλαπλότητες των φασμάτων ^{13}C βρέθηκαν από τα πειράματα DEPT.

Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Τα φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ελήφθησαν σε φασματογράφο NMR Bruker DRX 400 και AC 200. Τα φάσματα ^1H ελήφθησαν στα 400MHz και τα φάσματα ^{13}C και DEPT στα 50MHz. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3).

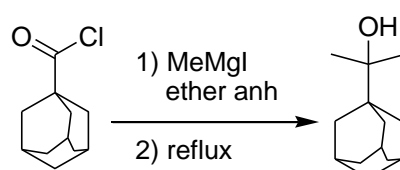
1-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανούλοχλωρίδιο, **19**



Σε 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικό οξύ (3 g, 16.7 mmol) προστίθεται θειονυλοχλωρίδιο* (6 mL, 83.3 mmol). Το μείγμα θερμαίνεται υπό ανάδευση σε συσκευή κάθετου ψυκτήρα στους 65-75°C για 2 ώρες. Ακολούθως το μείγμα αποστάζεται υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι ξηρού. Στο υπόλειμμα προστίθενται 30 mL βενζολίου (3x10 mL) και κατόπιν αποστάζεται ξανά μέχρι ξηρού. Λαμβάνονται 3,32 g του κίτρινου στερεού χλωριδίου **19**. Απόδοση 99.8%. IR (Nujol) $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1787 cm^{-1} (s); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.72 (q, 6H), 1.97 (d, 6H), 2.08 (br s, 3H); ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) δ : 28.02 ($\text{C}_{3',5',7'}$ ^{Ad}), 36.21 ($\text{C}_{4',6',10'}$ ^{Ad}), 39.15 ($\text{C}_{2',8',9'}$ ^{Ad}), 51.28 (C_1 ^{Ad}), 180.08 (C=O).

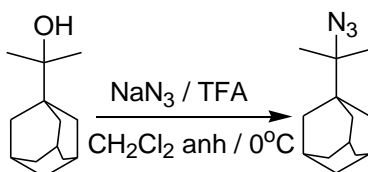
* Το θειονυλοχλωρίδιο που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση είχε προηγουμένως αποσταχθεί υπεράνω κινολίνης, για την κατακράτηση του υδροχλωρικού οξέος.

2-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανυλ)-2-προπανόλη, **20**



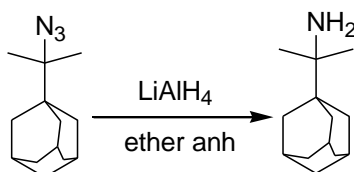
Το μεθυλομαγνησιοϊωδίδιο παρασκευάστηκε από μεθυλοϊωδίδιο (10.7 g, 75.6 mmol) και ρινίσματα μαγνησίου (1.99 g, 83.1 mmol) σε 40 mL άνυδρου αιθέρα. Σε αυτό προστίθεται στάγδην δ/μα χλωριδίου του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος **19** (2.5 g, 12.6 mmol) σε 60 mL άνυδρο αιθέρα υπό ατμόσφαιρα αργού και ανάδευση. Το μείγμα θερμαίνεται σε ήπιο βρασμό για 4 ώρες υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αργού. Κατόπιν υδρολύεται με ίσο όγκο κορεσμένου δ/τος χλωριούχου αμμωνίου υπό ψύξη (παγόλουτρο). Η υδατική φάση πλένεται 2 φορές με αιθέρα. Οι συνενωμένες αιθερικές πλένονται με νερό και άλμη και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του αιθέρα υπό κενό ελήφθησαν 2.09 g της τριτ. αλκοόλης **20** ως λευκό στερεό. Απόδοση 85.5%. IR (Nujol): ν (OH) 3400 (br s, O-H) cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.12 (s, 6H), 1.63 (d, 9H), 1.67 (d, 3H), 1.99 (br s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 24.34 (CH_3), 28.74 ($\text{C}_{3',5',7'}^{\text{Ad}}$), 36.35 ($\text{C}_{2',8',9'}^{\text{Ad}}$), 37.22 ($\text{C}_{4',6',10'}^{\text{Ad}}$), 38.84 ($\text{C}_{1'}^{\text{Ad}}$), 74.88 (C-OH).

2-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανυλ)-2-προπαναζίδιο, **21**



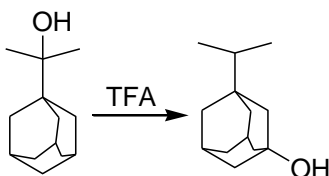
Σε μείγμα νατραζιδίου (503 mg, 7.74 mmol) με 15 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου προστίθεται στάγδην το τριφθοροξικό οξύ (2.94 g, 25.8 mmol) στους 0 °C, υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της προσθήκης, το μείγμα αφήνεται να αναδευτεί για 10 λεπτά υπό ψύξη στους 0 °C. Ακολουθεί προσθήκη δ/τος της 2-(1'-αδαμαντυλ)-2-προπανόλης **20** (500 mg, 2.58 mmol) σε 15 mL άνυδρο διχλωρομεθάνιο, στάγδην και υπό ψύξη. Το μείγμα αναδεύεται έντονα για 4 ώρες στους 0 °C, και αφήνεται σε έντονη ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αλκαλοποιείται με 30 mL δ/τος αμμωνίας 12% w/v. Πραγματοποιείται εκχύλιση και η υδατική φάση πλένεται 2 φορές με 30 mL διχλωρομεθανίου, ενώ η οργανική φάση με ίσο όγκο ύδατος (2x30 mL). Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του διχλωρομεθανίου υπό κενό ελήφθησαν 450 mg του αζιδίου **21** με τη μορφή κίτρινου ελαίου. Απόδοση 80%; IR (Nujol): $\nu(\text{N}_3)$ 2098 cm^{-1} (s); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.23 (s, 6H), 1.61 (br s, 9H), 1.67-1.70 (d, 3H), 2 (br s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 20.79 (CH_3), 28.66 ($\text{C}_{3',5',7'}^{\text{Ad}}$), 36.56 ($\text{C}_{2',8',9'}^{\text{Ad}}$), 37.07 ($\text{C}_{4',6',10'}^{\text{Ad}}$), 39.10 ($\text{C}_{1'}^{\text{Ad}}$), 67.57 (C-N).

2-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανυλ)-2-προπαναμίνη, 15



Σε μείγμα λίθιο αργίλιο υδριδίου (173 mg, 4.56 mmol) με 10 mL άνυδρου αιθέρα προστίθεται στάγδην και υπό ψύξη (παγόλουτρο), διάλυμα του 2-(1'-αδαμαντυλ)-2-προπαναζιδίου **21** (250 mg, 1.14 mmol) σε 10 mL άνυδρου αιθέρα. Το μείγμα θερμαίνεται σε βρασμό για 5 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια το μείγμα υδρολύεται υπό ψύξη (παγόλουτρο) με στάγδην προσθήκη 2 mL ύδατος, 2 mL δ/τος υδροξειδίου του νατρίου 10% w/v και 6 mL ύδατος υπό ανάδευση. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και 2 εκπλύσεις με αιθέρα. Κατόπιν προστίθενται 30 mL αιθέρα και πραγματοποιείται εκχύλιση με δ/μα υδροχλωρικού οξέος 6% w/v (2x30 mL) και αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού ανθρακικού νατρίου στους 0 °C. Προστίθεται περίσσεια ανθρακικού νατρίου ώστε να γίνει εξαλάτωση για τυχόν δ/τοτητα της αμίνης στο νερό και πραγματοποιείται εκχύλιση με διγλορομεθάνιο (2x30 mL). Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του διγλορομεθανίου υπό κενό ελήφθησαν 160 mg της αμίνης **15** με τη μορφή υποκίτρινου στερεού. Απόδοση 72.7%. MS: 194.1905; IR (Film): ν(NH₂) 3373 cm⁻¹ (s); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.99 (s, 6H), 1.15 (br s, NH₂), 1.60 (br s, 9H), 1.66 (d, 3H), 1.99 (br.s, 3H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 25.30 (CH₃), 28.87 (C_{3',5',7'^{Ad}}), 36.23 (C_{2',8',9'^{Ad}}), 37.26 (C_{4',6',10'^{Ad}}), 38.11 (C_{1'^{Ad}}), 53.69 (C-N).

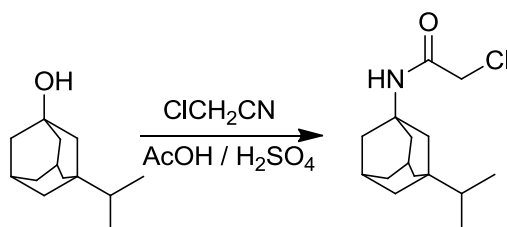
3-Ισοπροπυλ-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανόλη, 35



Το τριφθοροξικό οξύ (16.39 g, 143.77 mmol) προστίθεται στάγδην και υπό ανάδευση στην 2-(1'-αδαμαντυλ)-2-προπανόλη **20** (430 mg, 2.22 mmol) και το μείγμα αναδεύεται υπό θέρμανση στους 65 °C (ελαιόλουτρο) για 4 ώρες. Στο αναδευόμενο μείγμα προστίθενται 68 mL κορεσμένο δ/μα ανθρακικού νατρίου. Κατά τη διάρκεια της προσθήκης αποχωρίζεται καφεκόκκινο έλαιο που το

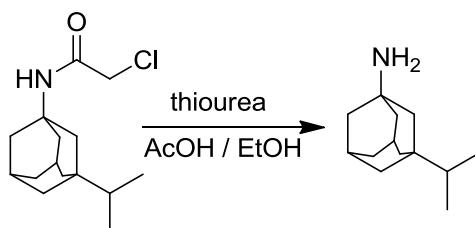
χρώμα του αλλάζει σε κίτρινο μετά την προσθήκη 30 mL δ/τος ανθρακικού νατρίου. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη, το μείγμα θερμαίνεται σε βρασμό για 3.5 ώρες και αφήνεται ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Κατόπιν εκχυλίζεται με αιθέρα (2x80 mL). Οι συνενωμένες αιθερικές πλένονται με νερό και άλμη και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του αιθέρα υπό κενό ελήφθησαν 240 mg της αλκοόλης **35** με τη μορφή υποκίτρινου στερεού. Απόδοση 55.8%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.81-2 (d, 6H), 1.28 (m, 1H), 1.38 (br. s., 4H), 1.42 (br s, 2H), 1.52 (br s, 3H), 1.59-1.68 (q, 5H), 2.18 (br. s., 2H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 16.67 (CH₃), 30.89 (C_{5,7}^{Ad}), 35.97 (C₆^{Ad}), 37.18 (CH), 38.00 (C_{4,10}^{Ad}), 38.63 (C₃^{Ad}), 45.18 (C_{8,9}^{Ad}), 47.21 (C₂^{Ad}), 69.46 (C₁^{Ad}).

2-Χλωρο-N-(3'-ισοπροπυλ-1'-τρικυκλο[3.3.1.1.3,7]δεκανυλ)-ακεταμίδιο, **36**



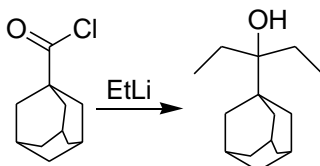
Σε μείγμα 3-ισοπροπυλ-1-αδαμαντανόλης **35** (75 mg, 0.387 mmol) και χλωρακετονιτριλίου (59 mg, 0.774 mmol) προστίθενται 0.06 mL οξικό οξύ υπό ανάδευση και το μείγμα ψύχεται (παγόλουτρο). Κατόπιν προστίθεται το θεικό οξύ (114 mg, 1.161 mmol) στάγδην ώστε η θερμοκρασία να παραμένει χαμηλότερη των 10 °C. Το μείγμα της αντίδρασης αφήνεται να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και αναδεύεται για 24 ώρες. Κατόπιν προστίθενται 10 mL παγόνερο οπότε καταβυθίζεται λευκό ίζημα. Το μείγμα εκχυλίζεται με αιθέρα (2x10 mL) και οι συνενωμένες αιθερικές στιβάδες πλένονται με δ/μα όξινου ανθρακικού νατρίου 10% w/v (2x20 mL) και νερό (2x20 mL) και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του αιθέρα υπό κενό ελήφθησαν 50 mg του ακεταμιδίου **36** με τη μορφή υποκίτρινου στερεού. Απόδοση 47.9%. IR (Nujol): ν (amide C=O) 1673 cm⁻¹ (s); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.80-2 (d, 6H), 1.18-1.31 (m, 2H), 1.37-1.44 (br. d., 4H), 1.52-1.64 (q, 3H), 1.71 (br. s., 2H), 1.88-2.00 (q, 4H), 2.16 (br. s., 3H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 16.56 (CH₃), 29.69 (C_{5,7}^{Ad}), 36.09 (C₆^{Ad}), 37.31 (CH), 38.06 (C_{4,10}^{Ad}), 41.07 (CH₂Cl), 45.24 (C₃^{Ad}), 43.05 (C_{8,9}^{Ad}), 43.30 (C₂^{Ad}), 53.55 (C₁^{Ad}), 164.74 (C=O).

3-Ισοπροπυλ-1-τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκαναμίνη, 18



Σε δ/μα του 2-χλωρο-*N*-(3-ισοπροπυλ-1-αδαμαντυλ)ακεταμιδίου **36** (50 mg, 0.185 mmol) με 6 mL αιθανόλης/οξικού οξέος (αναλογία όγκων 5:1) προστίθεται η θειουρία (17 mg, 0.222 mmol) υπό ανάδευση. Ακολουθεί ανάδευση υπό θέρμανση (ελαιόλουτρο) σε βρασμό για 14 ώρες. Στη συνέχεια προστίθενται 15 mL ύδατος και πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Το διήθημα αλκαλοποιείται με δ/μα υδροξειδίου του νατρίου 20% w/v και εκχυλίζεται με αιθέρα (2x30 mL). Ακολούθως οι συνενωμένες οργανικές φάσεις εκχυλίζονται με δ/μα υδροχλωρικού οξέος 6% w/v (2x30 mL) και η υδατική φάση αλκαλοποιείται με προσθήκη στερεού ανθρακικού νατρίου υπό ψύξη (παγόλουτρο). Προστίθεται περίσσεια ανθρακικού νατρίου ώστε να γίνει εξαλάτωση και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής με διχλωρομεθάνιο (2x30 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του διχλωρομεθανίου υπό κενό ελήφθησαν 5 mg της αμίνης **18** με τη μορφή κίτρινου ελαίου. Απόδοση 11.8%. MS: 194.1916; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.80-0.82 (d, 6H), 1.25-1.30 (m, 3H), 1.35-1.43 (q, 6H), 1.54-1.57 (d, 4H), 1.61-1.64 (d, 2H), 2.12 (br s., 2H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 16.62 (CH₃), 30.03 (C_{5,7}^{Ad}), 36.05 (C₆^{Ad}), 37.20 (C₃^{Ad}), 37.30 (CH), 38.02 (C_{4,10}^{Ad}), 45.12 (C_{8,9}^{Ad}), 47.24 (C₂^{Ad}), 49.36 (C₁^{Ad}).

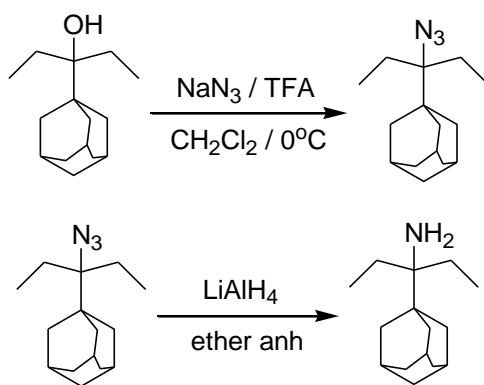
3-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανυλ)-3-πεντανόλη, 23



Σε 25 mL δ/ματος αιθυλολιθίου σε βενζόλιο/κυκλοεξάνιο (0.5 M, 12,5 mmol) προστίθεται στάγδην υπό ατμόσφαιρα αργού και ανάδευση, δ/μα χλωριδίου του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος **19** (700 mg, 3.53 mmol) σε 25 mL άνυδρου αιθέρα. Το μείγμα αναδεύεται για 2 ώρες υπό ατμόσφαιρα

αργού και αφήνεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Κατόπιν υδρολύεται με ίσο όγκο κορεσμένου δ/τος χλωριούχου αμμωνίου υπό ψύξη (παγόλουτρο) και εκχυλίζεται. Η υδατική φάση πλένεται 2 φορές με αιθέρα. Οι συνενωμένες αιθερικές πλένονται 2 φορές με δ/μα υδροξειδίου του νατρίου 3% w/v, νερό και άλμη. Κατόπιν ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του αιθέρα υπό κενό ελήφθησαν 357 mg της αλκοόλης **23** με τη μορφή υποκίτρινου στερεού. Απόδοση 45.5%. IR (Nujol): ν (OH) 3502 cm^{-1} (br s); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.91 (t, 6H), 1.53-9 (q, 4H), 1.61-1.70 (m, 12H), 1.98 (br.s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 9.45 (CH_3), 25.93 (CH_2), 28.90 ($\text{C}_{3',5',7',\text{Ad}}$), 36.71 ($\text{C}_{4',6',10',\text{Ad}}$), 37.40 ($\text{C}_{2',8',9',\text{Ad}}$), 38.51 ($\text{C}_{1',\text{Ad}}$), 40.49 (C-OH).

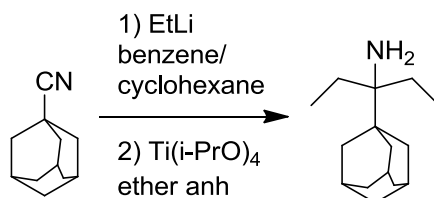
3-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανυλ)-3-πενταναμίνη, 16



Σε μείγμα νατραζιδίου (308 mg, 4.74 mmol) με 20 mL άνυδρο διχλωρομεθάνιο προστίθεται στάγδην το τριφθοροξικό οξύ (1,8 g, 215,8 mmol) στους 0°C , υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της προσθήκης, το μείγμα αφήνεται να αναδευτεί για 10 λεπτά στους 0°C . Ακολουθεί προσθήκη δ/τος της 3-(1'-αδαμαντυλ)-3-πεντανόλης **23** (350 mg, 1,58 mmol) σε 5 mL άνυδρο διχλωρομεθάνιο, στάγδην και στους 0°C . Το μείγμα αναδύεται έντονα για 4 ώρες υπό ψύξη (παγόλουτρο), και αφήνεται σε έντονη ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το μείγμα αλκαλοποιείται με δ/μα 30 mL αμμωνίας 12% w/v στους 0°C . Πραγματοποιείται εκχύλιση και η υδατική φάση πλένεται 2 φορές με 30 mL διχλωρομεθανίου, ενώ η οργανική φάση με ίσο όγκο ύδατος (2×30 mL). Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του διχλωρομεθανίου υπό κενό ελήφθησαν 160 mg κίτρινου ελαίου, αποτελούμενα από 103 mg (64.5%) του επιθυμητού προϊόντος 3-(1'-αδαμαντυλ)-3-πενταναζιδίου **24** και 57 mg (35.5%) του παραπροϊόντος απόσπασης 3-(1'-αδαμαντυλ)-2-πεντενίου. IR (Flim) ν ($=\text{C-H}$): 3056 cm^{-1} (m), ν

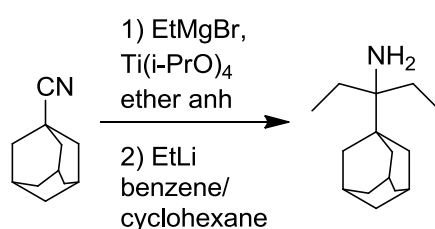
(N₃)2095 cm⁻¹ (s), ν (C=C) 1601 cm⁻¹ (w). Το ελαιώδες μείγμα χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω κατεργασία στο επόμενο στάδιο.

Σε μίγμα του λίθιο αργίλιο υδριδίου (98 mg, 2.59 mmol) με 4 mL άνυδρου αιθέρα προστίθεται στάγδην και υπό ψύξη (παγόλουτρο), διάλυμα του ακάθαρτου 3-(1'-αδαμαντυλ)-3-πενταναζιδίου **24** σε 4 mL άνυδρου αιθέρα. Το μείγμα θερμαίνεται σε βρασμό για 5 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια το μείγμα υδρολύεται υπό ψύξη (παγόλουτρο) με στάγδην προσθήκη 2 mL ύδατος, 2 mL δ/τος υδροξειδίου του νατρίου 10% w/v και 6 mL ύδατος υπό ανάδευση. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και 2 εκπλύσεις με αιθέρα. Προστίθενται 30 mL αιθέρα και πραγματοποιείται εκχύλιση με δ/μα υδροχλωρικού οξέος 6% w/v (2x30 mL) και αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού ανθρακικού νατρίου υπό ψύξη. Προστίθεται περίσσεια ανθρακικού νατρίου ώστε να γίνει εξαλάτωση και πραγματοποιείται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (2x30 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του διχλωρομεθανίου υπό κενό ελήφθησαν 10 mg της αμίνης **16** με τη μορφή κίτρινου ελαίου. Απόδοση 10.9%; MS: 222.2218; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, 6H), 1.08 (br.s., NH₂), 1.33-1.43 (m, 2H), 1.45-1.52 (m, 2H), 1.66 (m, 12H), 1.97 (br.s., 3H); ¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ: 9.90 (CH₃), 26.75 (CH₂), 29.05 (C_{3',5',7'}^{Ad}), 36.75 (C_{2',8',9'}^{Ad}), 37.46 (C_{4',6',10'}^{Ad}), 38.60 (C_{1'}^{Ad}), 39.86 (C-N).



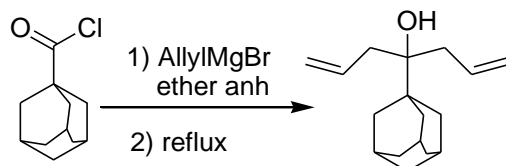
Σε δ/μα 1-αδαμαντανοκαρβονιτριλίου (500 mg, 3.11 mmol) σε 30 mL άνυδρο αιθέρα προστίθεται στάγδην 25 mL δ/τος αιθυλολιθίου σε βενζόλιο/κυκλοεξάνιο (0.5 M, 12.5 mmol) υπό ατμόσφαιρα αργού και ανάδευσης. Μετά από ανάδευση 30 λεπτών προστίθεται το τετραϊσοπροπόξυ τιτάνιο (1.06 g, 3.73 mmol) στάγδην οπότε παρατηρείται αλλαγή χρώματος σε σκούρο πράσινο. Το μείγμα αφήνεται σε 50 °C (ελαιόλουτρο) υπό ανάδευση ολονυκτίως. Προστίθενται 40 mL δ/τος υδροξειδίου του νατρίου 10% w/v υπό ψύξη (παγόλουτρο) και κατόπιν ανάδευσης για 30 λεπτά ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Το διήθημα εκχυλίζεται με αιθέρα (2x30 mL). Οι συνενωμένες αιθερικές συμπυκνώνονται και εκχυλίζονται με δ/μα υδροχλωρικού οξέος 6% v/v (2x50 mL). Ακολουθεί αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού ανθρακικού νατρίου υπό ψύξη. Προστίθεται περίσσεια ανθρακικού νατρίου ώστε να γίνει εξαλάτωση και πραγματοποιείται

εκχύλιση με αιθέρα (2x30 mL). Η οργανική φάση πλένεται 2 φορές με ίσο όγκο νερού και άλμης και ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του αιθέρα υπό κενό ελήφθησαν 120 mg κίτρινου ελαίου. Ακολούθησε καθαρισμός μέσω ανακρυστάλλωσης. Σε δ/μα της ακατέργαστης αμίνης με 2 mL αιθανόλης προστίθεται εν θερμώ (70 °C υδρόλουτρο) θερμό δ/μα φουμαρικού οξέος (66 mg, 0,569 mmol) σε 2 mL αιθανόλης. Ακολούθως ο δ/της εκδιώκεται υπό κενό οπότε προκύπτει λευκό κρυσταλλικό στερεό, το οποίο κατεργάζεται με αιθέρα και διηθείται υπό κενό μετά το πέρας της κρυστάλλωσης. 12 mg αμίνης μετά ανακρυστάλλωσης. Απόδοση 1.8%.



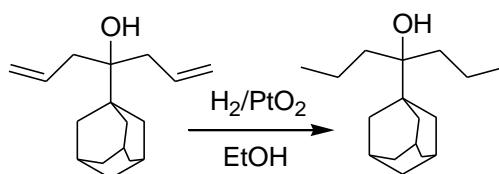
Σε δ/μα 1-αδαμαντανοκαρβονιτριλίου (500 mg, 3.11 mmol) σε 15 mL άνυδρο αιθέρα προστίθεται το τετραϊσοπροπόξυ τιτάνιο (975 mg, 3.43 mmol). Κατόπιν προστίθενται στάγδην 6.3 mL δ/τος αιθυλομαγνησιοβρωμιδίου (1 M, 6.24 mmol) σε αιθέρα υπό ατμόσφαιρα αργού και ανάδευσης. Κατά την προσθήκη παρατηρείται αλλαγή χρώματος σε σκούρο καφέ. Το μείγμα αφήνεται να αναδευτεί σε συνθήκες δωματίου και ατμόσφαιρα αργού για 1 h. Στη συνέχεια προστίθενται στάγδην 25 mL δ/τος αιθυλολιθίου σε βενζόλιο/κυκλοεξάνιο (0.5 M, 12.5 mmol). Το μείγμα αφήνεται υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αργού ολονυκτίως. Προστίθεται ίσος όγκος δ/τος υδροξειδίου του νατρίου 10% w/v υπό ψύξη (παγόλουτρο) και κατόπιν ανάδευσης για 30 λεπτά ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Το διήθημα εκχυλίζεται με αιθέρα (2x30 mL). Οι συνενωμένες αιθερικές συμπυκνώνονται και εκχυλίζονται με δ/μα υδροχλωρικού οξέος 6% v/v (2x50 mL). Ακολουθεί αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού ανθρακικού νατρίου υπό ψύξη. Προστίθεται περίσσεια ανθρακικού νατρίου ώστε να γίνει εξαλάτωση και πραγματοποιείται εκχύλιση με αιθέρα (2x30 mL). Η οργανική φάση πλένεται 2 φορές με ίσο όγκο νερού και άλμης και ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του αιθέρα υπό κενό ελήφθησαν 300 mg κίτρινου ελαίου. Ακολούθησε καθαρισμός μέσω ανακρυστάλλωσης. Σε δ/μα της ακατέργαστης αμίνης με 2 mL αιθανόλης προστίθεται εν θερμώ (70 °C υδρόλουτρο) θερμό δ/μα φουμαρικού οξέος (166 mg, 1.425 mmol) σε 2 mL αιθανόλης. Ακολούθως ο δ/της εκδιώκεται υπό κενό οπότε προκύπτει λευκό κρυσταλλικό στερεό, το οποίο κατεργάζεται με αιθέρα και διηθείται υπό κενό μετά το πέρας της κρυστάλλωσης. 60 mg αμίνης μετά ανακρυστάλλωσης. Απόδοση 10%.

4-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανυλ)-1,6-επταδιεν-4-όλη, **28**



Το αλλυλομαγνησιοβρωμίδιο παρασκευάστηκε από αλλυλοβρωμίδιο (6.1 g, 50.4 mmol) και ρινίσματα μαγνησίου (1.33 g, 55.4 mmol) σε 60 mL άνυδρου αιθέρα. Σε αυτό προστίθενται στάγδην υπό ατμόσφαιρα αργού και ανάδευση, δ/μα χλωριδίου του 1-αδαμαντανοκαρβοξυλικού οξέος **19** (2 g, 10.1 mmol) σε 35 mL άνυδρο αιθέρα. Το μείγμα θερμαίνεται σε ήπιο βρασμό για 4 ώρες υπό ανάδευση και ατμόσφαιρα αργού. Αφήνεται ολονυκτίως σε θερμοκρασία δωματίου και ατμόσφαιρα αργού υπό ανάδευση. Κατόπιν υδρολύεται με ίσο όγκο κορεσμένου δ/τος χλωριούχου αμμωνίου υπό ψύξη (παγόλουτρο) και εκχυλίζεται. Η υδατική φάση πλένεται με αιθέρα (2x30 mL). Οι συνενωμένες αιθερικές πλένονται με ίσο όγκο νερού και άλμης και ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του αιθέρα υπό κενό ελήφθησαν 1.74 g της αλκοόλης **28** με τη μορφή κίτρινου ελαίου. Απόδοση 70%; IR (Film) δ : $\nu(\text{OH})$ 3568 cm^{-1} (br s), $\nu(\text{C-H})$ 3074 (s), 3008 (m), $\nu(\text{C=C})$ 1636 (s); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.70 (q, 12H), 1.99 (s, 3H), 2.28-2.40 (m, 4H), 5.09 (t, 4H), 5.88-5.98 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 28.81 ($\text{C}_{3',5',7}^{\text{Ad}}$), 36.57 ($\text{C}_{2',8',9}^{\text{Ad}}$), 37.29 ($\text{C}_{4',6',10}^{\text{Ad}}$), 39.29 (CH_2), 40.34 ($\text{C}_{1'}^{\text{Ad}}$), 76.08 (C-OH), 118.11 ($=\text{CH}_2$), 135.82 ($-\text{CH}=\text{)$.

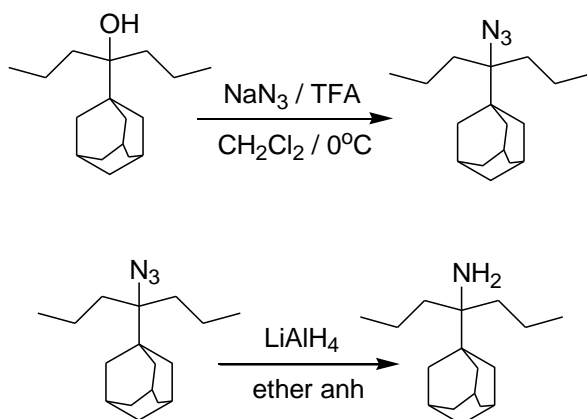
4-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανυλ)-4-επτανόλη, **25**



Διάλυμα της 4-(1'-αδαμαντυλ)-1,6-επταδιεν-4-όλης **28** (840 mg, 3.42 mmol) σε 80 mL αιθανόλης υφίστανται καταλυτική υδρογόνωση επί 20 ώρες στα 48 psi υπεράνω καταλύτη Adams (80 mg). Ακολουθεί διήθηση υπό κενό προς απομάκρυνση του καταλύτη και συμπύκνωση μέχρι ξηρού. Ελήφθησαν 720 mg της αλκοόλης **25** με τη μορφή λευκού στερεού. Απόδοση 84.2%. IR (Nujol): $\nu(\text{OH})$ 3469 cm^{-1} (br s), $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.90 (t, 6H), 1.29-1.39 (m, 4H), 1.41-1.50

(m, 4H), 1.65 (q, 12H), 1.98 (s, 3H), 2.17 (s, 1H); ^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3) δ : 15.29 (CH_3), 18.19 (CH_2), 28.89 ($\text{C}_{3',5',7',\text{Ad}}$), 36.59 ($\text{C}_{2',8',9',\text{Ad}}$), 36.88 (CH_2), 37.39 ($\text{C}_{4',6',10',\text{Ad}}$), 40.28 ($\text{C}_{1',\text{Ad}}$), 41.39 (C-OH).

4-(1'-Τρικυκλο[3.3.1.1.^{3,7}]δεκανυλ)-4-επταναμίνη, 17



Σε μείγμα νατραζιδίου (156 mg, 2.4 mmol) με 5 mL άνυδρου διχλωρομεθανίου προστίθεται στάγδην το τριφθοροξικό οξύ (912 mg, 8 mmol) στους 0°C (παγόλουτρο), υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της προσθήκης, το μείγμα αφήνεται να αναδευτεί για 10 λεπτά υπό ψύξη (παγόλουτρο). Ακολουθεί προσθήκη δ/τος της 4-(1'-αδαμαντυλ)-4-επτανόλης **25** (200 mg, 0.80 mmol) σε 7 mL άνυδρο διχλωρομεθάνιο, στάγδην στους 0°C και το μείγμα αναδεύεται έντονα για 4 ώρες στους 0°C . Το μείγμα αλκαλοποιείται με δ/μα αμμωνίας 12% w/v υπό ψύξη (παγόλουτρο). Πραγματοποιείται εκχύλιση και η υδατική φάση πλένεται 2 φορές με 40 mL διχλωρομεθανίου, ενώ η οργανική φάση με ίσο όγκο ύδατος (2x40 mL). Οι συνενωμένες οργανικές φάσεις ξηραίνονται υπεράνω άνυδρου θεικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του διχλωρομεθανίου υπό κενό ελήφθησαν 150 mg κίτρινου ελαίου, αποτελούμενα από 81 mg (53.8%) του επιθυμητού προϊόντος 3-(1'-αδαμαντυλ)-4-επταναζιδίου **26** και 69 mg (46.2%) του παραπροϊόντος απόσπασης 4-(1'-αδαμαντυλ)-3-επτενίου. IR (Film) ν (=C-H): 3097 cm^{-1} (m), ν (N_3) 208 cm^{-1} (s), ν (C=C) 1601 cm^{-1} (w). Το ελαιώδες μείγμα χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω κατεργασία στο επόμενο στάδιο.

Σε μείγμα του λίθιο αργίλιο υδριδίου (66 mg, 1.74 mmol) με 3 mL άνυδρου αιθέρα προστίθεται στάγδην και υπό ψύξη (παγόλουτρο), διάλυμα του ακάθαρτου 3-(1'-αδαμαντυλ)-4-επταναζιδίου **26** σε 3 mL άνυδρου αιθέρα. Το μείγμα θερμαίνεται σε βρασμό για 5 ώρες υπό ανάδευση. Στη συνέχεια το μείγμα υδρολύεται υπό ψύξη (παγόλουτρο) με στάγδην προσθήκη 2 mL ύδατος, 2 mL δ/τος υδροξειδίου του νατρίου 10% w/v και 6 mL ύδατος υπό ανάδευση. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και 2 εκπλύσεις με αιθέρα. Κατόπιν προστίθενται 30 mL αιθέρα και πραγματοποιείται εκχύλιση με δ/μα

υδροχλωρικού οξέος 6% w/v (2x30 mL) και αλκαλοποίηση της υδατικής φάσης με προσθήκη στερεού ανθρακικού νατρίου υπό ψύξη. Προστίθεται περίσσεια ανθρακικού νατρίου ώστε να γίνει εξαλάτωση για τυχόν δ/τοτητα της αμίνης στο νερό και πραγματοποιείται εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο (2x30 mL). Η οργανική φάση ξηραίνεται υπεράνω άνυδρου θειικού νατρίου. Μετά από εκδίωξη του διχλωρομεθανίου υπό κενό ελήφθησαν 10 mg της αμίνης **17** με τη μορφή κίτρινου ελαίου. Απόδοση 13.7%; MS: 250.0; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.89 (t, 6H), 1.19-1.41 (m, 10H), 1.61 (t, 12H), 1.98 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ : 15.45 (CH_3), 18.59 (CH_2), 29.07 ($\text{C}_{3',5',7'}^{\text{Ad}}$), 36.65 ($\text{C}_{2',8',9'}^{\text{Ad}}$), 37.45 (CH_2), 37.97 ($\text{C}_{4',6',10'}^{\text{Ad}}$), 39.53 ($\text{C}_{1'}^{\text{Ad}}$), 56.94 (C-N).

14 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

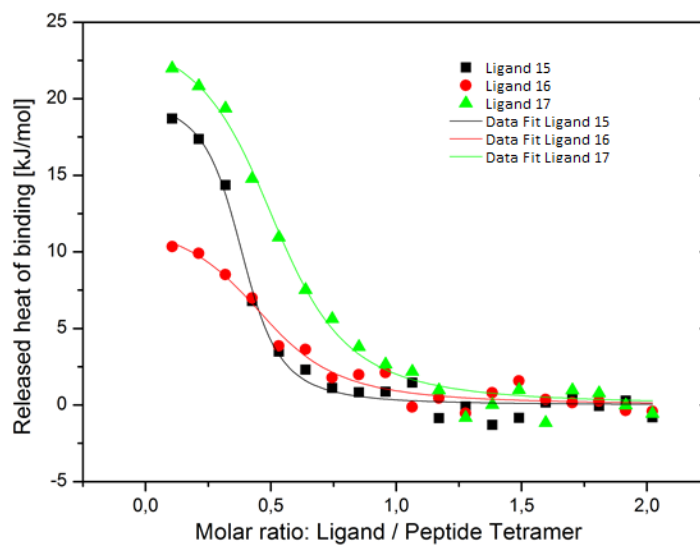
14.1 Παράρτημα Α: Μέτρηση σταθερών σύνδεσης αμινοαδαμαντανικών προσδετών με το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 του ιού της influenza A (A/M2TM) με Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης

Οι σταθερές συγγένειας των αμινοαδαμαντανικών προσδετών **15 – 17**, υπολογίστηκαν με μη γραμμική προσαρμογή της μετρούμενης θερμότητας. Οι σταθερές πρόσδεσης υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό Digitam σε Windows, έκδοση 4.1, που εφαρμόζει μη γραμμική προσαρμογή της μετρούμενης θερμότητας μετά από κάθε ένεση. Για τον υπολογισμό, η συγκέντρωση του πεπτιδίου ήταν μεταβλητή, δεδομένου ότι δε σχημάτισε τετραμερή όλη η ποσότητα του πεπτιδίου. Η εξίσωση στην οποία προσαρμόστηκαν οι τιμές των $(x, y) = (\text{μοριακή αναλογία προσδέτη/πεπτιδίου}, \text{θερμότητα πρόσδεσης})$ φαίνεται στην εξίσωση (14.1)

$$f(x) = a \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{x}{b} - r}{2\sqrt{\left(1 + \frac{x}{b} + r\right)^2 - 4\frac{x}{b}}} \right] \quad (14.1)$$

με $\Delta H_i = -a, K_d = rbc_R$ όπου c_R η συγκέντρωση του τετραμερούς.

Στο σχήμα 14.1 φαίνονται τα θερμιδογραφήματα που μετρήθηκαν από τα πειράματα ITC των προσδετών **15 – 17**.



Σχήμα 14.1: Θερμιδογράφημα που ελήφθη από πειράματα ITC σύνδεσης των προσδετών 15-17 με το τετραμερές A/M2TM.

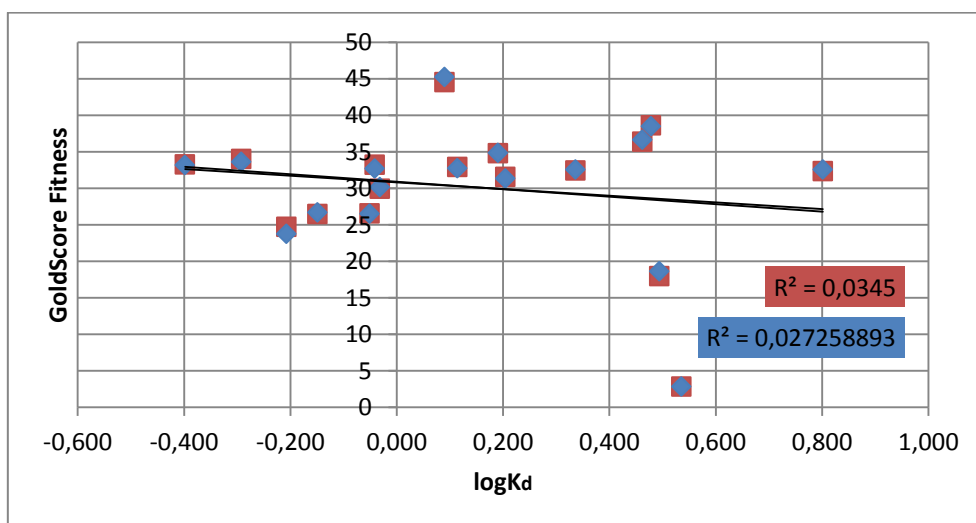
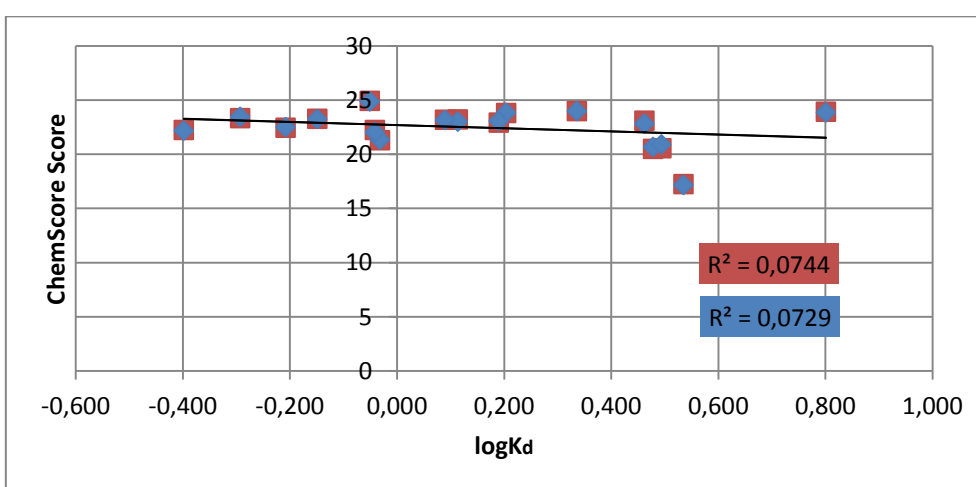
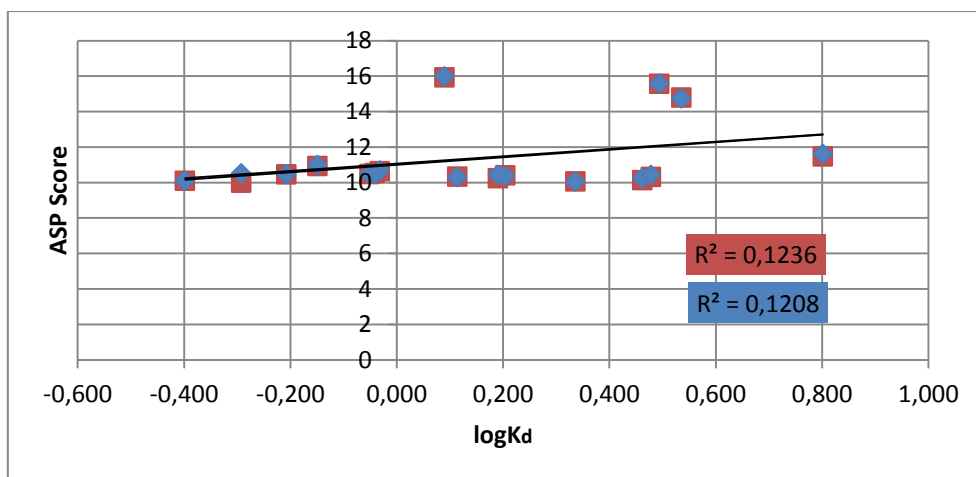
14.2 Παράρτημα B: Υπολογισμοί Μοριακού Ελλιμενισμού στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 του ιού της influenza A (A/M2TM)

Στον πίνακα 14.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συναρτήσεων βαθμολογίας ASP, ChemScore και GoldScore όπως προέκυψαν από τους υπολογισμούς μοριακού ελλιμενισμού των προσδετών **1 – 17**. Τα αποτελέσματα δίνονται και για τις δύο επιλογές για τα μόρια νερού “on” και “toggle” (βλ. §7.1.4).

Πίνακας 14.1: Αποτελέσματα των συναρτήσεων βαθμολογίας ASP, ChemScore και GoldScore όπως προέκυψαν για την αλληλεπίδραση των ενώσεων 1-17 με την πρωτεΐνη M2TM (2KQT.pdb) με υπολογισμούς ελλιμενισμού.

Ligand	K _d (μM)	logK _d	ASP Score on	ASP Score toggle	ChemScore Score on	ChemScore Score toggle	GoldScore Fitness on	GoldScore Fitness toggle
3	1,6	0,204	10,4	10,36	23,81	23,83	31,54	31,32
4	0,89	-0,051	10,48	10,48	24,92	24,86	26,57	26,51
5	0,62	-0,208	10,46	10,45	22,45	22,5	24,72	23,73
6	0,71	-0,149	10,93	10,98	23,27	23,23	26,47	26,67
7	0,4	-0,398	10,1	10,09	22,23	22,17	33,25	33,18
8	0,93	-0,032	10,63	10,67	21,29	21,36	29,92	30,13
9	2,90	0,462	10,12	10,24	23,1	22,83	36,38	36,64
10	3,01	0,479	10,31	10,41	20,48	20,67	38,6	38,49
11	1,30	0,114	10,32	10,3	23,21	22,99	32,91	32,73
12	6,33	0,801	11,47	11,61	23,92	23,86	32,34	32,54
13	0,91	-0,041	10,53	10,48	22,24	22,04	33,22	32,7
15	1,55	0,190	10,24	10,44	22,91	23,06	34,79	34,83
1	2,17	0,336	10,05	10,04	23,97	23,99	32,41	32,54
2	0,51	-0,292	9,99	10,51	23,34	23,43	33,99	33,61
17	3,43	0,535	14,79	14,73	17,23	17,16	2,82	2,86
16	3,12	0,494	15,56	15,59	20,56	20,9	17,96	18,64
15	1,23	0,090	15,92	15,98	23,19	23,16	44,52	45,22

Στα κάτωθι σχήματα απεικονίζονται οι γραφικές παραστάσεις των βαθμολογιών που λήφθηκαν με τις παραπάνω συναρτήσεις σε συνάρτηση με τον λογάριθμο της σταθεράς διάστασης. Τα αποτελέσματα δίνονται και για τις δύο επιλογές για τα μόρια νερού “on” (ερυθρά τετράγωνα) και “toggle” (κυανοί ρόμβοι).



Σχήμα 14.2: Συσχέτιση σκόρ με τις συναρτήσεις ASP, ChemScore, GoldScore και του logK_d για την αλληλεπίδραση των ενώσεων 1-17 με την πρωτεΐνη M2TM (2KQT.pdb) με υπολογισμούς ελλειμνισμού.

14.3 Παράρτημα Γ: Υπολογισμοί Διατάραξης Ελεύθερης Ενέργειας σε συνδυασμό με προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (FEP/MD) για το σύμπλοκο αμινοαδαμαντανικού προσδέτη με το διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 του ιού influenza A (A/M2TM)

14.3.1 Θεωρητική Διαμόρφωση

Πίνακας 14.2: Σταδιοποίηση μεταβλητής λ (οι συμβολισμοί λ_{vdW} και λ_{coul} αντιστοιχούν στην κλιμάκωση των van der Waals και ηλεκτροστατικών Coulomb αλληλεπιδράσεων, αντίστοιχα).

# Παραθύρων	λ_{vdW}^A	λ_{vdW}^B	λ_{coul}^A	λ_{coul}^B
1	1.0	0.0	1.0	0.0
2	1.0	0.119	0.75	0.0
3	1.0	0.190	0.5	0.0
4	1.0	0.247	0.25	0.0
5	1.0	0.325	0.0	0.0
6	0.675	0.456	0.0	0.0
7	0.456	0.675	0.0	0.0
8	0.325	1.0	0.0	0.0
9	0.247	1.0	0.0	0.25
10	0.190	1.0	0.0	0.5
11	0.119	1.0	0.0	0.75
12	0.0	1.0	0.0	1.0

Στη μέθοδο BAR (Bennett acceptance ratio)^{130,213,238} που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, κατά τη δειγματοληψία υπολογίζεται η δυναμική ενέργεια σε κάθε παράθυρο i τόσο στην πρόσθια ($i \rightarrow i+1$) όσο και στην αντίστροφη πορεία ($i+1 \rightarrow i$). Η διαφορά ελεύθερης ενέργειας ΔG_i μεταξύ των παραθύρων i και $i+1$ προκύπτει από τον καλύτερο συνδυασμό των δεδομένων πρόσθιας και αντίστροφης δειγματοληψίας ώστε να ελαχιστοποιείται η διακύμανσή της σύμφωνα με την εξίσωση (14.2)

$$\sum_{j=1}^{L_i} \frac{1}{1 + \frac{L_i}{L_{i+1}} \exp\left[\frac{(W_{i,j}^f - \Delta G_i)}{k_B T}\right]} - \sum_{v=1}^{L_{i+1}} \frac{1}{1 + \frac{L_{i+1}}{L_i} \exp\left[\frac{(\Delta G_i - W_{i+1,v}^b)}{k_B T}\right]} = 0 \quad (14.2)$$

όπου L_i , L_{i+1} ο αριθμός των ανεξαρτήτων απεικονίσεων του συστήματος στο παράθυρο i και $i+1$ και οι σχέσεις (14.3) και (14.4) δείχνουν

$$W_i^f = V_{i+1} - V_i \quad (14.3)$$

$$W_i^b = V_{i-1} - V_i \quad (14.4)$$

τις διαφορές στη δυναμική ενέργεια για τη δειγματοληψία $i \rightarrow i+1$ και $i+1 \rightarrow i$, αντίστοιχα.

Για τον υπολογισμό του σφάλματος της πειραματικής διαφοράς ελεύθερης ενέργειας, στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάδοσης σφάλματος (*propagation error*). Ας θεωρήσουμε ότι κάθε πειραματική μέτρηση της σταθεράς συγγένειας K_a και K_b συνδέεται με ένα σφάλμα δ_a και δ_b , αντίστοιχα. Το σφάλμα της διαφοράς ελεύθερης ενέργειας, $\Delta\Delta G$, εξαρτάται από τις σταθερές διάστασης συγγένειας (βλ. εξίσωση (14.5)) αφού

$$\Delta\Delta G = -RT \ln \frac{a}{b} \quad (14.5)$$

όπου $K_a \equiv a$ και $K_b \equiv b$.

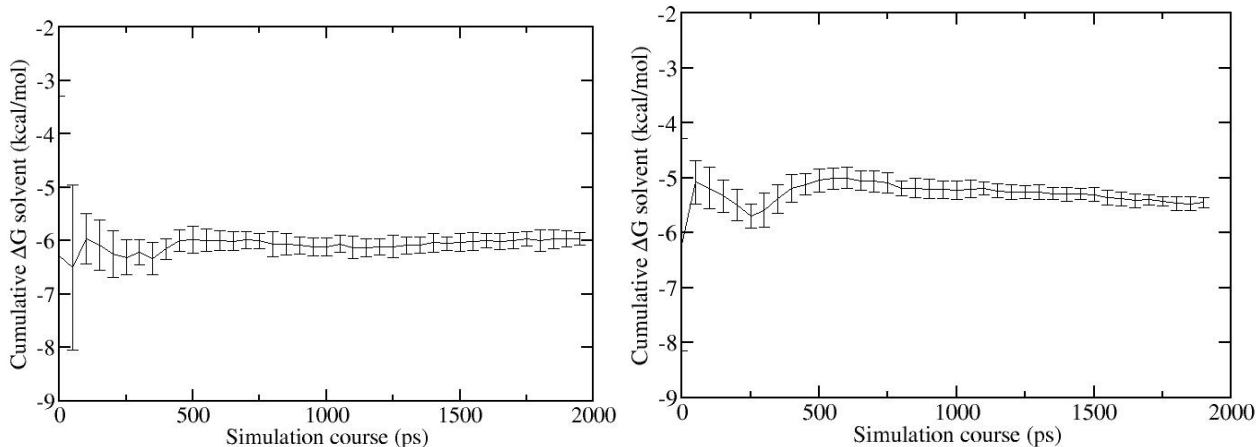
Έτσι, τα σφάλματα των δ_a και δ_b διαδίδονται στην αβεβαιότητα της $\Delta\Delta G$. Επειδή στην εξίσωση (14.5) η διαφορά ελεύθερης ενέργειας εξαρτάται από τον λογάριθμο του λόγου των σταθερών συγγένειας a και b , το σφάλμα της $\Delta\Delta G$ δίνεται από τις σχέσεις (14.6) και (14.7)

$$\delta f = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial a} \delta_a\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial b} \delta_b\right)^2} \quad (14.6) \quad \text{ή} \quad \delta f = RT \sqrt{\left(\frac{1}{a} \delta_a\right)^2 + \left(\frac{1}{b} \delta_b\right)^2} \quad (14.7)$$

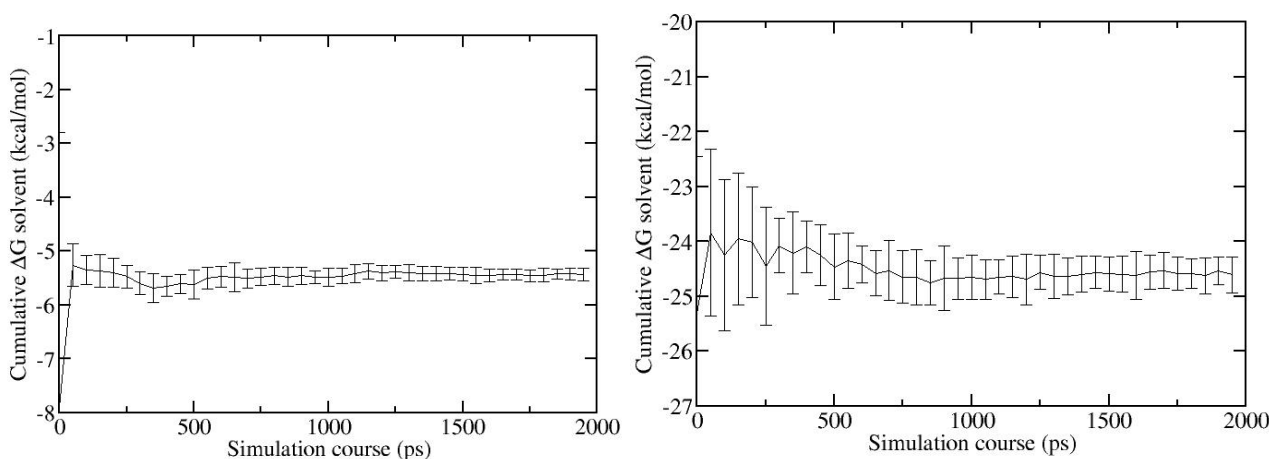
14.3.2 Σύγκλιση FEP/MD (FEP/MD Convergence)

Με σκοπό να αξιολογηθεί η σύγκλιση των υπολογισμών FEP/MD στην παρούσα εργασία, ελέγχονται διαγράμματα της υπολογιζόμενης σχετικής ελεύθερης ενέργειας ΔG με τη μέθοδο BAR συναρτήσεως του χρόνου από 50 ps έως 2000 ps σε διάλυμα και από 50 ps έως 2000 – 5000 ps (μεγαλύτεροι χρόνοι εφαρμόστηκαν σε πιο μεγάλα μόρια) σε σύμπλοκο, με προσαύξηση 50 ps..

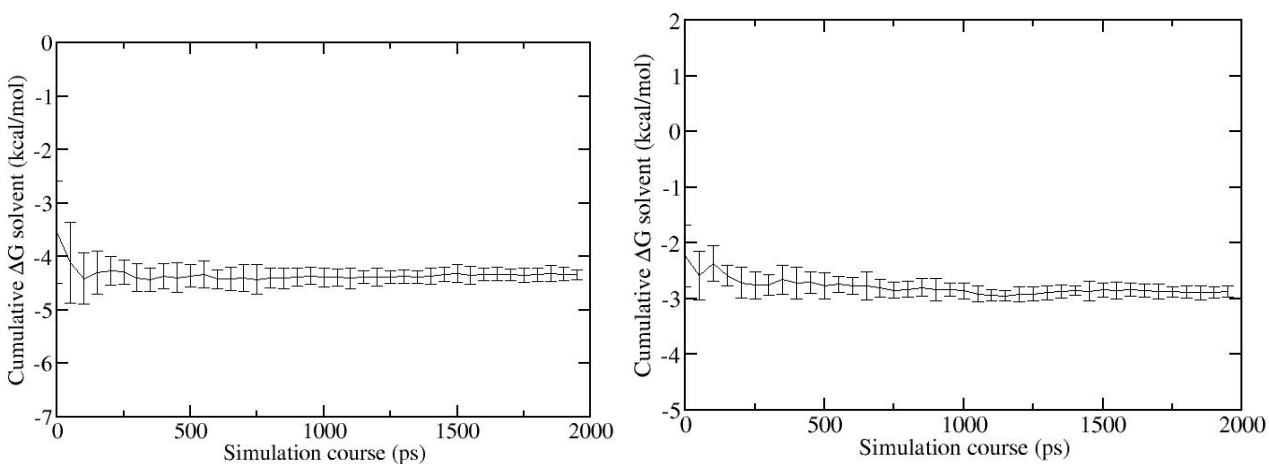
Παρακάτω παρουσιάζονται οι Αθροιστικές σχετικές ενέργειες (*Cumulative relative energies*) για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα.



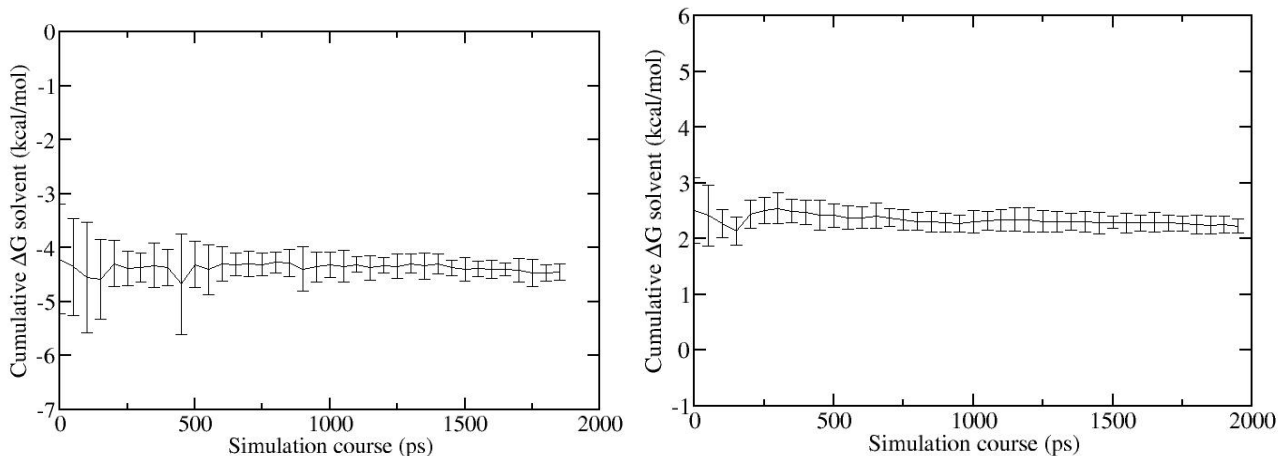
Σχήμα 14.3: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 4→3 (αριστερά) και 5→4 (δεξιά).



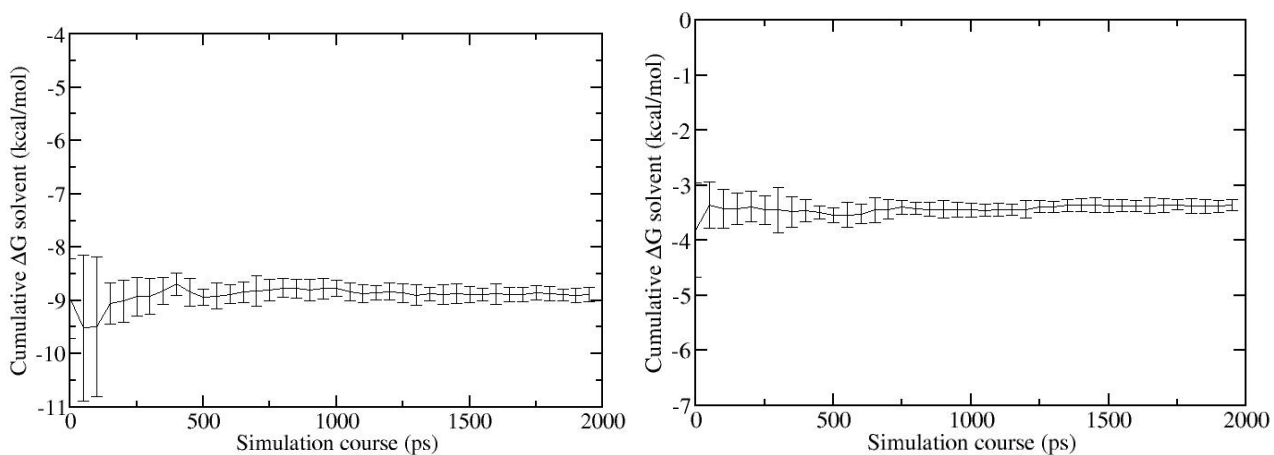
Σχήμα 14.4: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 6→5 (αριστερά) και 8→7 (δεξιά).



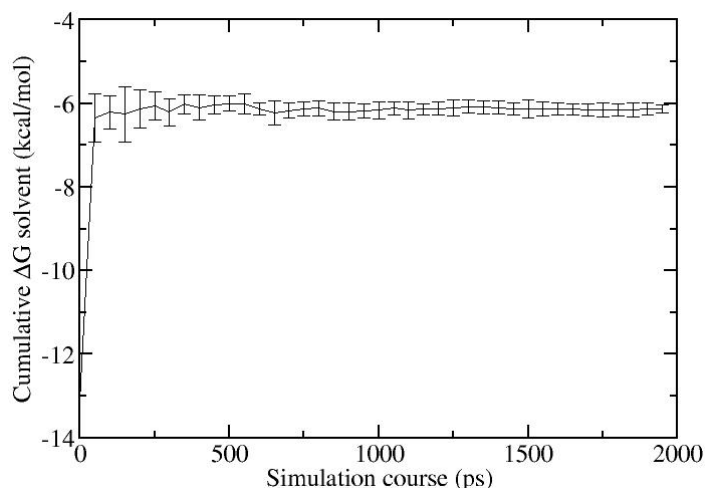
Σχήμα 14.5: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 9→7 (αριστερά) και 10→9 (δεξιά).



Σχήμα 14.6: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 11→7 (αριστερά) και 12→1 (δεξιά).

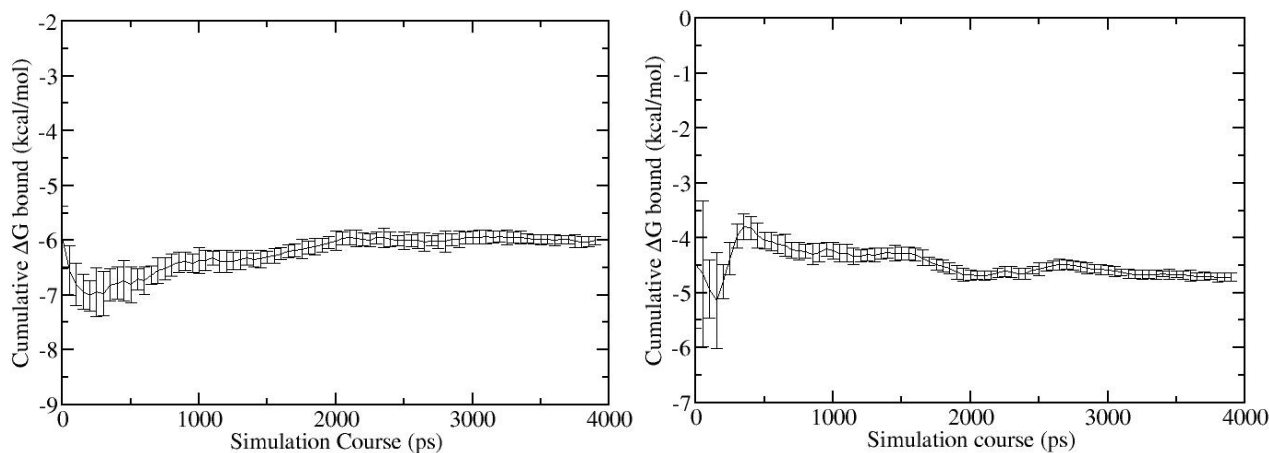


Σχήμα 14.7: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 13→7 (αριστερά) και 14→7 (δεξιά).

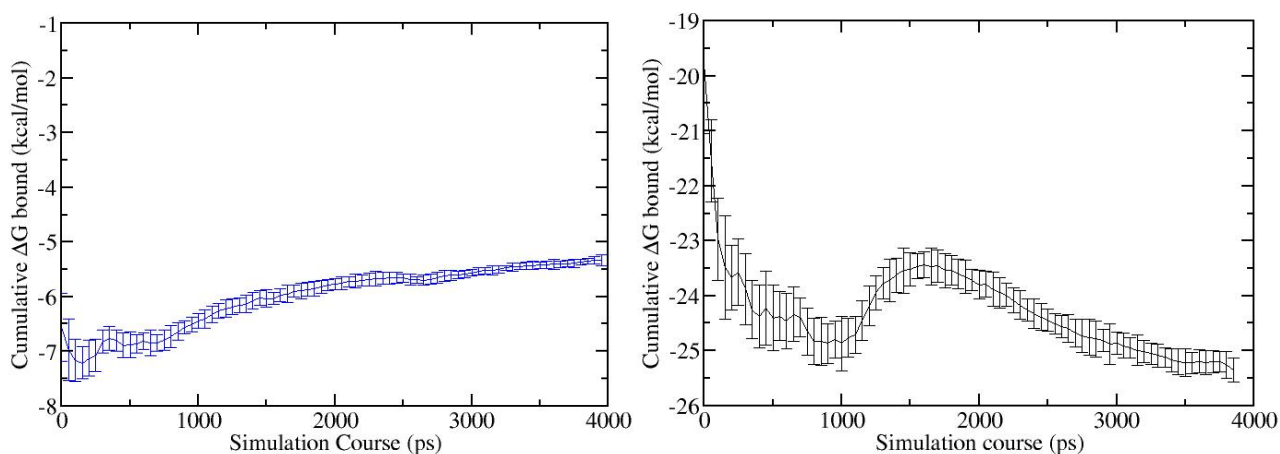


Σχήμα 14.8: Αθροιστική διαφορά ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τον υπολογισμό FEP/MD σε διάλυμα, που αντιστοιχεί στη μετάλλαξη 15→2.

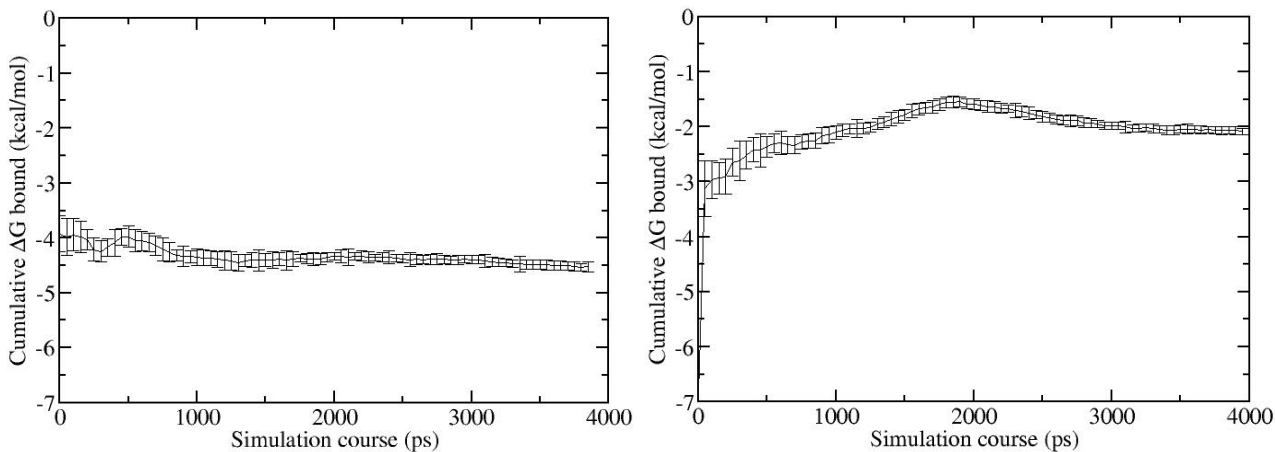
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι Αθροιστικές σχετικές ενέργειες (*Cumulative relative energies*) συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD του συμπλόκου του προσδέτη στην, ενσωματωμένη σε DMPC λιπιδική διπλοστιβάδα, πρωτεΐνη M2TM.



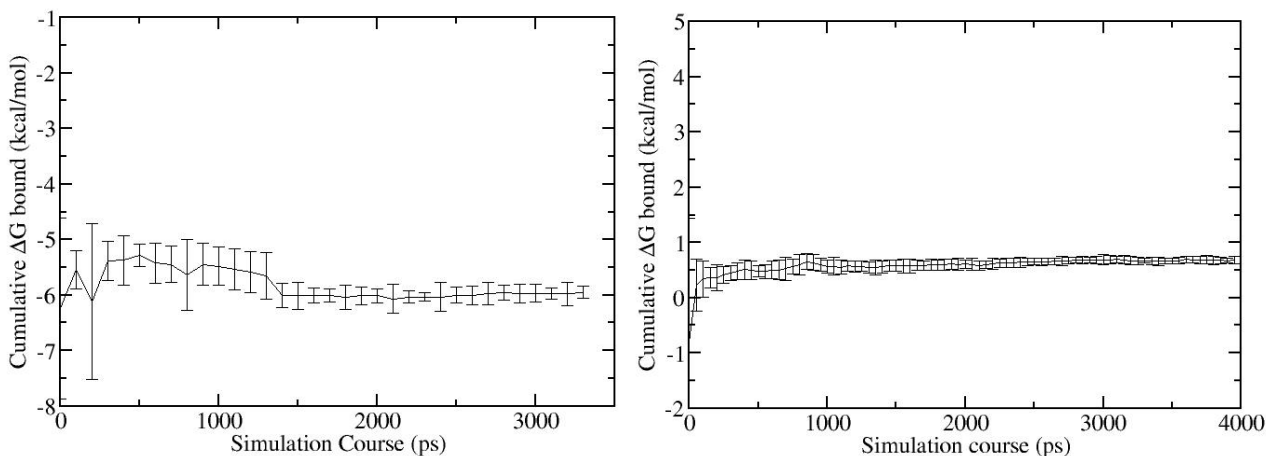
Σχήμα 14.9: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DMPC λιπιδική διπλοστιβάδα πρωτεΐνη, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 4→3 (αριστερά) και 5→4 (δεξιά).



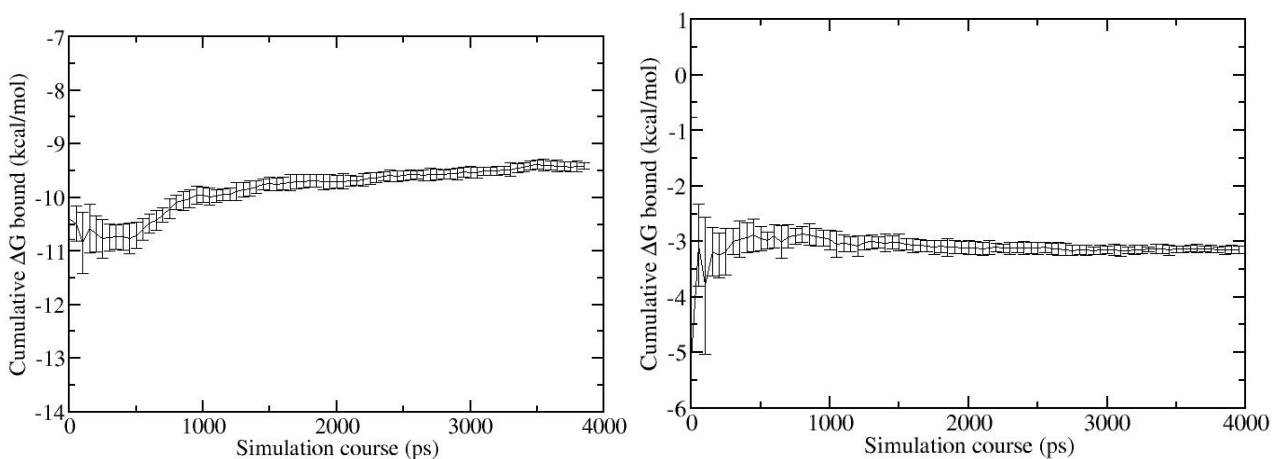
Σχήμα 14.10: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DMPC λιπιδική διπλοστιβάδα πρωτεΐνη, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 6→5 (αριστερά) και 8→7 (δεξιά).



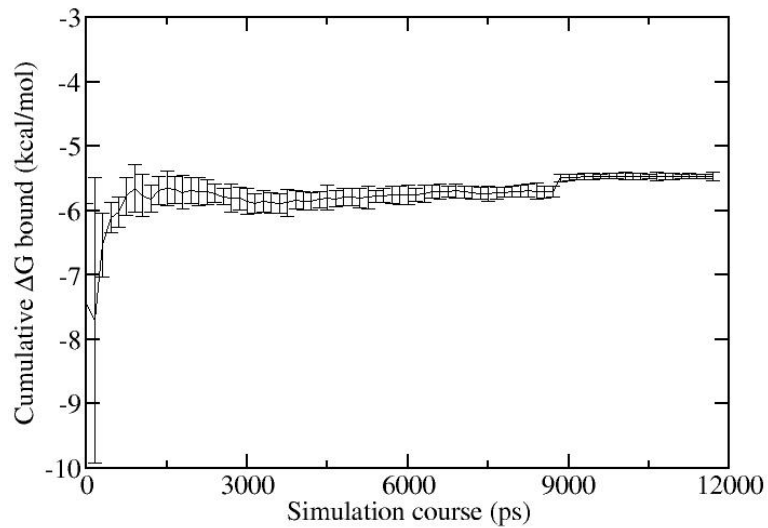
Σχήμα 14.11: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DMPC λιπιδική διπλοστιβάδα πρωτεΐνη, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 9→7 (αριστερά) και 10→9 (δεξιά).



Σχήμα 14.12: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DMPC λιπιδική διπλοστιβάδα πρωτεΐνη, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 11→7 (αριστερά) και 12→1 (δεξιά).



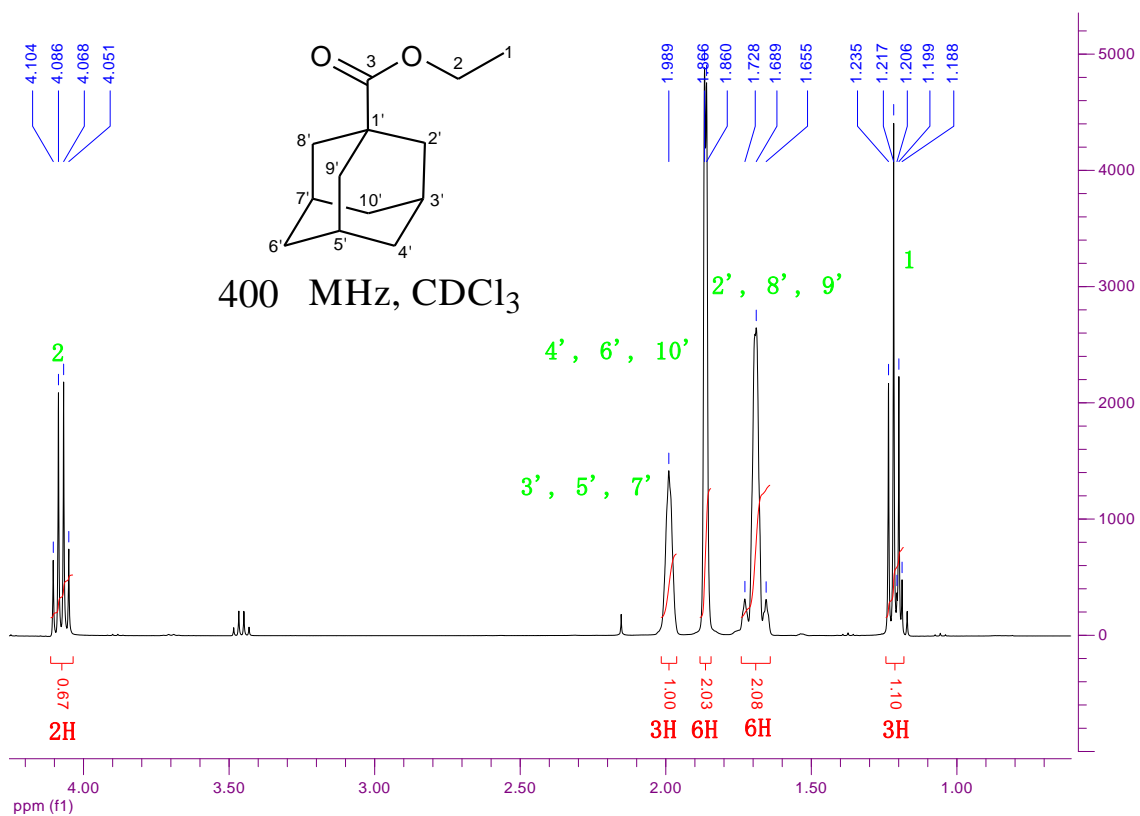
Εικόνα 14.13: Αθροιστικές διαφορές ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τους υπολογισμούς FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DMPC λιπιδική διπλοστιβάδα πρωτεΐνη, που αντιστοιχούν στις μεταλλάξεις 13→7 (αριστερά) και 14→7 (δεξιά).

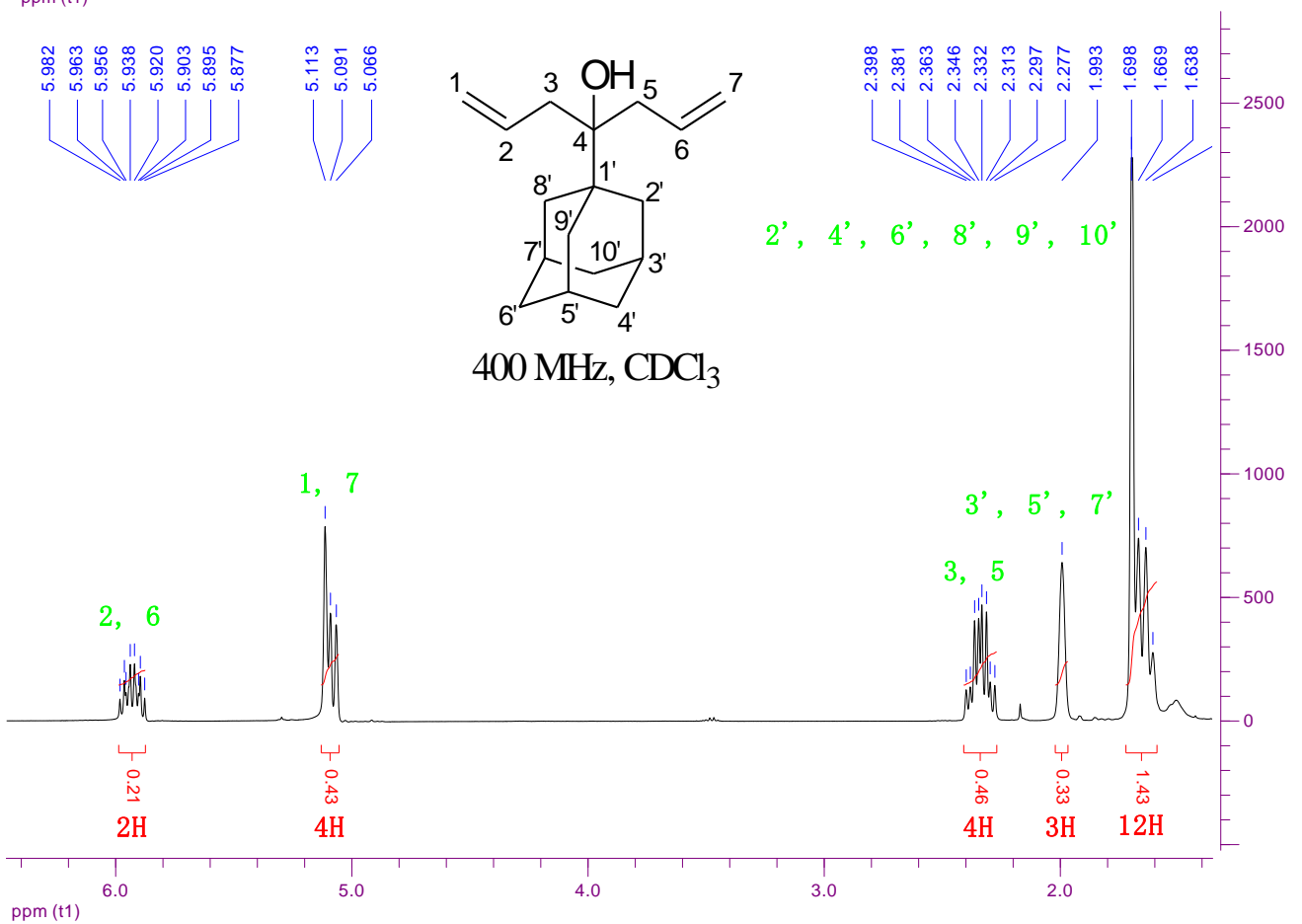
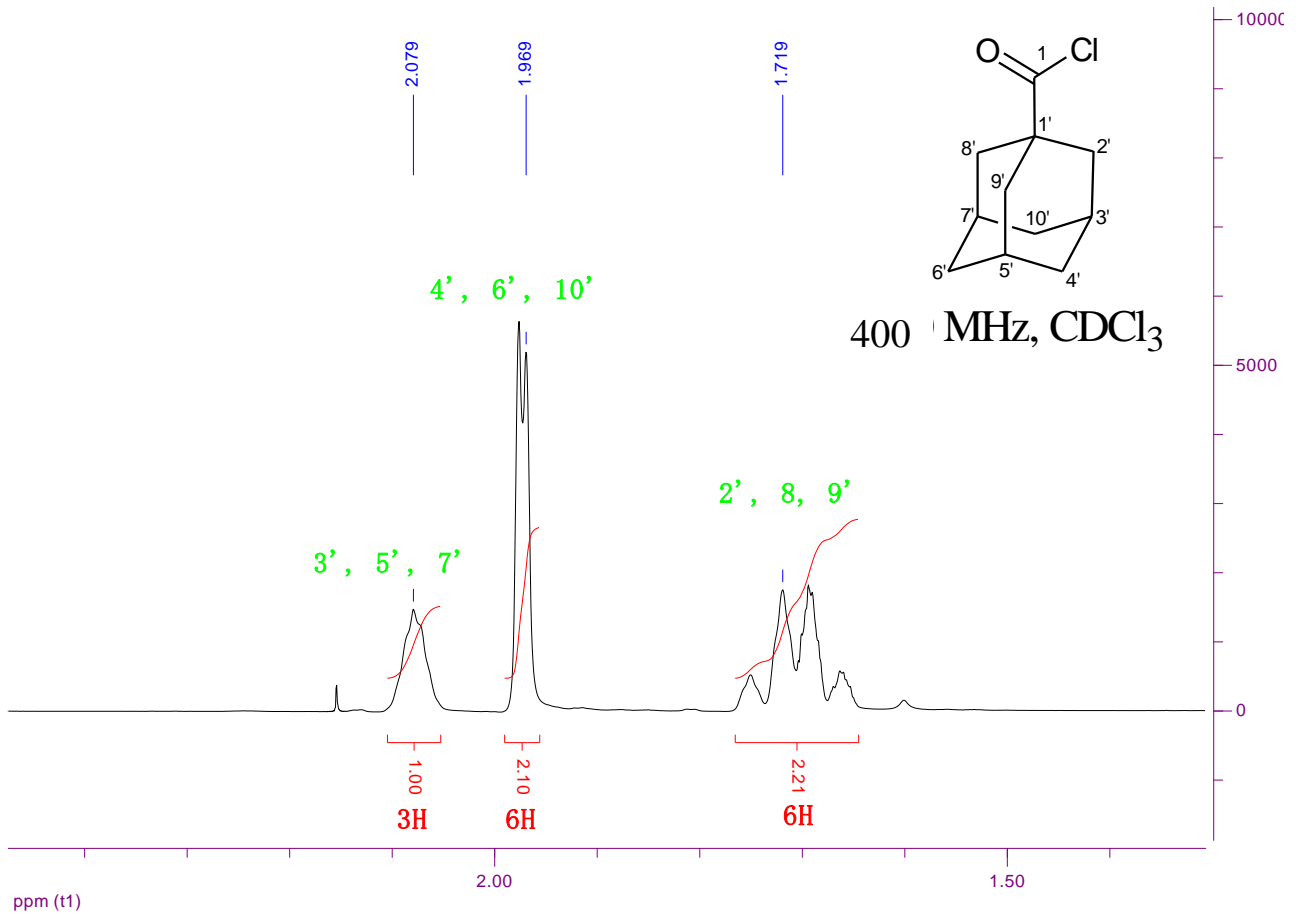


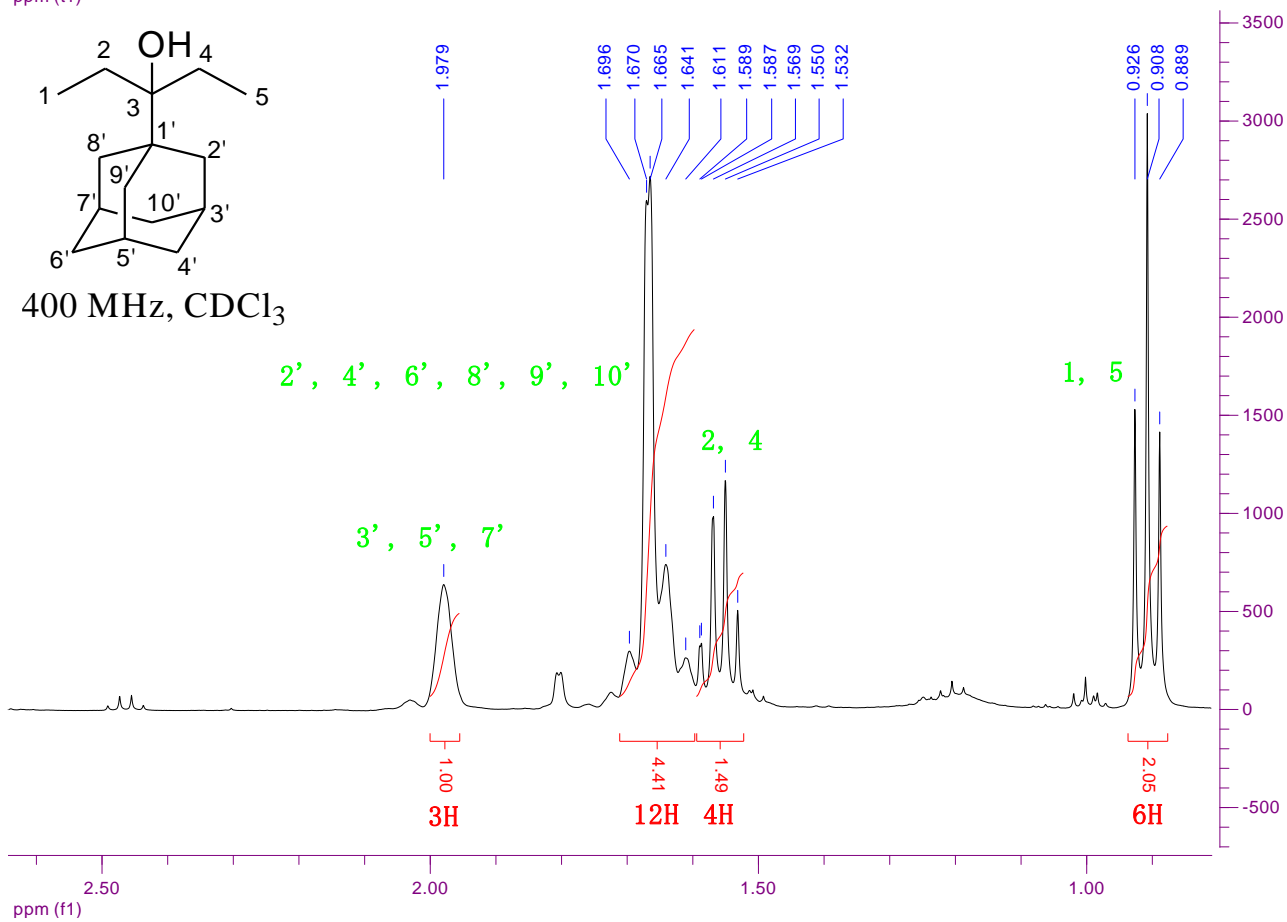
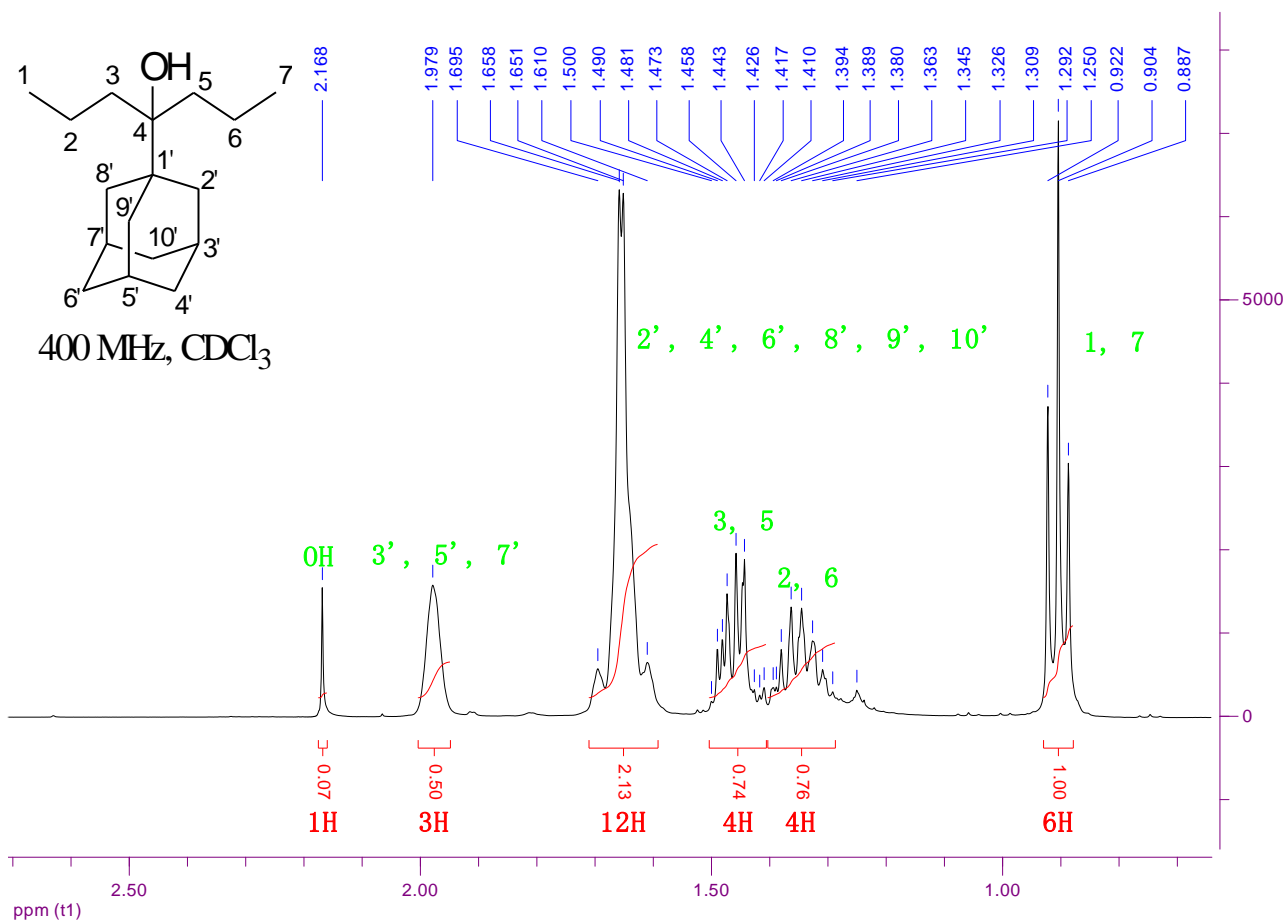
Σχήμα 14.14: Αθροιστική διαφορά ελεύθερης ενέργειας συναρτήσει του χρόνου για τον υπολογισμό FEP/MD στην ενσωματωμένη σε DMPC λιπιδική διπλοστιβάδα πρωτεΐνη, που αντιστοιχεί στη μετάλλαξη 15→2

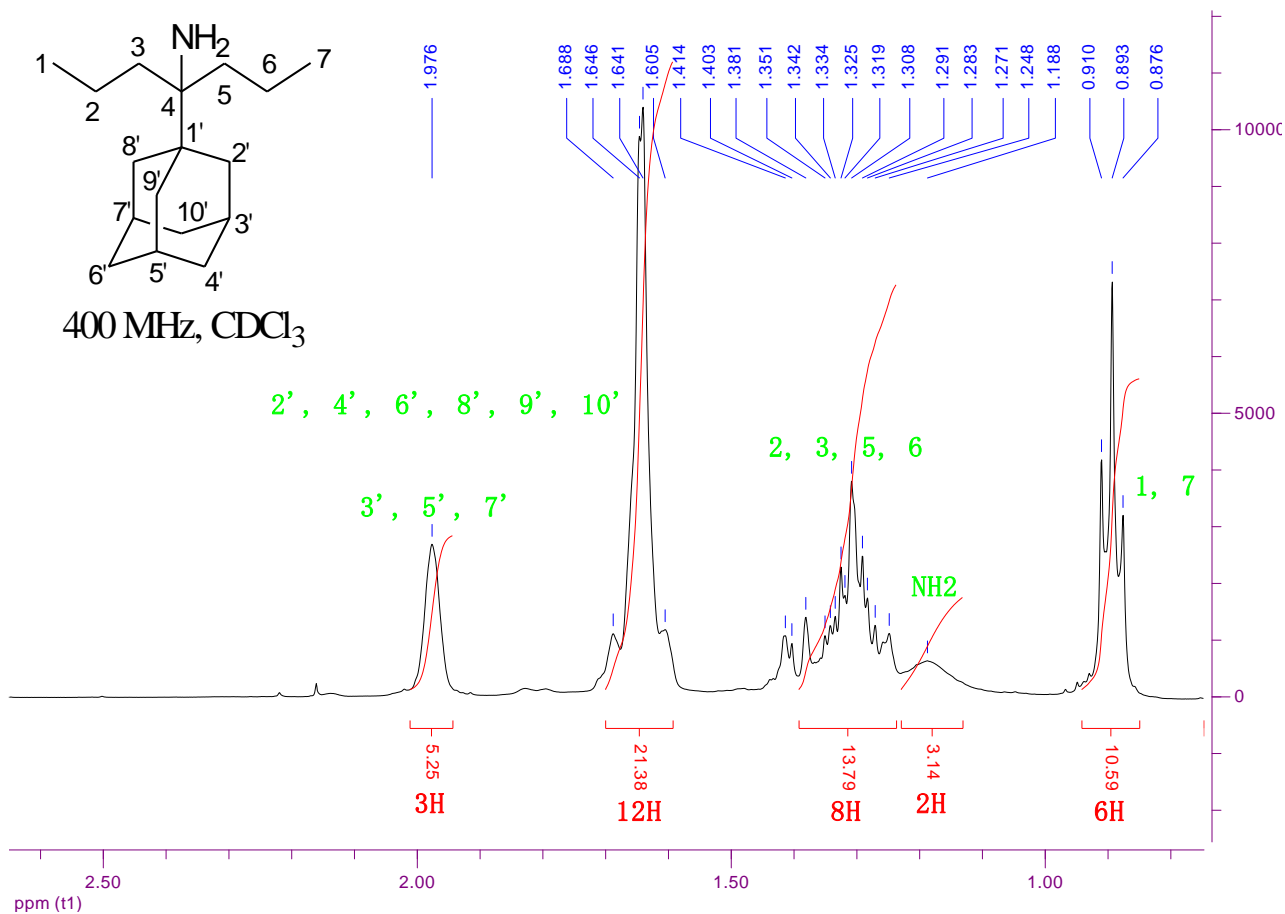
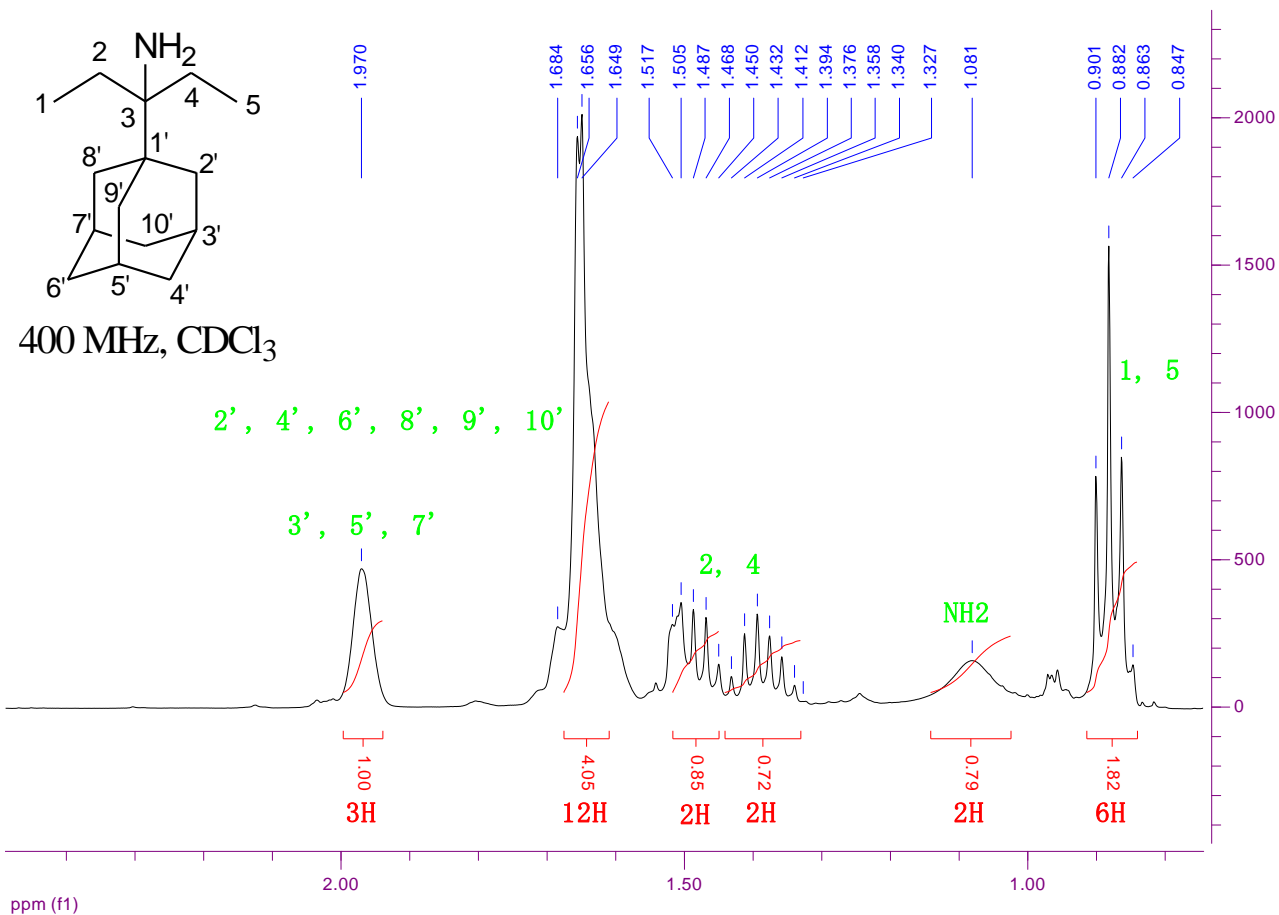
14.4 Παράρτημα Δ: Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) των νέων αμινοαδαμαντανικών ενώσεων που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία και των ενδιάμεσων αυτών

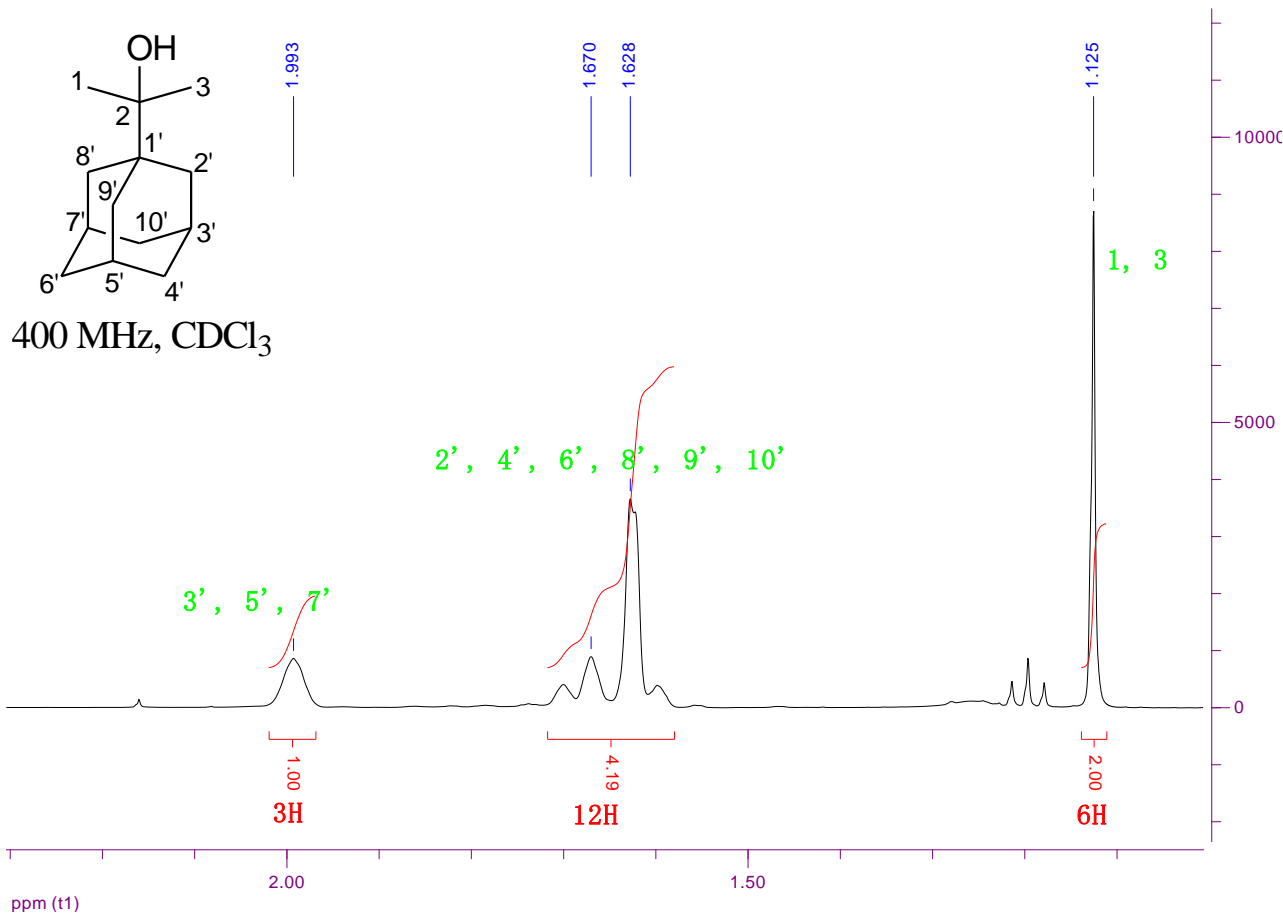
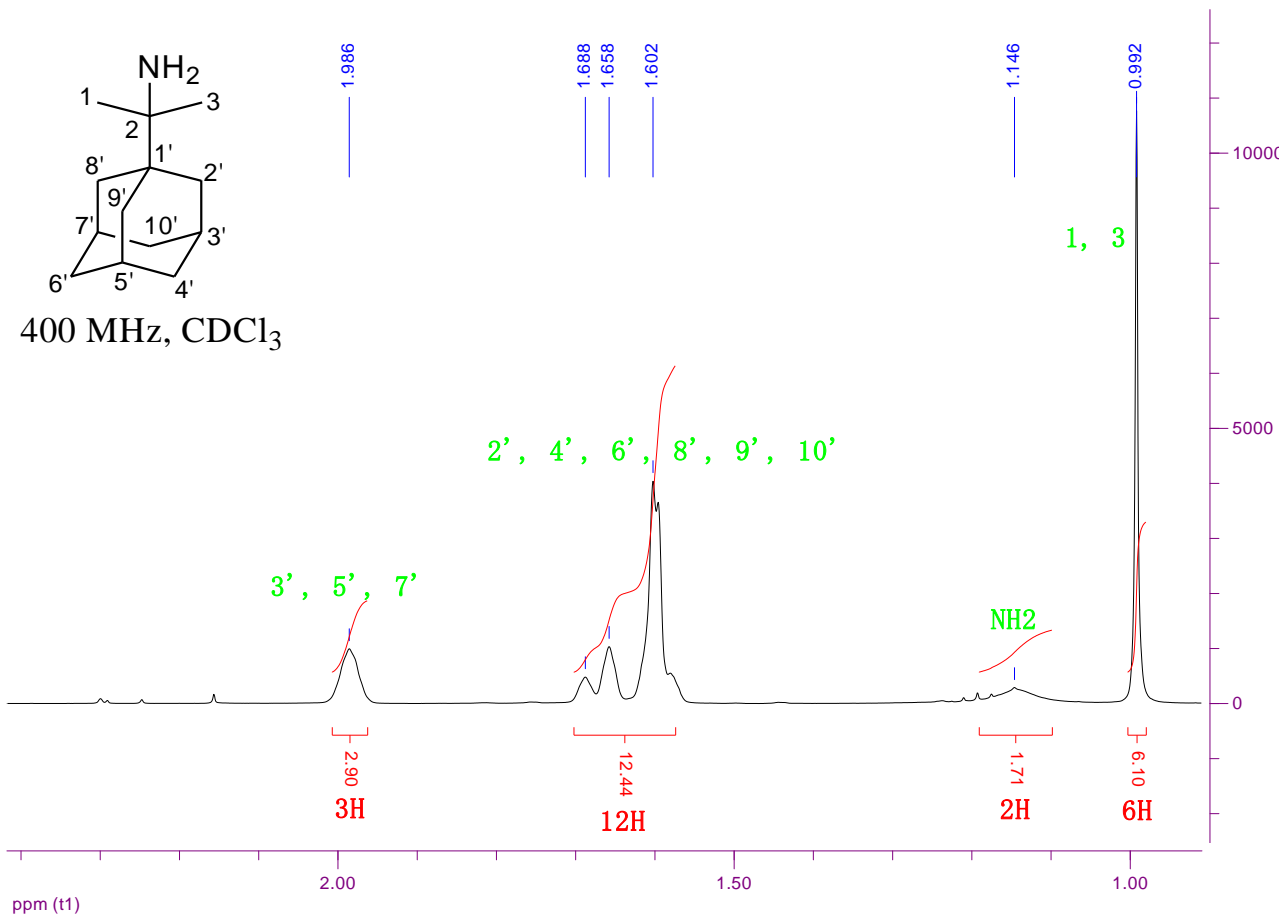
14.4.1 Φάσματα ^1H NMR

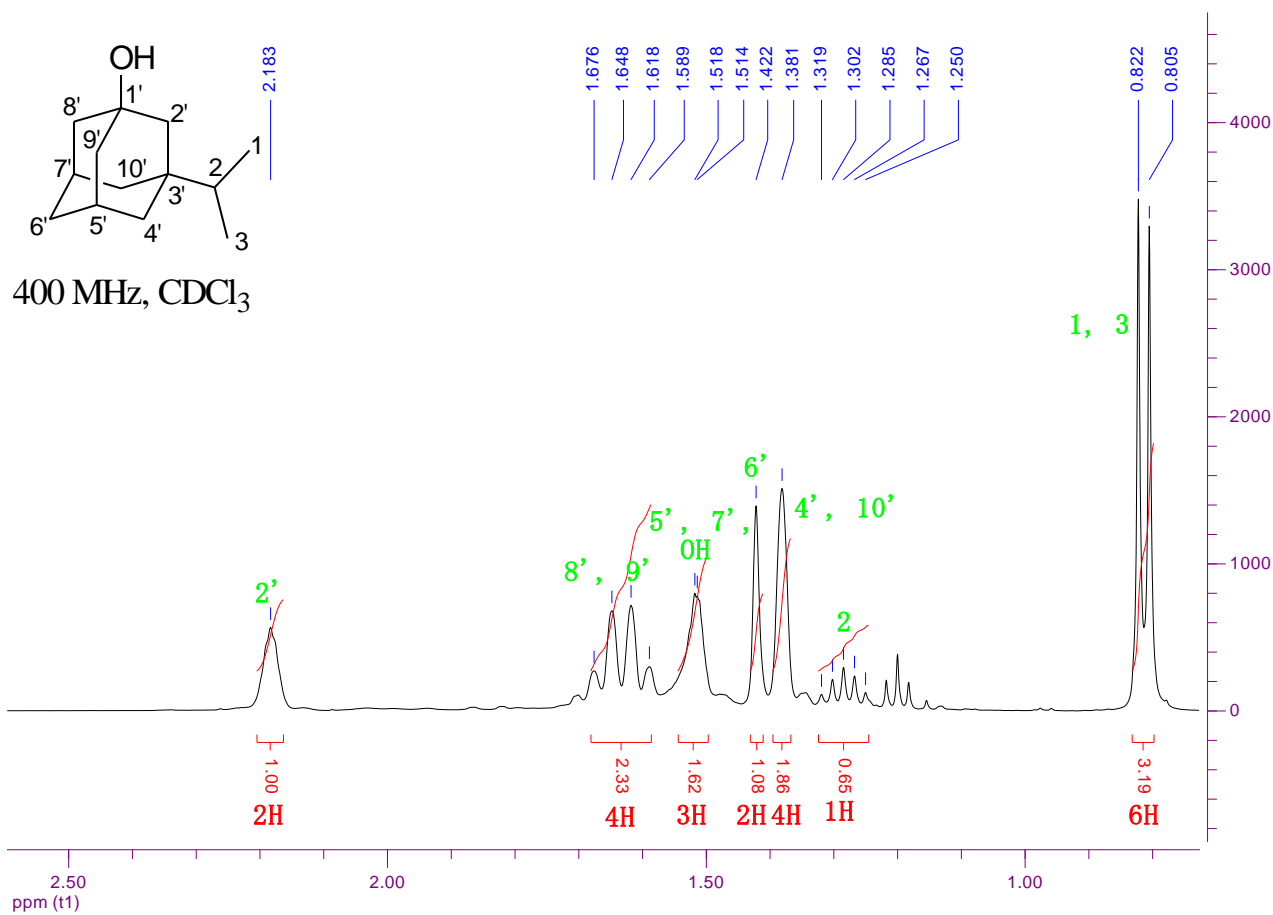
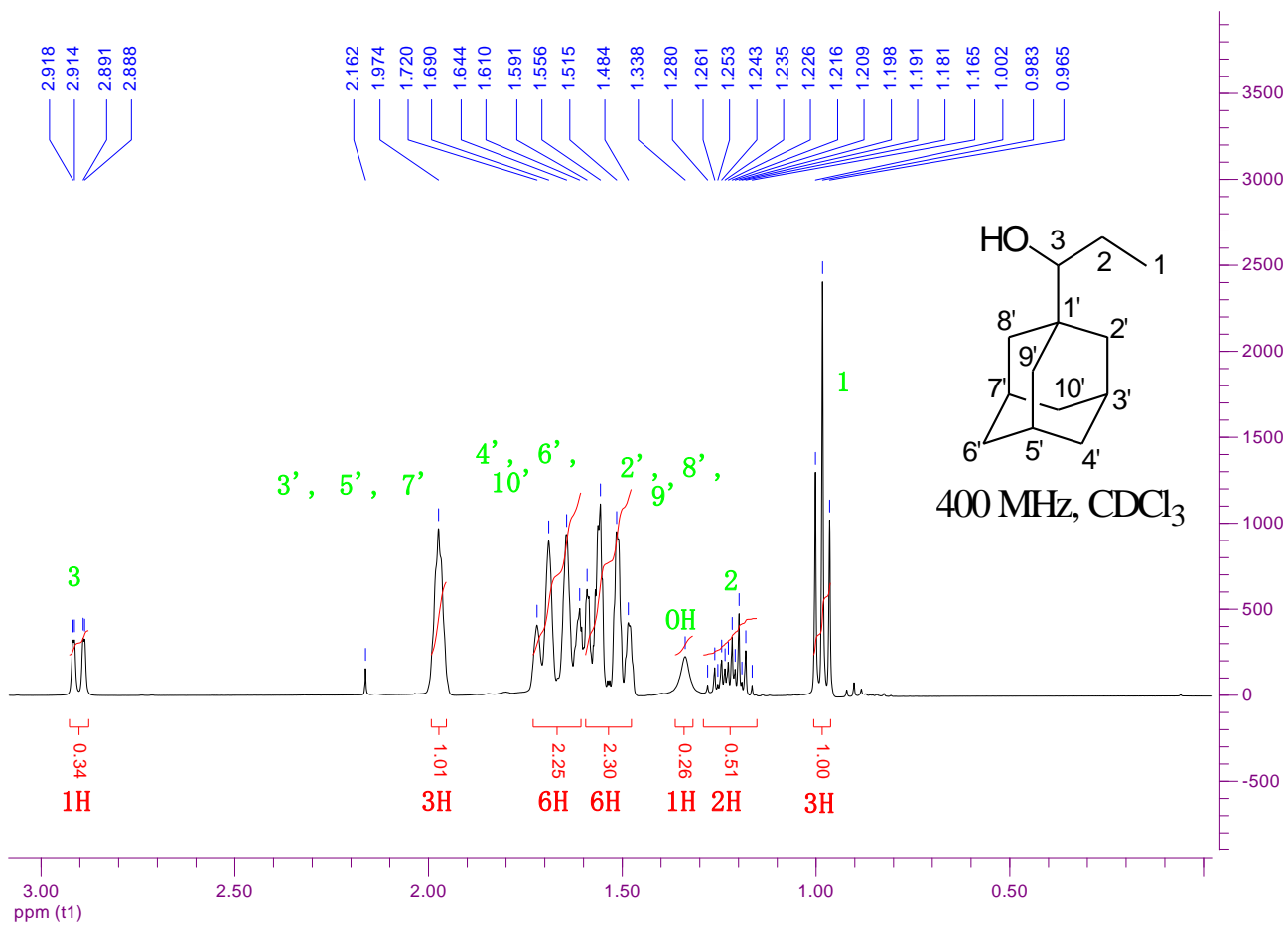


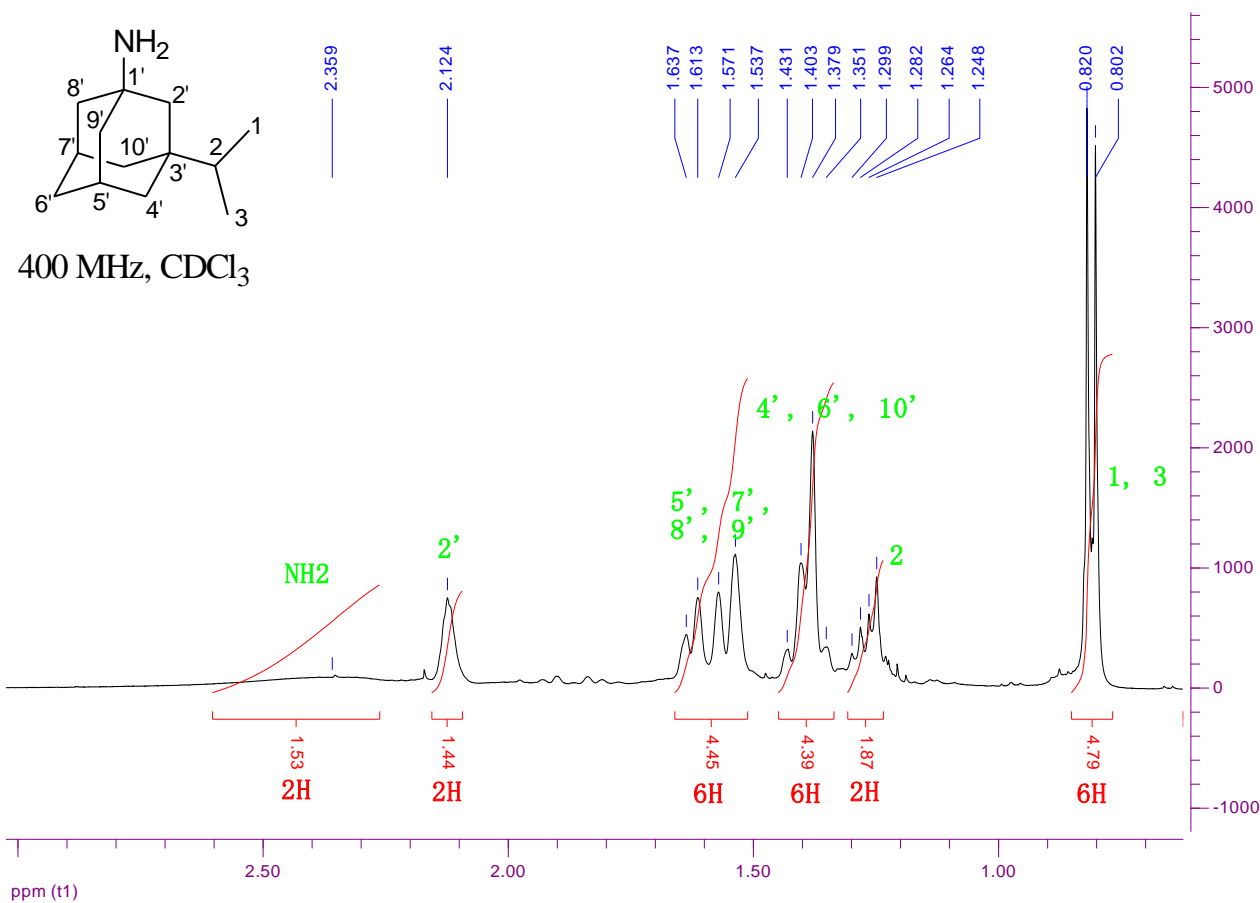
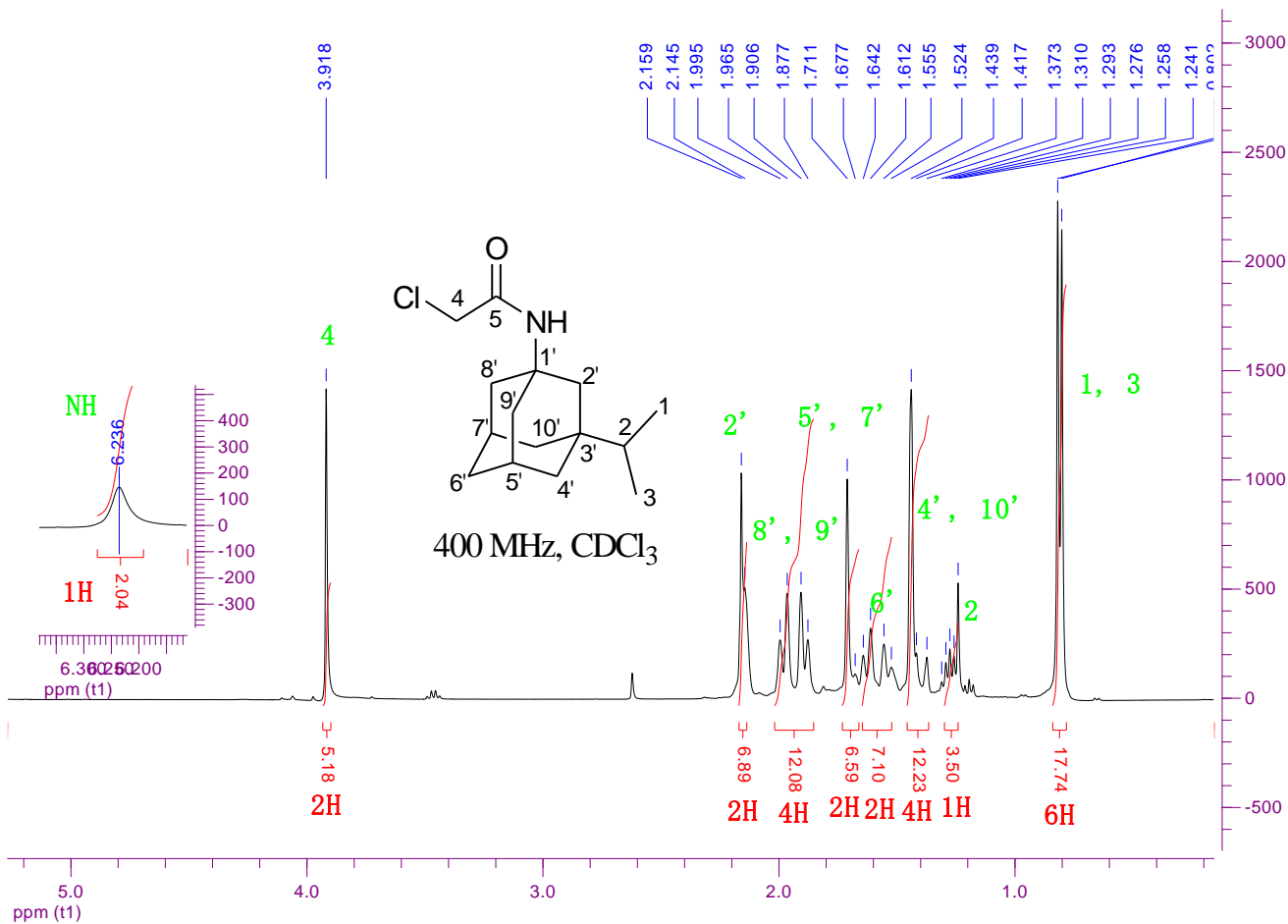


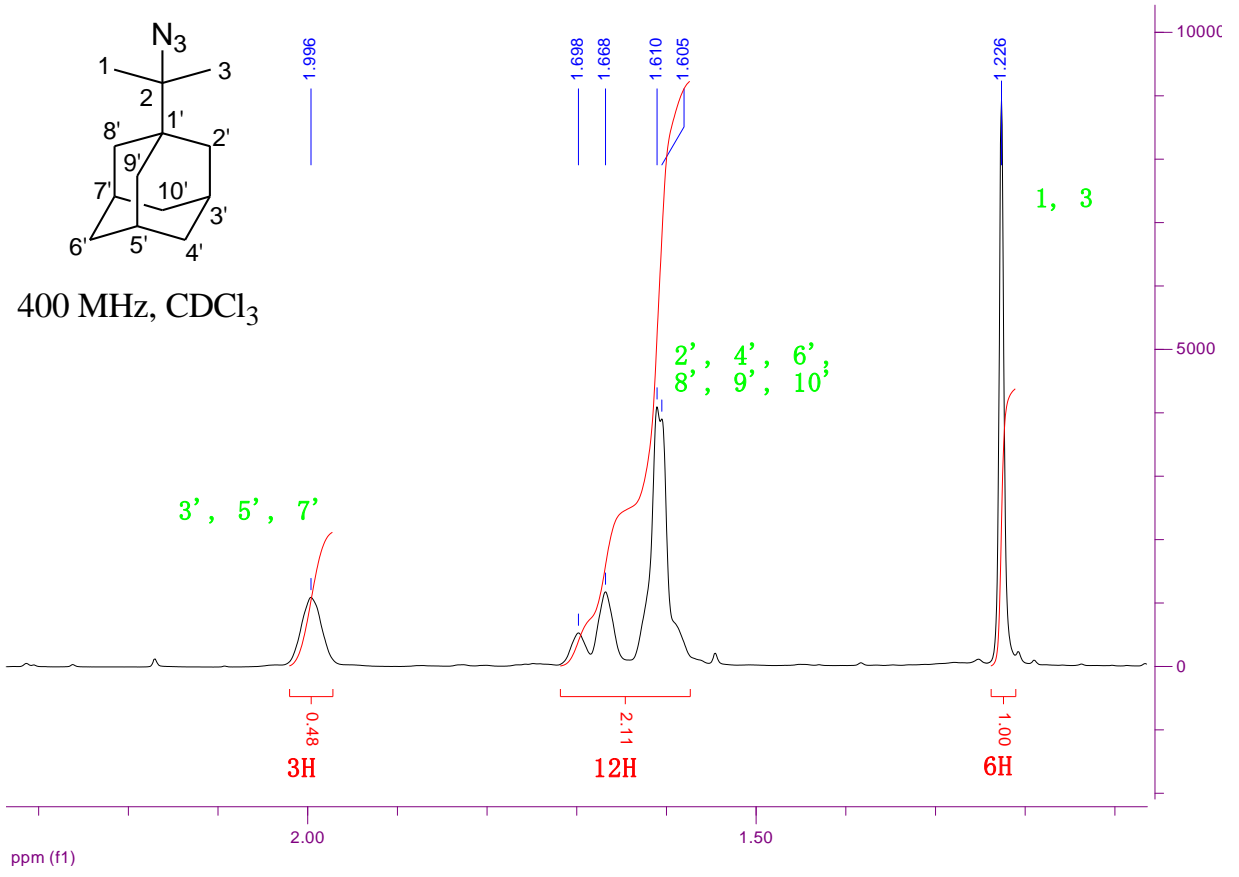




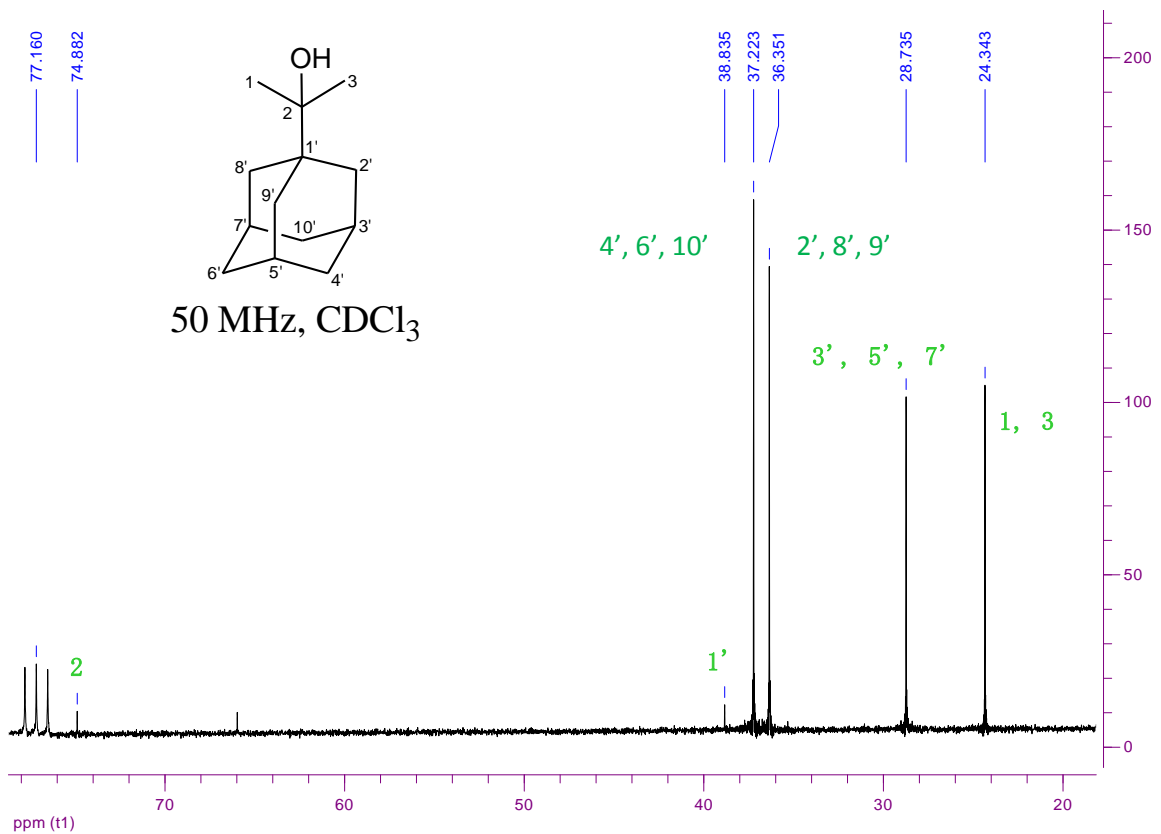
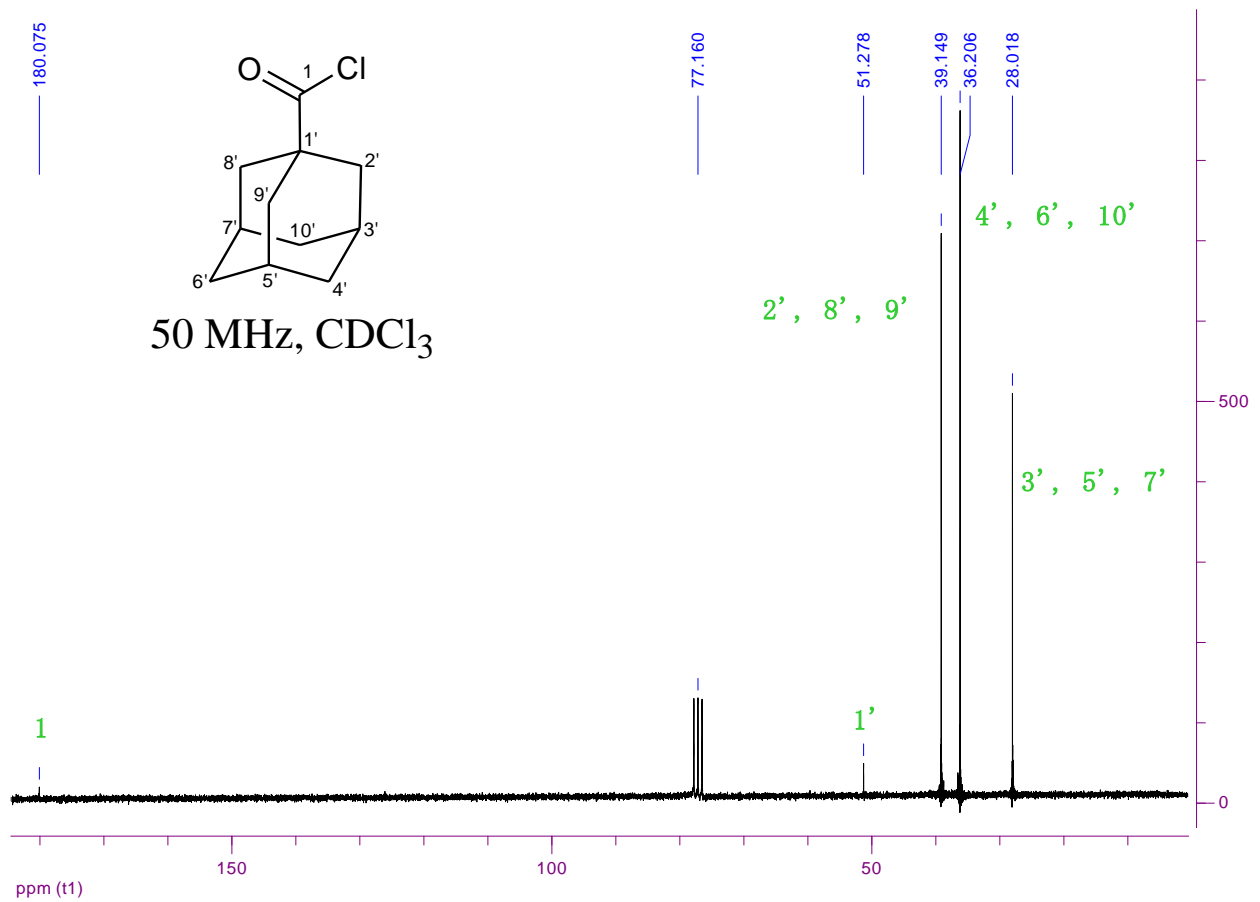


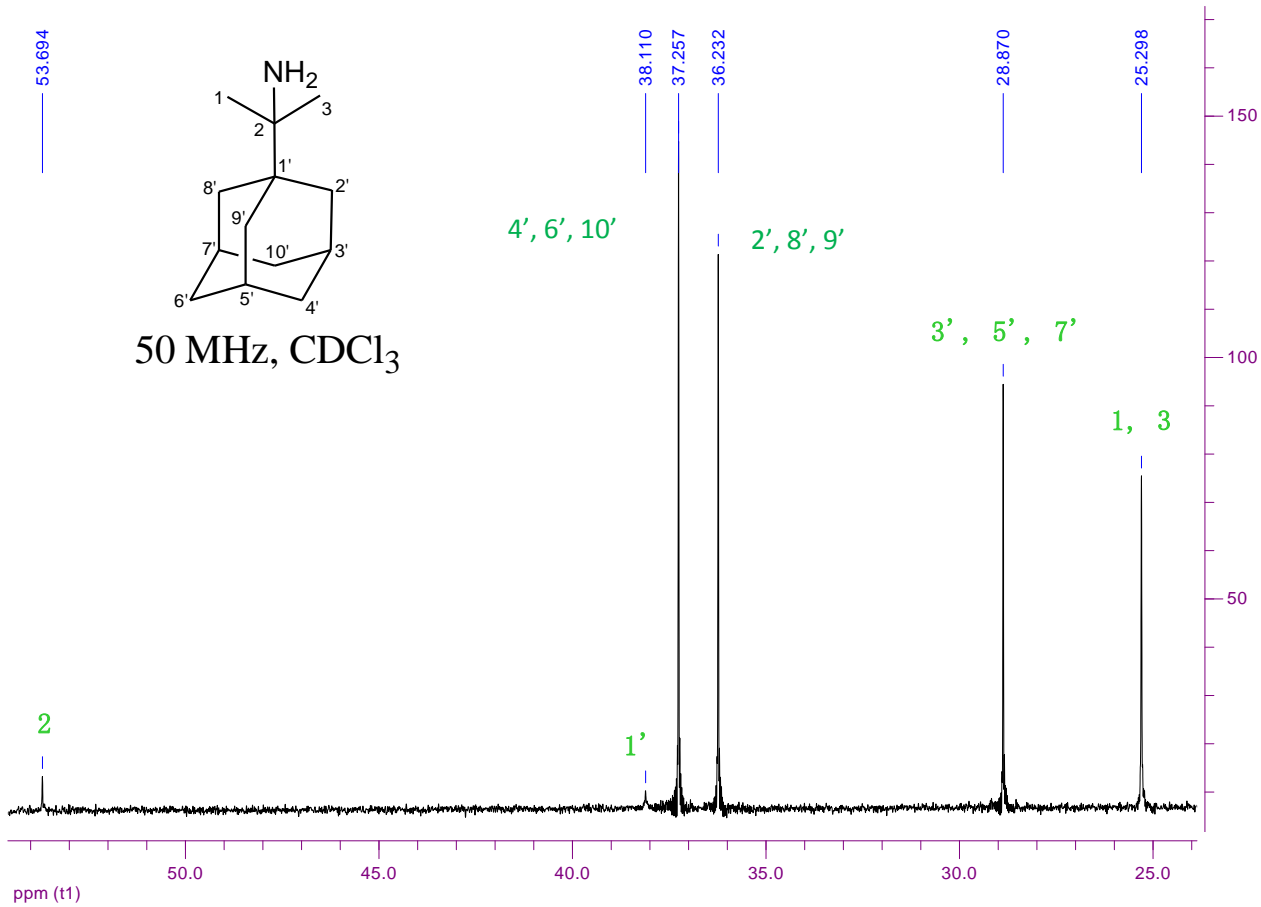
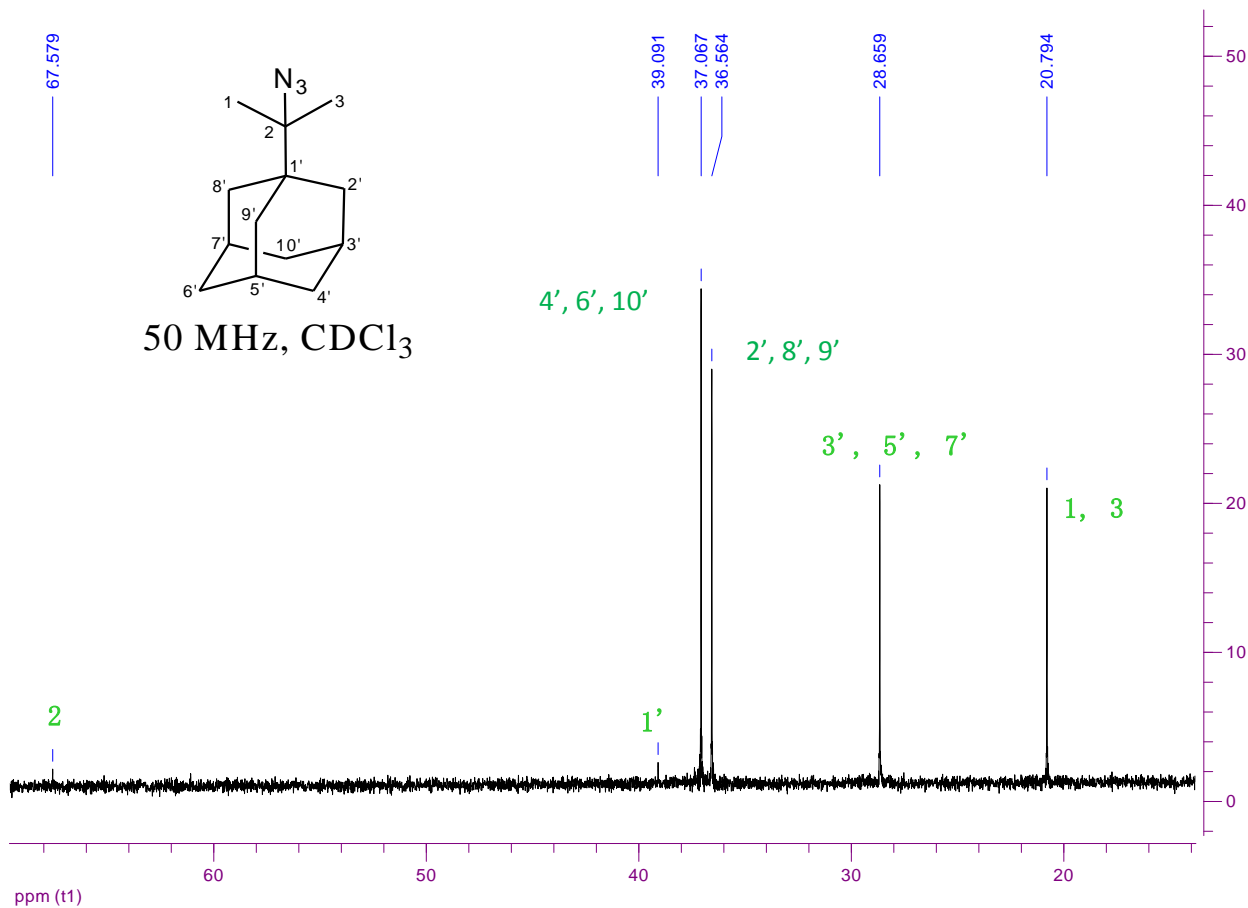


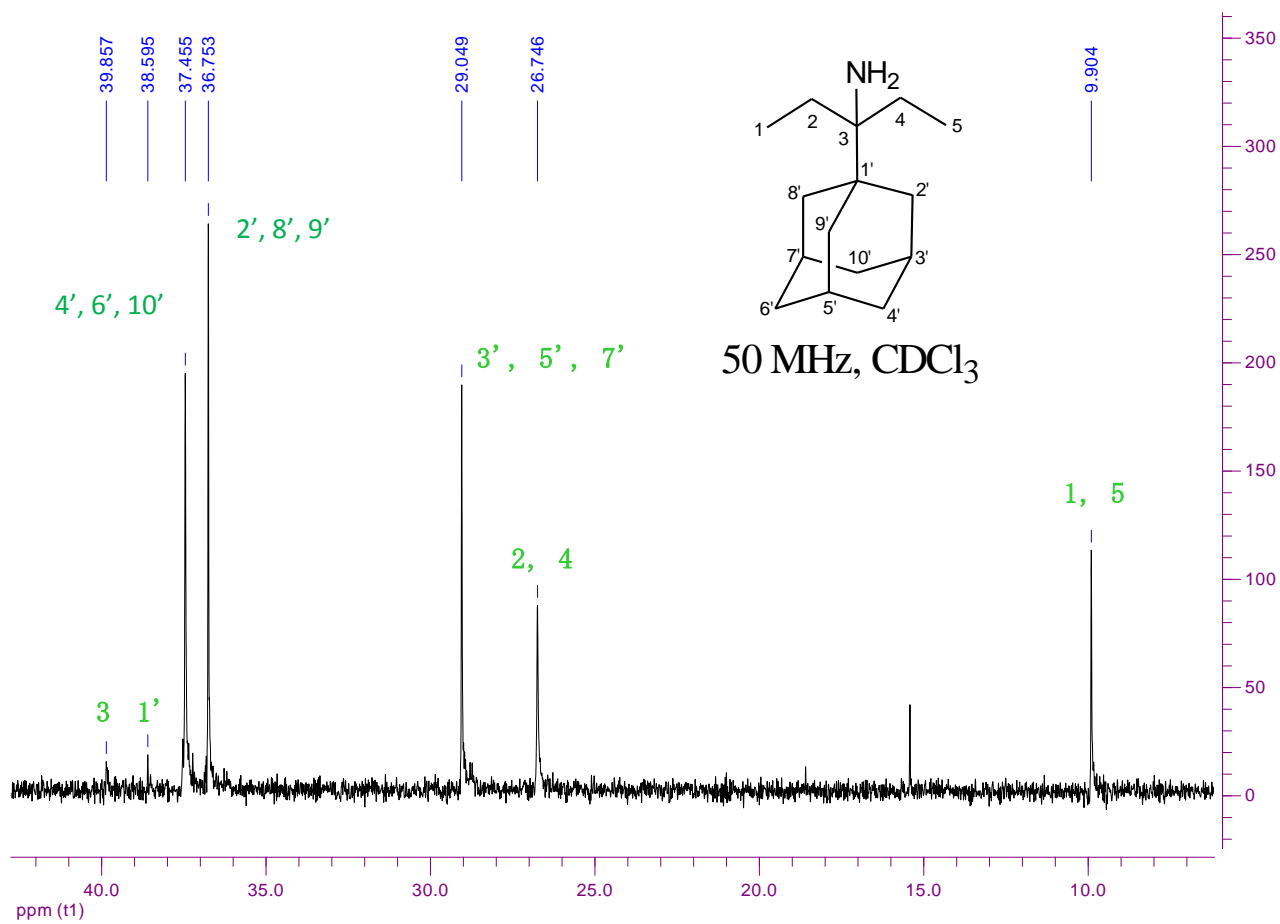
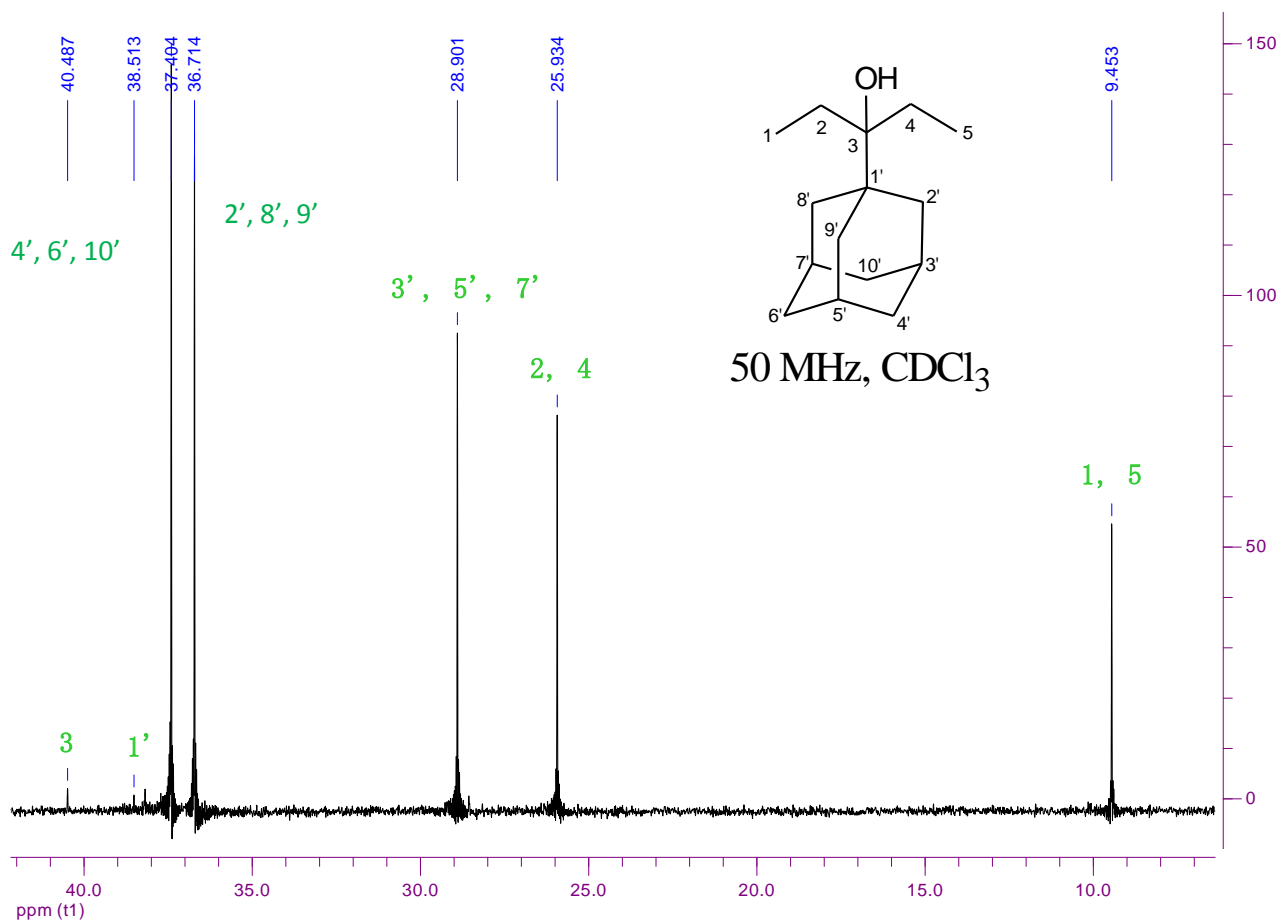


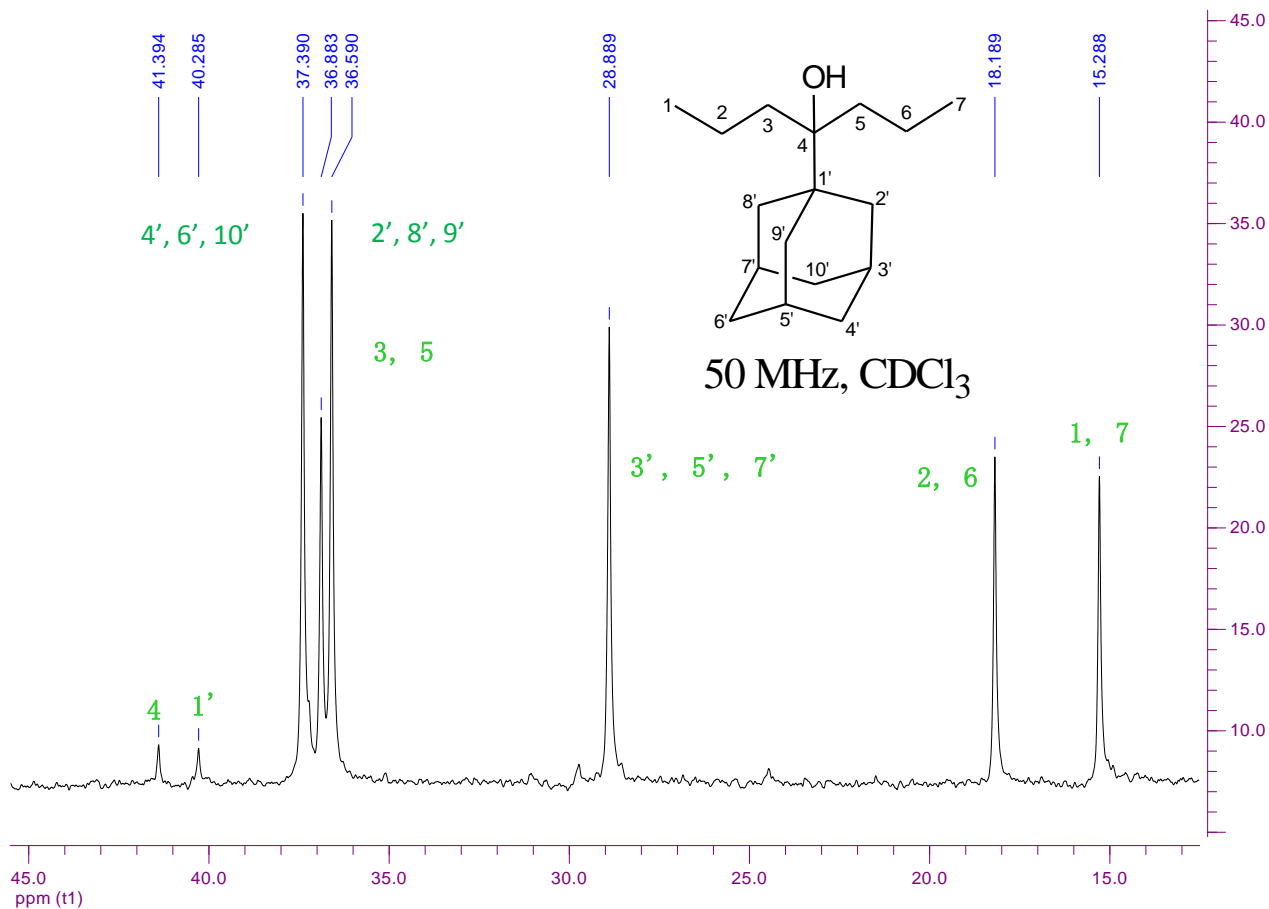
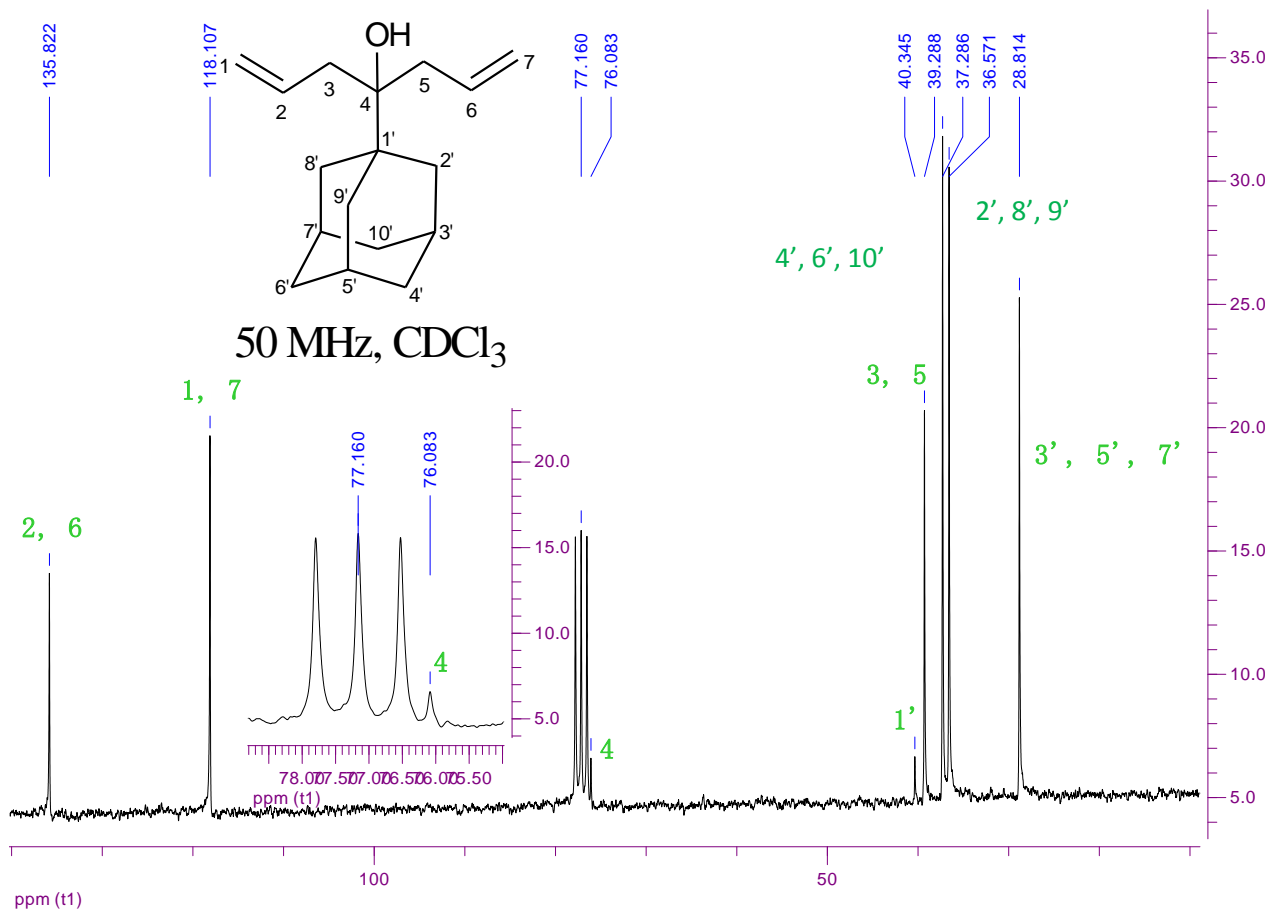


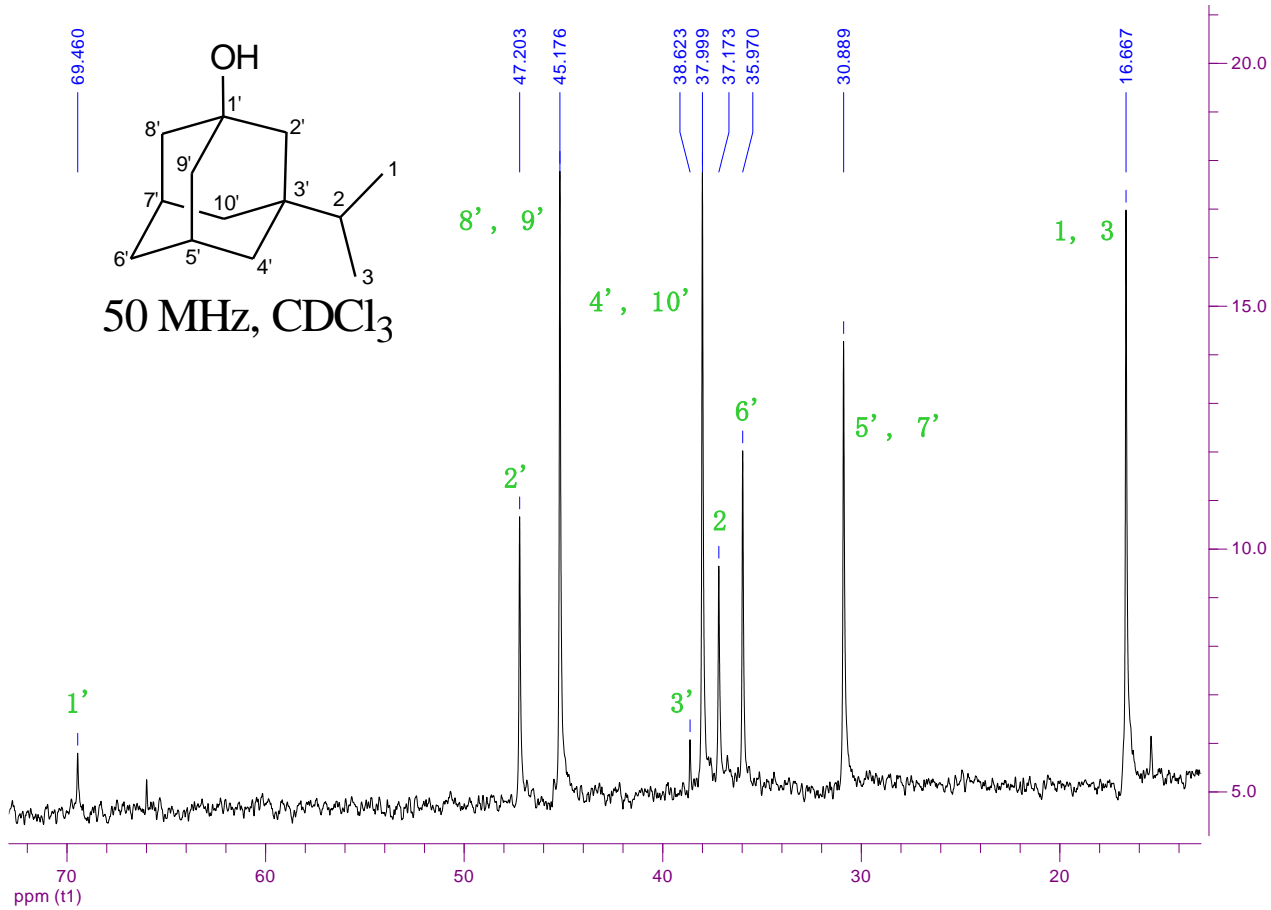
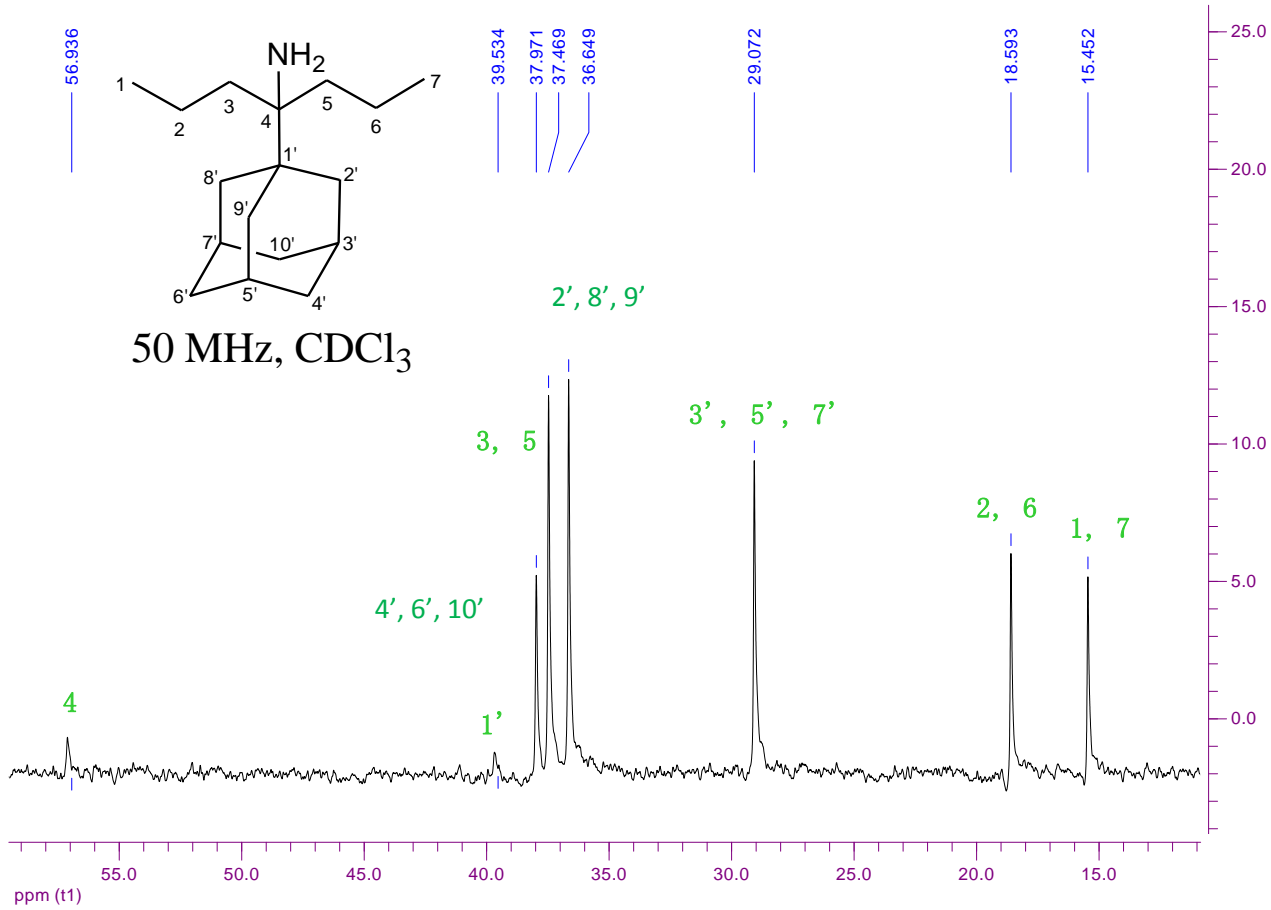
14.4.2 Φάσματα ^{13}C NMR

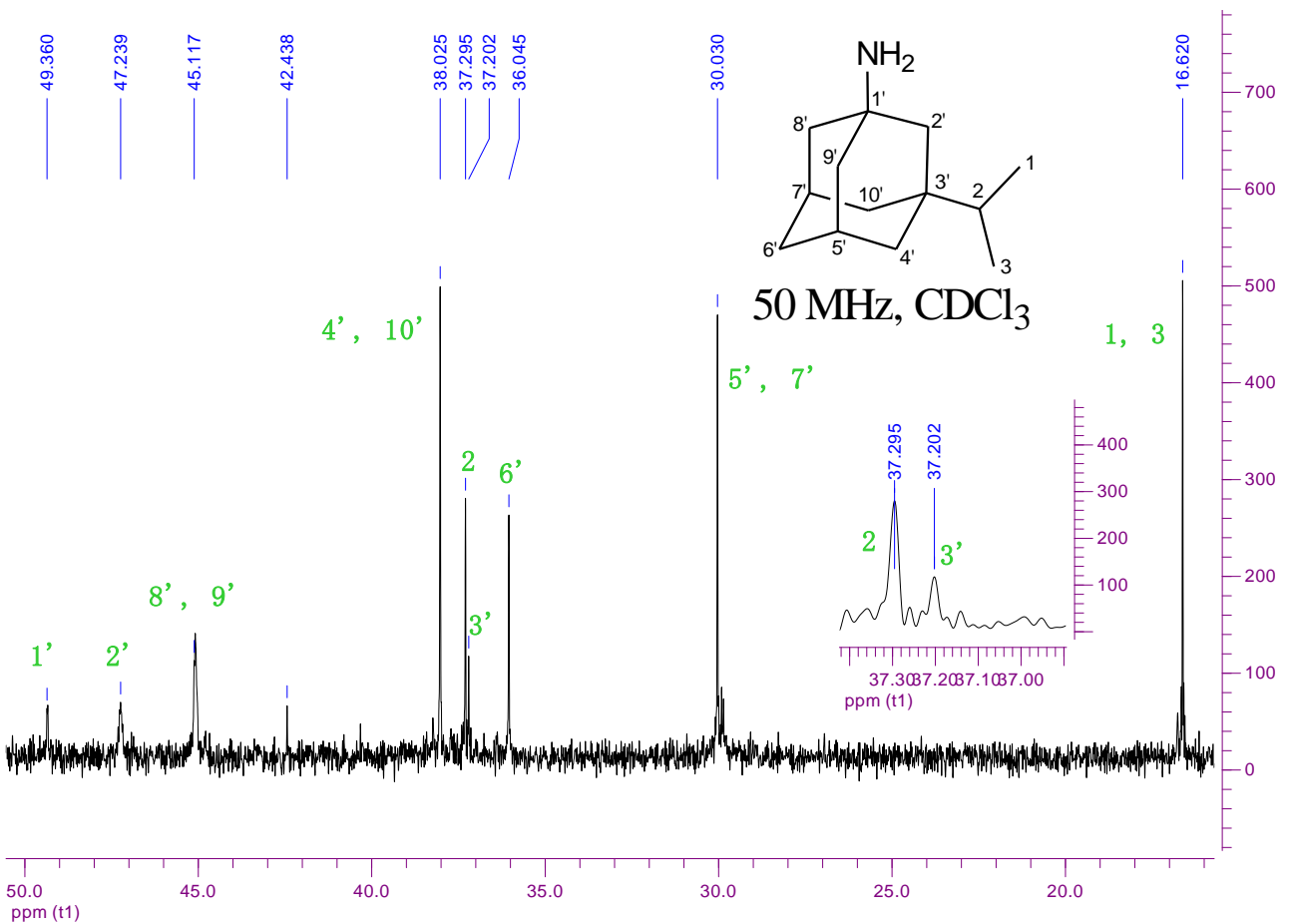
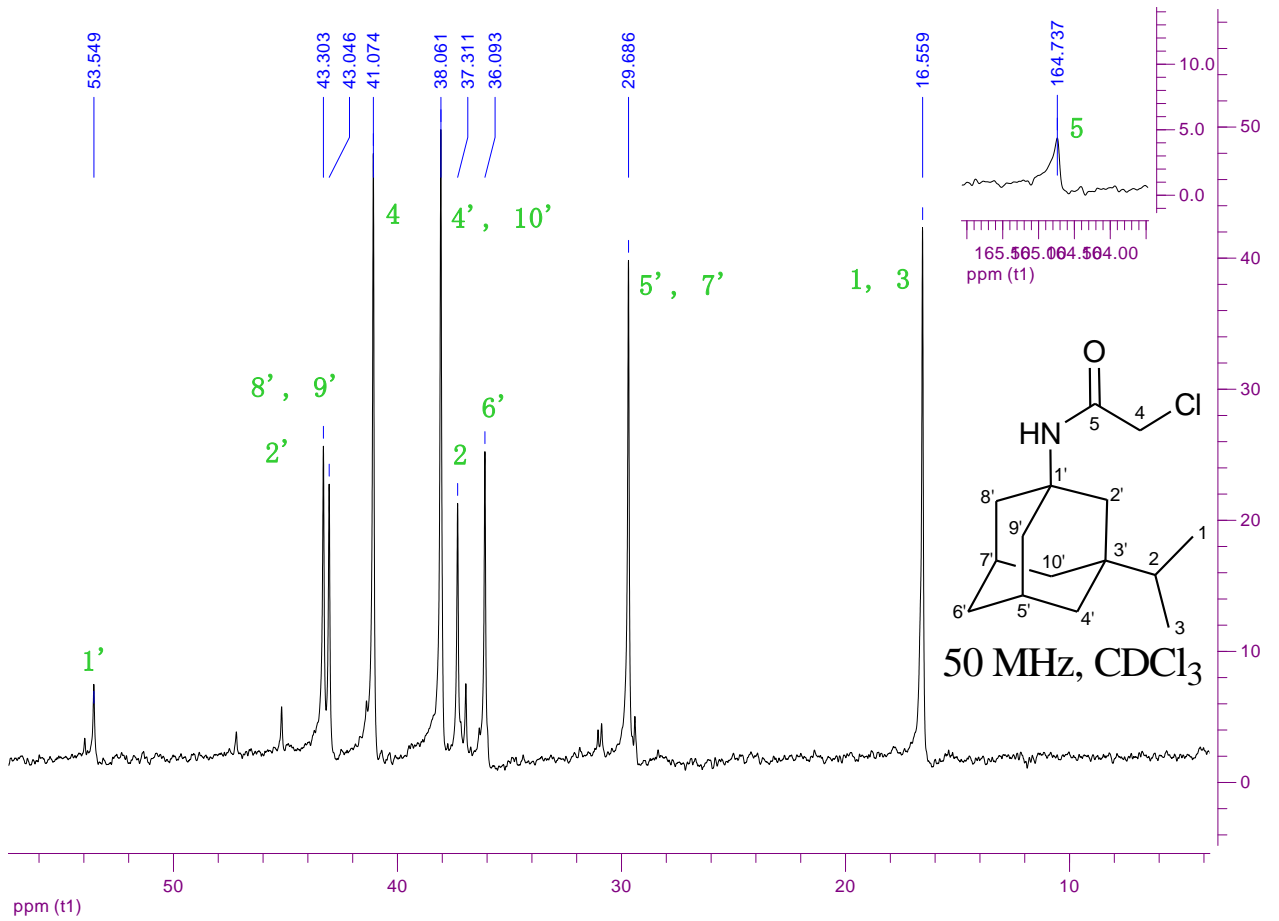


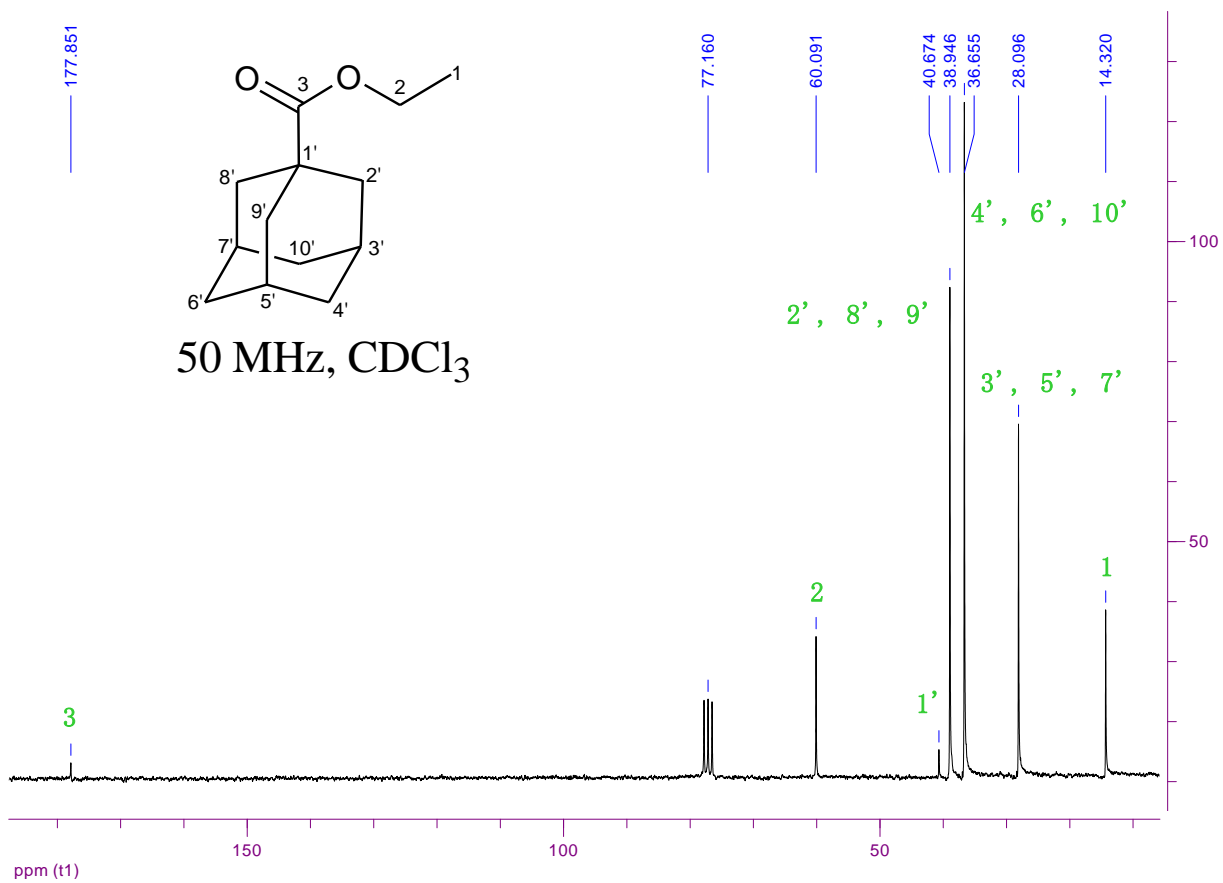
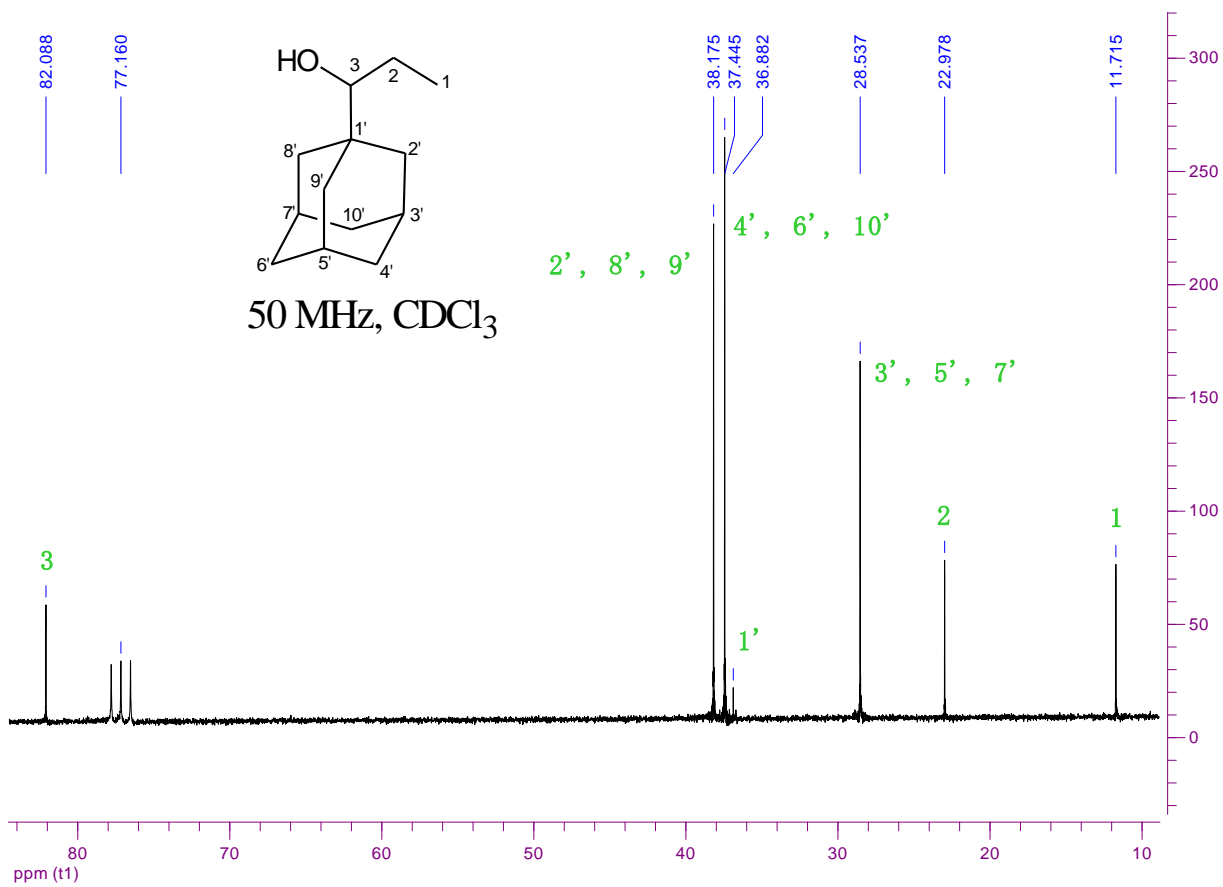


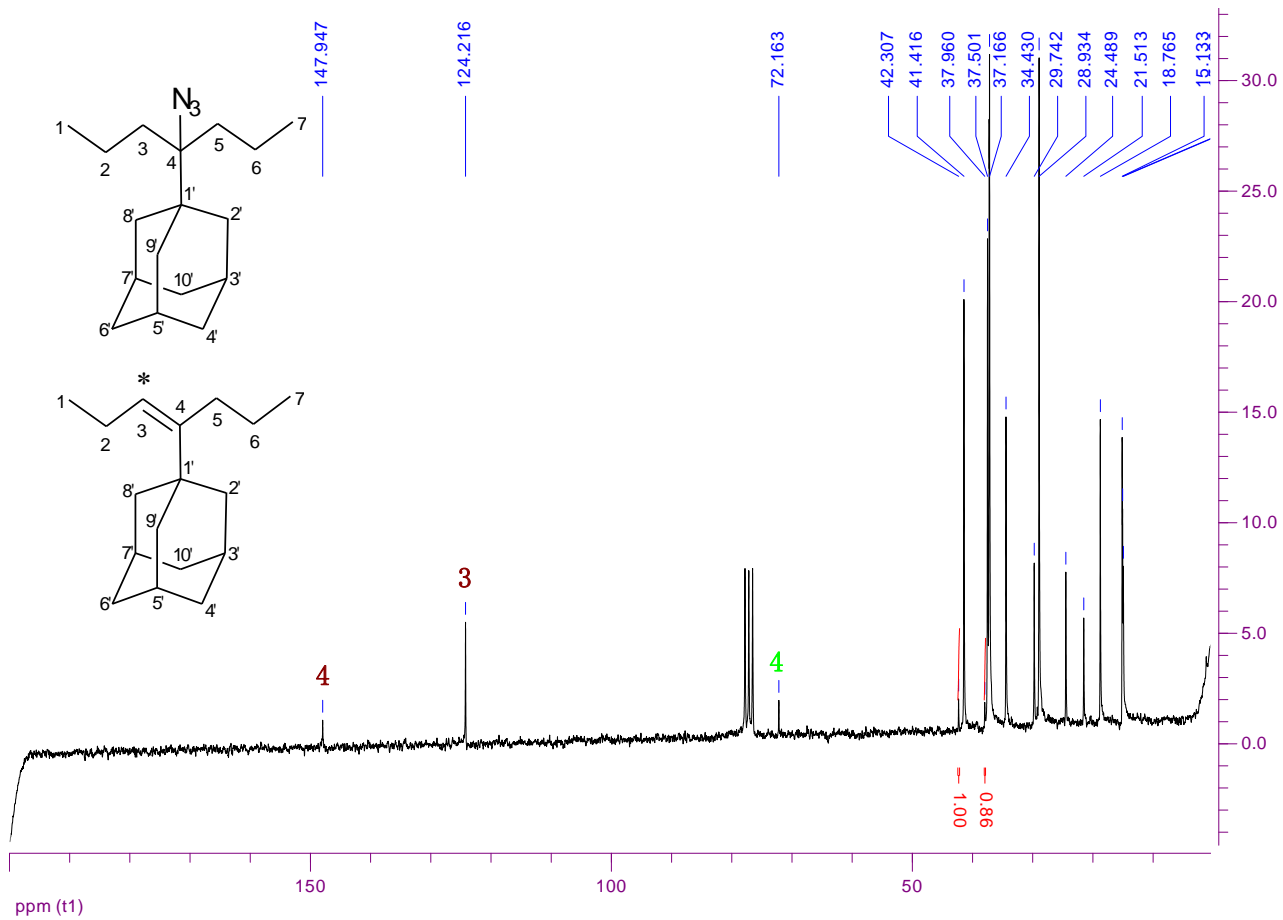












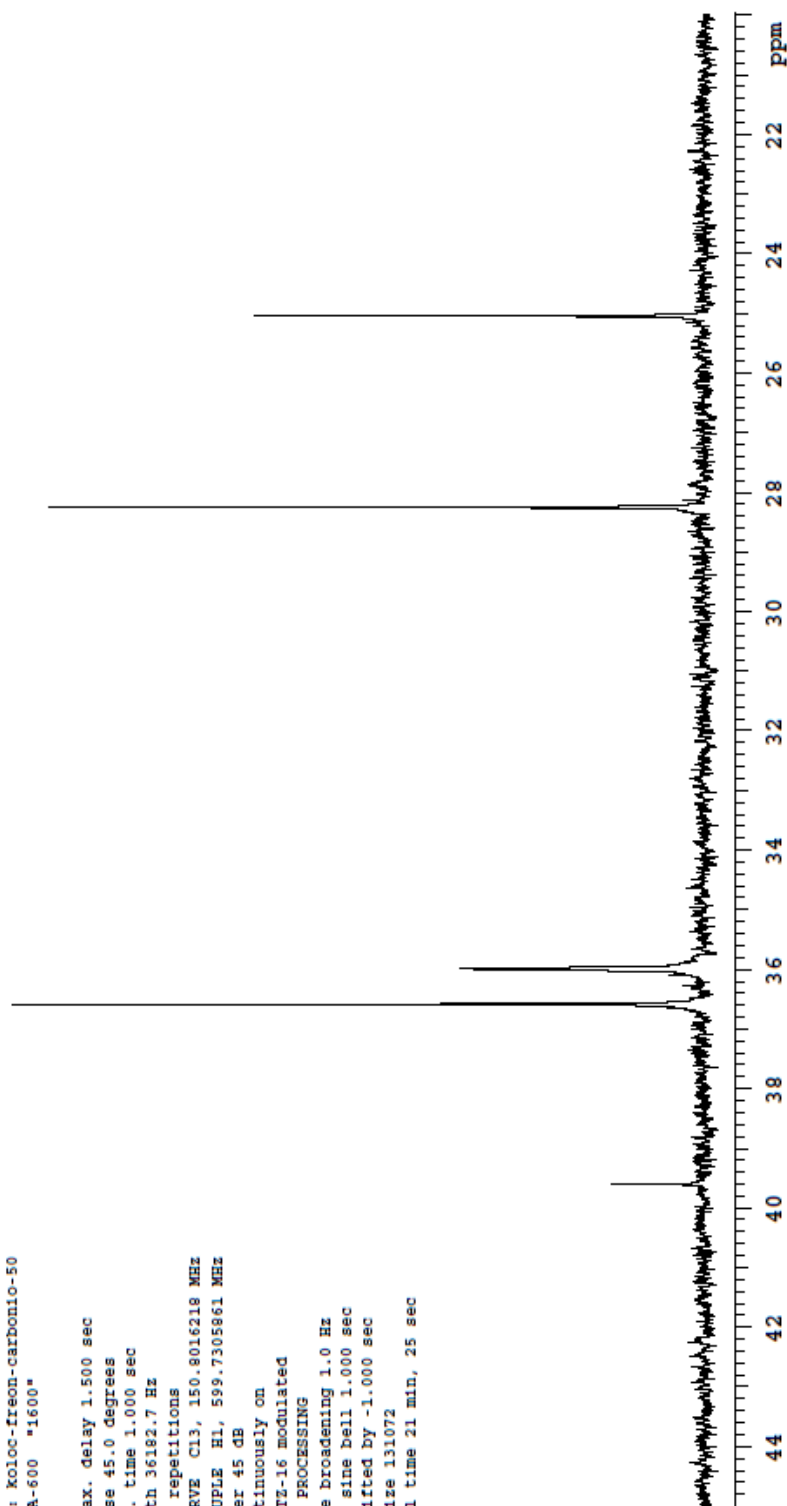
14.5 Παράρτημα Ε: Φάσματα Δυναμικού Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (DNMR)

NEV-DEP-EP-749
DMSO
Inova 600 Triple

Automation directory:

Solvent: cdcl3
Temp. -50.0 C / 223.2 K
Operator: iunazzi
File: Koloc-freon-carbonio-50
INOVA-600 "1600"

Relax. delay 1.500 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.000 sec
Width 36182.7 Hz
128 repetitions
OBSERVE C13, 150.8016218 MHZ
DECOUPLE H1, 599.7305861 MHZ
Power 45 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
Sf. sine bell 1.000 sec
Shifted by -1.000 sec
Ft size 131072
Total time 21 min, 25 sec



NEV-DEP-EP-749

DMSO

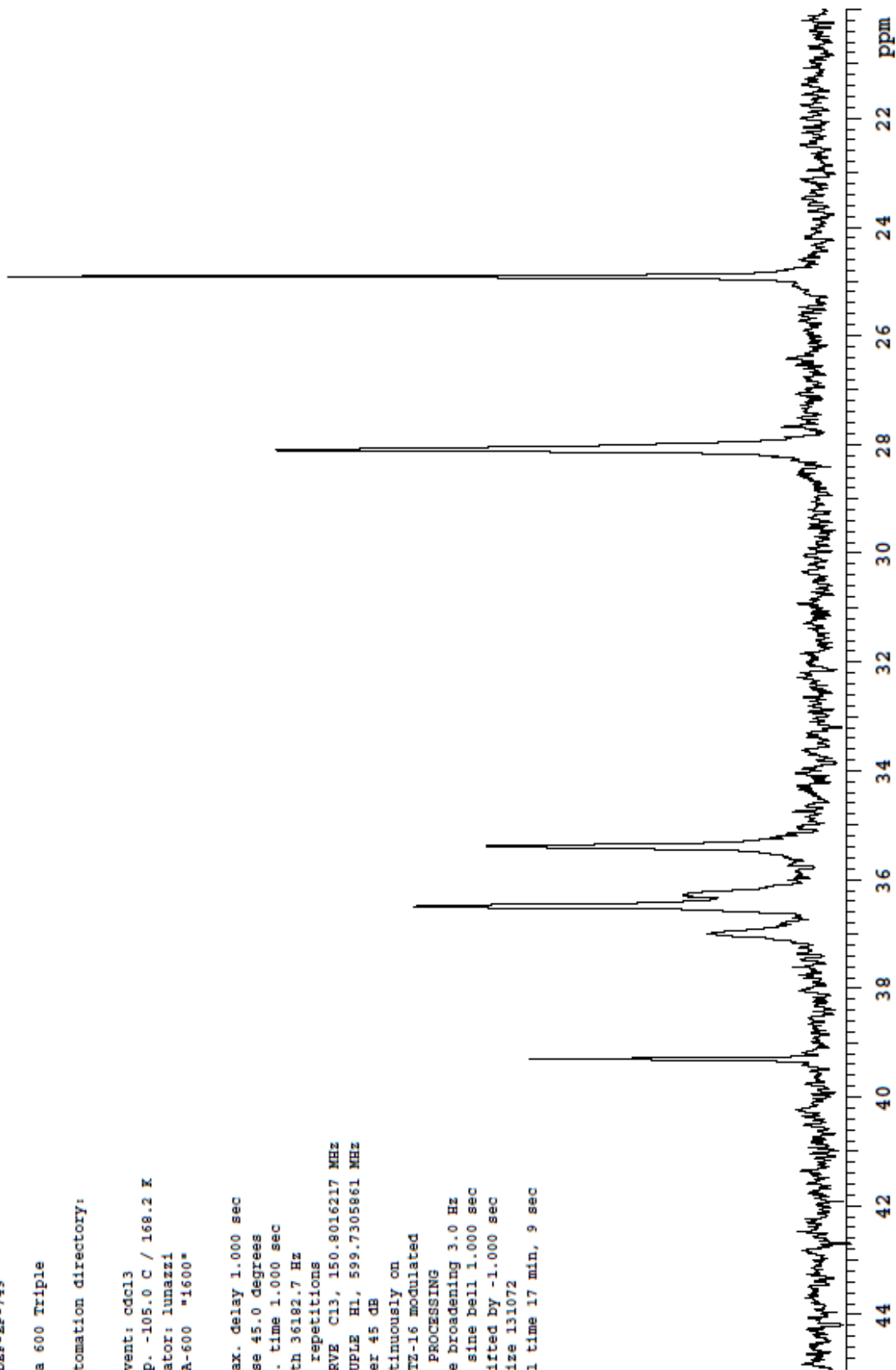
Inova 600 Triple

Automation directory:

Solvent: cdcl3
Temp. -105.0 C / 168.2 K
Operator: lunazzi
INOVA-600 *1600*

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.000 sec
Width 36182.7 Hz
144 repetitions
OBSERVE C13, 150.8016217 MHz
DECOUPLE H1, 599.7305861 MHz
Power 45 dB

continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 3.0 Hz
Sq. sine bell 1.000 sec
Shifted by -1.000 sec
FT size 131072
Total time 17 min, 9 sec

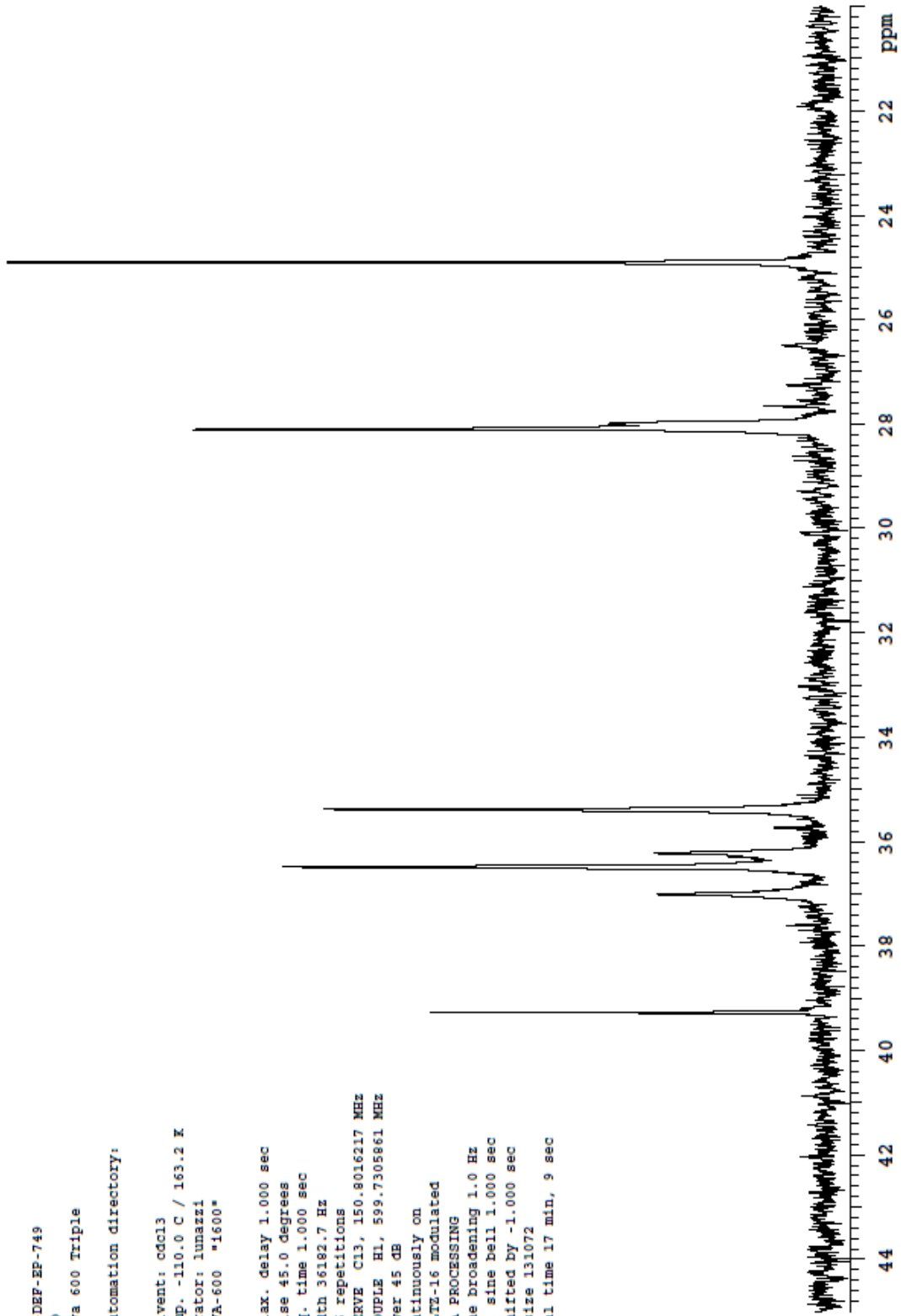


NEV-DEF-EP-749
DMSO
Inova 600 Triple

Automation directory:

Solvent: cdcl3
Temp. -110.0 C / 163.2 K
Operator: lunsazzi
INOVA-600 *1600*

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.000 sec
Width 36182.7 Hz
256 repetitions
OBSERVE C13, 150.8016217 MHZ
DECOUPLE H1, 599.7305861 MHZ
Power 45 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
Sq. sine bell 1.000 sec
Shifted by -1.000 sec
FT size 131072
Total time 17 min, 9 sec

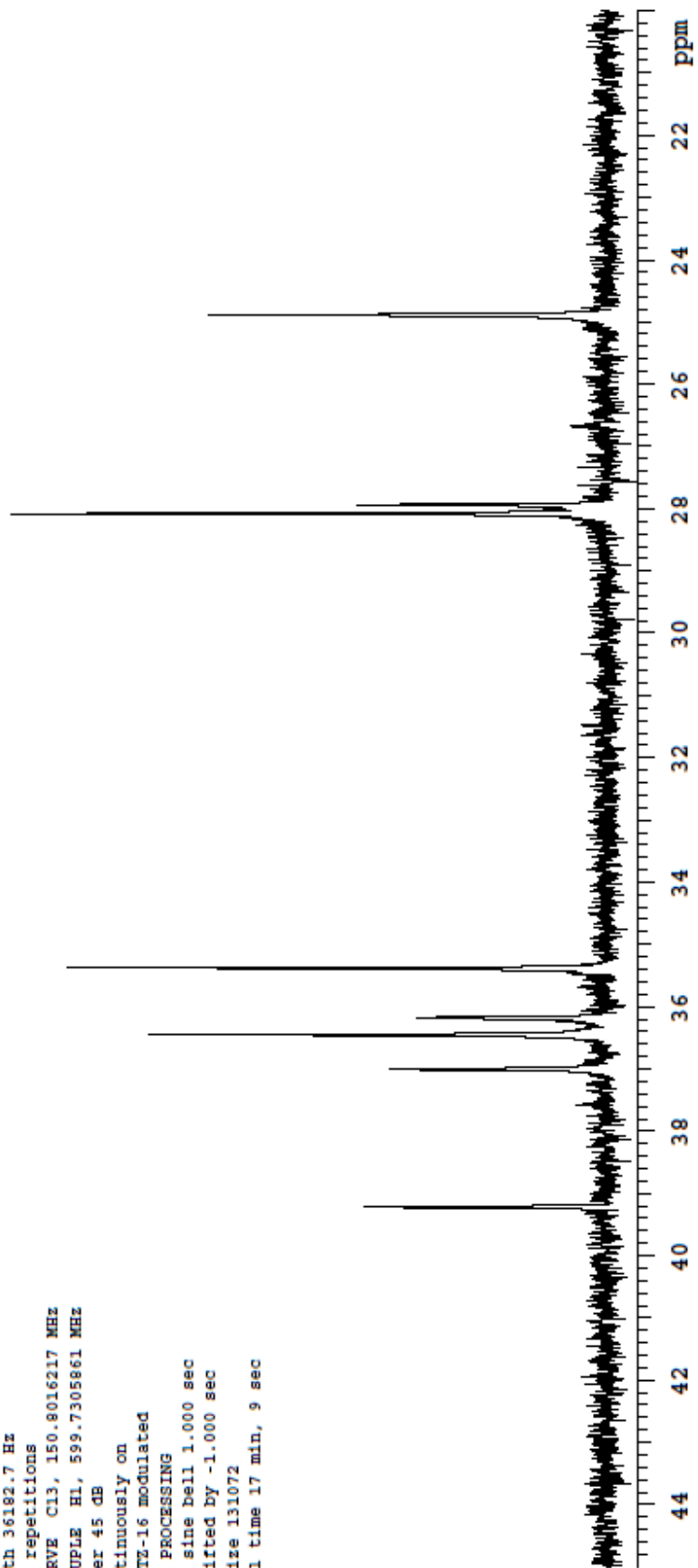


NEV-DEF-EP-749
DMSO
Inova 600 Triple

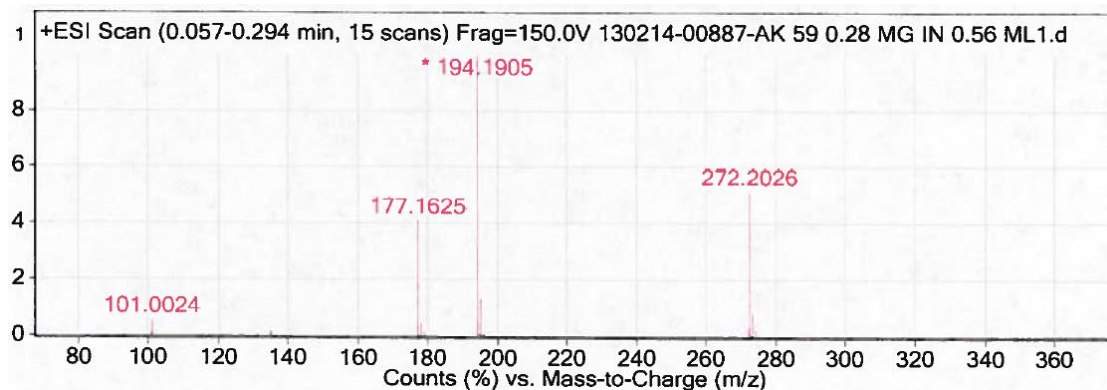
Automation directory:

Solvent: cdCl3
Temp. -120.0 C / 153.2 K
Operator: lunazzi
INOVA-600 *1600*

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.000 sec
Width 36182.7 Hz
256 repetitions
OBSERVE C13, 150.8016217 MHZ
DECOUPLE H1, 599.7305861 MHZ
Power 45 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 1.000 sec
Shifted by -1.000 sec
FT size 131072
Total time 17 min, 9 sec

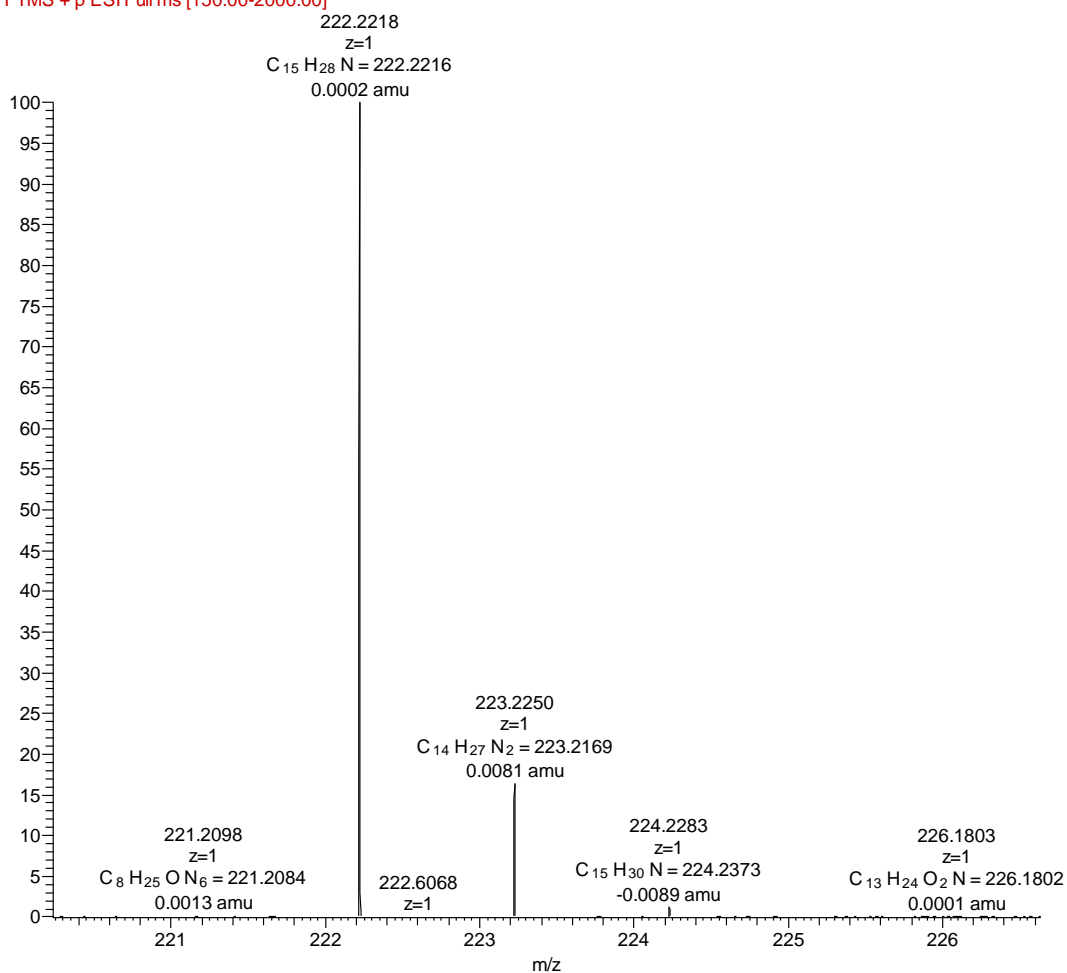


14.6 Παράρτημα ΣΤ: Φάσματα Μάζας

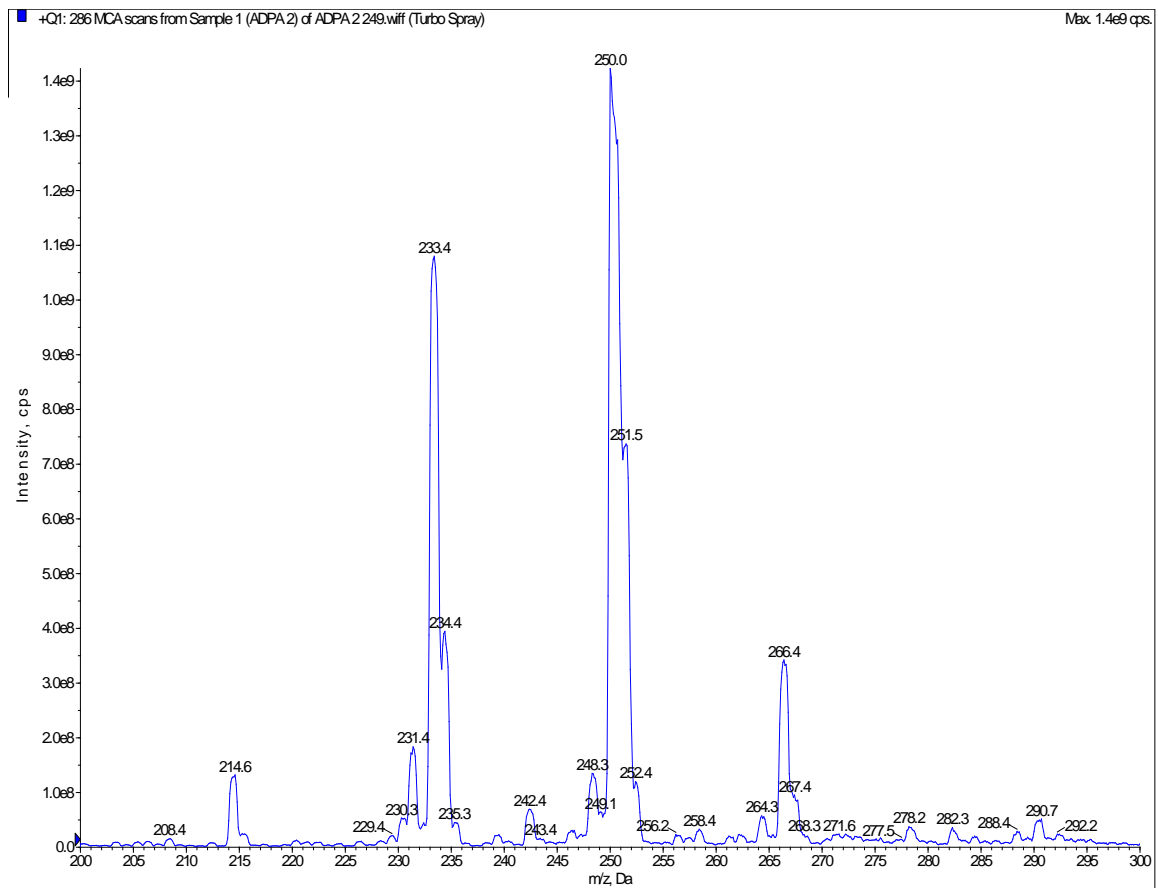


Σχήμα 14.15: Φάσμα μάζας της ένωσης 15 ($C_{13}H_{23}N$)

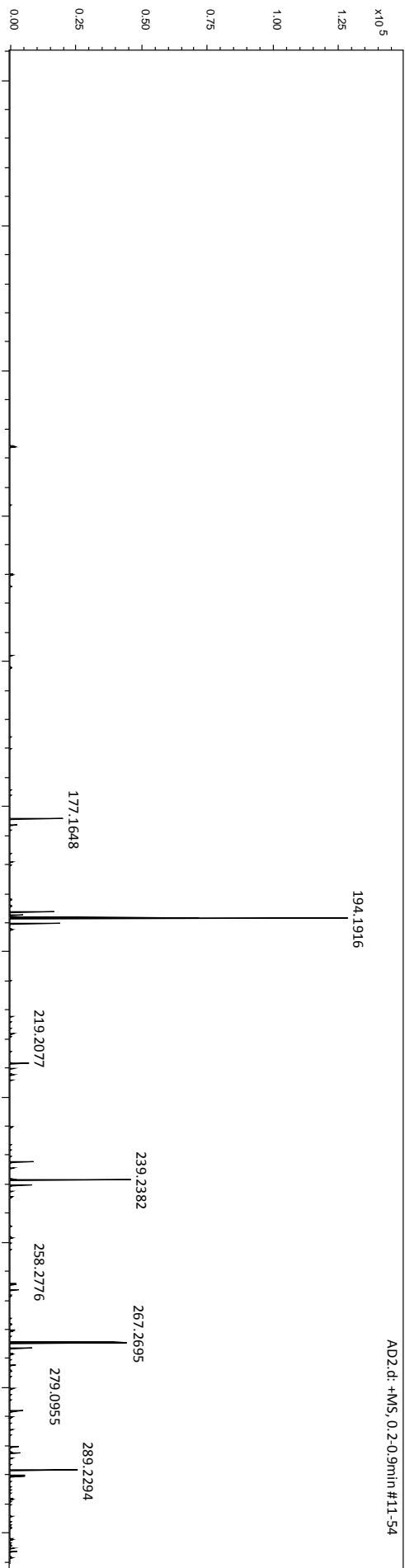
AK60_FTMS_fullscan_ESI+ #6-28 RT: 0.09-0.48 AV: 23 NL: 1.40E7
F: FTMS +p ESI Full ms [150.00-2000.00]



Σχήμα 14.16: Φάσμα μάζας της ένωσης 16 ($C_{15}H_{27}N$)



Εικόνα 14.17: Φάσμα μάζας της ένωσης 17 ($C_{17}H_{31}N$)



Εικόνα 14.18: Φάσμα μάζας της ένωσης 18 (C₁₃H₃N)

15 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Acheson, N. H.; Witt, K.; Palumbo, M.; Morris, L.; Soo, J. *FUNDAMENTALS OF MOLECULAR VIROLOGY*; 2nd editio.; Wiley, 2011.
- (2) Lamb, R. A.; Choppin, P. W. The Gene Structure and Replication of Influenza Virus. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 467–506.
- (3) Lamb, R. The Influenza Viruses. In *The influenza viruses*; Krug, R. M., Ed.; Springer US: Boston, MA, 1989; pp. 1–87.
- (4) Hay, A. J.; Wolstenholme, A. J.; Skehel, J. J.; Smith, M. H. The Molecular Basis of the Specific Anti-Influenza Action of Amantadine. *EMBO J.* **1985**, *4*, 3021–3024.
- (5) Lakadamyali, M.; Rust, M. J.; Babcock, H. P.; Zhuang, X. Visualizing Infection of Individual Influenza Viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9280–9285.
- (6) Wagner, E. K.; Hewlett, M. J.; Bloom, D. C.; Camerini, D. *Basic Virology*; 3rd editio.; Blackwell Publishing, 2008.
- (7) Bouvier, N. M.; Palese, P. The Biology of Influenza Viruses. *Vaccine* **2008**, *26 Suppl 4*, D49–D53.
- (8) Taubenberger, J. K.; Reid, A. H.; Krafft, A. E.; Bijwaard, K. E.; Fanning, T. G. Initial Genetic Characterization of the 1918 “Spanish” Influenza Virus. *Science* **1997**, *275*, 1793–1796.
- (9) Taubenberger, J. K.; Reid, A. H.; Fanning, T. G. The 1918 Influenza Virus: A Killer Comes into View. *Virology* **2000**, *274*, 241–245.
- (10) Das, K. Antivirals Targeting Influenza A Virus. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6263–6277.
- (11) Chowell, G.; Bertozzi, S. M.; Colchero, M. A.; Lopez-Gatell, H.; Alpuche-Aranda, C.; Hernandez, M.; Miller, M. A. Severe Respiratory Disease Concurrent with the Circulation of H1N1 Influenza. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 674–679.
- (12) Palese, P. Influenza: Old and New Threats. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 82–87.
- (13) Lamb, R. A.; Zebedee, S. L.; Richardson, C. D. Influenza Virus M2 Protein Is an Integral Membrane Protein Expressed on the Infected-Cell Surface. *Cell* **1985**, *40*, 627–633.
- (14) Sakaguchi, T.; Leser, G. P.; Lamb, R. A. The Ion Channel Activity of the Influenza Virus M2 Protein Affects Transport through the Golgi Apparatus. *J. Cell Biol.* **1996**, *133*, 733–747.
- (15) Cady, S. D.; Schmidt-Rohr, K.; Wang, J.; Soto, C. S.; Degrado, W. F.; Hong, M. Structure of the Amantadine Binding Site of Influenza M2 Proton Channels in Lipid Bilayers. *Nature* **2010**, *463*, 689–692.

- (16) Bright, R. A.; Medina, M.; Xu, X.; Perez-Oronoz, G.; Wallis, T. R.; Davis, X. M.; Povinelli, L.; Cox, N. J.; Klimov, A. I. Incidence of Adamantane Resistance among Influenza A (H3N2) Viruses Isolated Worldwide from 1994 to 2005: A Cause for Concern. *Lancet* **2005**, *366*, 1175–1181.
- (17) Neumann, G.; Noda, T.; Kawaoka, Y. Emergence and Pandemic Potential of Swine-Origin H1N1 Influenza Virus. *Nature* **2009**, *459*, 931–939.
- (18) Simonsen, L.; Viboud, C.; Grenfell, B. T.; Dushoff, J.; Jennings, L.; Smit, M.; Macken, C.; Hata, M.; Gog, J.; Miller, M. A.; Holmes, E. C. The Genesis and Spread of Reassortment Human Influenza A/H3N2 Viruses Conferring Adamantane Resistance. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24*, 1811–1820.
- (19) Fiore, A. E.; Fry, A.; Shay, D.; Gubareva, L.; Bresee, J. S.; Uyeki, T. M. *Antiviral Agents for the Treatment and Chemoprophylaxis of Influenza*; 2011.
- (20) Seasonal Influenza 2012 / 13 in Europe (EU / EEA Countries) Executive Summary. *Eur. Cent. Dis. Prev. Control* **2013**, 1–19.
- (21) ΚΕΕΛΠΝΟ. Ετήσια Έκθεση Επιδημιολογικής Επιτήρησης Της Γρίπης Για Την Περίοδο 2012-2013.
- (22) Hurt, A. C. The Epidemiology and Spread of Drug Resistant Human Influenza Viruses. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *8*, 22–29.
- (23) Deyde, V. M.; Xu, X.; Bright, R. A.; Shaw, M.; Smith, C. B.; Zhang, Y.; Shu, Y.; Gubareva, L. V.; Cox, N. J.; Klimov, A. I. Surveillance of Resistance to Adamantanes among Influenza A(H3N2) and A(H1N1) Viruses Isolated Worldwide. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 249–257.
- (24) Leang, S.-K.; Deng, Y.-M.; Shaw, R.; Caldwell, N.; Iannello, P.; Komadina, N.; Buchy, P.; Chittaganpitch, M.; Dwyer, D. E.; Fagan, P.; Gourinat, A.-C.; Hammill, F.; Horwood, P. F.; Huang, Q. S.; Ip, P. K.; Jennings, L.; Kesson, A.; Kok, T.; Kool, J. L.; Levy, A.; Lin, C.; Lindsay, K.; Osman, O.; Papadakis, G.; Rahnamal, F.; Rawlinson, W.; Redden, C.; Ridgway, J.; Sam, I.-C.; Svobodova, S.; Tandoc, A.; Wickramasinghe, G.; Williamson, J.; Wilson, N.; Yusof, M. A.; Kelso, A.; Barr, I. G.; Hurt, A. C. Influenza Antiviral Resistance in the Asia-Pacific Region during 2011. *Antiviral Res.* **2013**, *97*, 206–210.
- (25) Nguyen, H. T.; Fry, A. M.; Gubareva, L. V. Neuraminidase Inhibitor Resistance in Influenza Viruses and Laboratory Testing Methods. *Antivir. Ther.* **2012**, *17*, 159–173.
- (26) Schmidtke, M.; Zell, R.; Bauer, K.; Krumbholz, A.; Schrader, C.; Suess, J.; Wutzler, P. Amantadine Resistance among Porcine H1N1, H1N2, and H3N2 Influenza A Viruses Isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirology* **2006**, *49*, 286–293.
- (27) Krumbholz, A.; Schmidtke, M.; Bergmann, S.; Motzke, S.; Bauer, K.; Stech, J.; Dürwald, R.; Wutzler, P.; Zell, R. High Prevalence of Amantadine Resistance among Circulating European Porcine Influenza A Viruses. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 900–908.
- (28) Wang, C.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H. Activation of the M2 Ion Channel of Influenza Virus: A Role for the Transmembrane Domain Histidine Residue. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1363–1371.

- (29) Tang, Y.; Zaitseva, F.; Lamb, R. A.; Pinto, L. H. The Gate of the Influenza Virus M2 Proton Channel Is Formed by a Single Tryptophan Residue. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39880–39886.
- (30) Leonov, H.; Astrahan, P.; Krugliak, M.; Arkin, I. T. How Do Aminoadamantanes Block the Influenza M2 Channel, and How Does Resistance Develop? *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9903–9911.
- (31) Alhadeff, R.; Assa, D.; Astrahan, P.; Krugliak, M.; Arkin, I. T. Computational and Experimental Analysis of Drug Binding to the Influenza M2 Channel. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 1068–1073.
- (32) Takeuchi, H.; Okada, A.; Miura, T. Roles of the Histidine and Tryptophan Side Chains in the M2 Proton Channel from Influenza A Virus. *FEBS Lett.* **2003**, *552*, 35–38.
- (33) Chen, B. J.; Leser, G. P.; Jackson, D.; Lamb, R. A. The Influenza Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Interacts with the M1 Protein and Influences Virus Assembly at the Site of Virus Budding. *J. Virol.* **2008**, *82*, 10059–10070.
- (34) Hu, J.; Fu, R.; Cross, T. A. The Chemical and Dynamical Influence of the Anti-Viral Drug Amantadine on the M2 Proton Channel Transmembrane Domain. *Biophys. J.* **2007**, *93*, 276–283.
- (35) Salom, D.; Hill, B. R.; Lear, J. D.; DeGrado, W. F. pH-Dependent Tetramerization and Amantadine Binding of the Transmembrane Helix of M2 from the Influenza A Virus. *Biochemistry* **2000**, *39*, 14160–14170.
- (36) Hu, J.; Fu, R.; Nishimura, K.; Zhang, L.; Zhou, H.-X.; Busath, D. D.; Vijayvergiya, V.; Cross, T. A. Histidines, Heart of the Hydrogen Ion Channel from Influenza A Virus: Toward an Understanding of Conductance and Proton Selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 6865–6870.
- (37) Sansom, M. S.; Kerr, I. D. Influenza Virus M2 Protein: A Molecular Modelling Study of the Ion Channel. *Protein Eng.* **1993**, *6*, 65–74.
- (38) www.virology.ws - Release of influenza viral RNAs into cells
<http://www.virology.ws/2009/05/06/release-of-influenza-viral-rnas-into-cells/> (accessed May 23, 2015).
- (39) Kovacs, F. A.; Cross, T. A. Transmembrane Four-Helix Bundle of Influenza A M2 Protein Channel: Structural Implications from Helix Tilt and Orientation. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2511–2517.
- (40) Hu, J.; Asbury, T.; Achuthan, S.; Li, C.; Bertram, R.; Quine, J. R.; Fu, R.; Cross, T. A. Backbone Structure of the Amantadine-Blocked Trans-Membrane Domain M2 Proton Channel from Influenza A Virus. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 4335–4343.
- (41) Schnell, J. R.; Chou, J. J. Structure and Mechanism of the M2 Proton Channel of Influenza A Virus. *Nature* **2008**, *451*, 591–595.

- (42) Kukol, A.; Adams, P. D.; Rice, L. M.; Brunger, A. T.; Arkin, T. I. Experimentally Based Orientational Refinement of Membrane Protein Models: A Structure for the Influenza A M2 H⁺ Channel. *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 951–962.
- (43) Stouffer, A. L.; Acharya, R.; Salom, D.; Levine, A. S.; Di Costanzo, L.; Soto, C. S.; Tereshko, V.; Nanda, V.; Stayrook, S.; DeGrado, W. F. Structural Basis for the Function and Inhibition of an Influenza Virus Proton Channel. *Nature* **2008**, *451*, 596–599.
- (44) Wang, C.; Takeuchi, K.; Pinto, L. H.; Lamb, R. A. Ion Channel Activity of Influenza A Virus M2 Protein: Characterization of the Amantadine Block. *J. Virol.* **1993**, *67*, 5585–5594.
- (45) Wang, T.; Cady, S. D.; Hong, M. NMR Determination of Protein Partitioning into Membrane Domains with Different Curvatures and Application to the Influenza M2 Peptide. *Biophys. J.* **2012**, *102*, 787–794.
- (46) Cady, S. D.; Wang, J.; Wu, Y.; DeGrado, W. F.; Hong, M. Specific Binding of Adamantane Drugs and Direction of Their Polar Amines in the Pore of the Influenza M2 Transmembrane Domain in Lipid Bilayers and Dodecylphosphocholine Micelles Determined by NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4274–4284.
- (47) Decoursey, T. E. Voltage-Gated Proton Channels and Other Proton Transfer Pathways. *Physiol. Rev.* **2003**, *83*, 475–579.
- (48) DeCoursey, T. E.; Cherny, V. V. Common Themes and Problems of Bioenergetics and Voltage-Gated Proton Channels. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2000**, *1458*, 104–119.
- (49) Pielak, R. M.; Chou, J. J. Influenza M2 Proton Channels. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 522–529.
- (50) Wang, J.; Pielak, R. M.; McClintock, M. A.; Chou, J. J. Solution Structure and Functional Analysis of the Influenza B Proton Channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 1267–1271.
- (51) Pinto, L. H.; Dieckmann, G. R.; Gandhi, C. S.; Papworth, C. G.; Braman, J.; Shaughnessy, M. A.; Lear, J. D.; Lamb, R. A.; DeGrado, W. F. A Functionally Defined Model for the M2 Proton Channel of Influenza A Virus Suggests a Mechanism for Its Ion Selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11301–11306.
- (52) Pielak, R. M.; Schnell, J. R.; Chou, J. J. Mechanism of Drug Inhibition and Drug Resistance of Influenza A M2 Channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 7379–7384.
- (53) Ιωαννίδης, Χ. Πειραματική Και Υπολογιστική Μελέτη Της Αλληλεπίδρασης Αμινοαδαμαντανικών Προσδετών Με Τον Διαμεμβρανικό Πόρο Του Ιοντικού Διαύλου Της Πρωτεΐνης Του Ιού Της Influenza A/M2 (Udorn, Weybridge), Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.
- (54) Gkeka, P.; Eleftheratos, S.; Kolocouris, A.; Cournia, Z. Free Energy Calculations Reveal the Origin of Binding Preference for Aminoadamantane Blockers of Influenza A/M2TM Pore. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 1272–1281.
- (55) Lavoisier, A.; Laplace, P. *Memoir on Heat*; 1982nd ed.; Watson Publ Intl, 1783.

- (56) Lodwig, T.; Smeaton, W. The Ice Calorimeter of Lavoisier and Laplace and Some of Its Critics. *Ann. Sci.* **1974**, *31*, 1–18.
- (57) Chaires, J. B. Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 135–151.
- (58) Henry, C. Structure-Based Drug Design. *Chem. Eng. News* **2001**, *79*, 69–78.
- (59) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- (60) Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1757–1768.
- (61) Collins, K. D. Charge Density-Dependent Strength of Hydration and Biological Structure. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 65–76.
- (62) Jelesarov, I.; Dürr, E.; Thomas, R. M.; Bosshard, H. R. Salt Effects on Hydrophobic Interaction and Charge Screening in the Folding of a Negatively Charged Peptide to a Coiled Coil (leucine Zipper). *Biochemistry* **1998**, *37*, 7539–7550.
- (63) Weber, P. C.; Salemme, F. R. Applications of Calorimetric Methods to Drug Discovery and the Study of Protein Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 115–121.
- (64) Freyer, M. W.; Lewis, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol.* **2008**, *84*, 79–113.
- (65) Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 131–137.
- (66) Cooper, A.; Johnson, C. M. Introduction to Microcalorimetry and Biomolecular Energetics. *Methods Mol. Biol.* **1994**, *22*, 109–124.
- (67) Amzel, L. Loss of Translational Entropy in Binding, Folding, and Catalysis. *Proteins* **1997**, *28*, 144–149.
- (68) Amzel, L. Energetics of Biological Macromolecules, Part C. *Methods Enzymol.* **2000**, *323*, 167–177.
- (69) Brady, G. P.; Sharp, K. A. Entropy in Protein Folding and in Protein—protein Interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 215–221.
- (70) Gilson, M. K.; Given, J. A.; Bush, B. L.; McCammon, J. A. The Statistical-Thermodynamic Basis for Computation of Binding Affinities: A Critical Review. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1047–1069.
- (71) Janin, J. Elusive Affinities. *Proteins* **1995**, *21*, 30–39.

- (72) Murphy, K. P.; Xie, D.; Thompson, K. S.; Amzel, L. M.; Freire, E. Entropy in Biological Binding Processes: Estimation of Translational Entropy Loss. *Proteins* **1994**, *18*, 63–67.
- (73) Spolar, R.; Record, M. Coupling of Local Folding to Site-Specific Binding of Proteins to DNA. *Science* (80-.). **1994**, *263*, 777–784.
- (74) Novotny, J.; Bruccoleri, R. E.; Davis, M.; Sharp, K. A. Empirical Free Energy Calculations: A Blind Test and Further Improvements to the Method. *J. Mol. Biol.* **1997**, *268*, 401–411.
- (75) Freire, E. Do Enthalpy and Entropy Distinguish First in Class from Best in Class? *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 869–874.
- (76) Ruben, A. J.; Kiso, Y.; Freire, E. Overcoming Roadblocks in Lead Optimization: A Thermodynamic Perspective. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 2–4.
- (77) Ladbury, J. E.; Klebe, G.; Freire, E. Adding Calorimetric Data to Decision Making in Lead Discovery: A Hot Tip. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 23–27.
- (78) Cooper, A. Thermodynamic Analysis of Biomolecular Interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 557–563.
- (79) Ohtaka, H.; Freire, E. Adaptive Inhibitors of the HIV-1 Protease. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, *88*, 193–208.
- (80) Ohtaka, H.; Muzammil, S.; Schön, A.; Velazquez-Campoy, A.; Vega, S.; Freire, E. Thermodynamic Rules for the Design of High Affinity HIV-1 Protease Inhibitors with Adaptability to Mutations and High Selectivity towards Unwanted Targets. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 1787–1799.
- (81) Velazquez-Campoy, A.; Luque, I.; Todd, M. J.; Milutinovich, M.; Kiso, Y.; Freire, E. Thermodynamic Dissection of the Binding Energetics of KNI-272, a Potent HIV-1 Protease Inhibitor. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1801–1809.
- (82) Velazquez-Campoy, A.; Todd, M. J.; Freire, E. HIV-1 Protease Inhibitors: Enthalpic versus Entropic Optimization of the Binding Affinity †. *Biochemistry* **2000**, *39*, 2201–2207.
- (83) Velázquez Campoy, A.; Freire, E. ITC in the Post-Genomic Era...? Priceless. *Biophys. Chem.* **2005**, *115*, 115–124.
- (84) Garbett, N. C.; Chaires, J. B. Thermodynamic Studies for Drug Design and Screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 299–314.
- (85) Freire, E. A Thermodynamic Approach to the Affinity Optimization of Drug Candidates. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 468–472.
- (86) Κολοκούρης, Α. *Υπολογιστική Χημεία Μοριακών Συστημάτων*; Εκδόσεις Συμμετρία: Αθήνα, 2011.
- (87) Boyd, D. B.; Lipkowitz, K. B. Molecular Mechanics: The Method and Its Underlying Philosophy. *J. Chem. Educ.* **1982**, *59*, 269.

- (88) Cox, P. J. Molecular Mechanics: Illustrations of Its Application. *J. Chem. Educ.* **1982**, *59*, 275.
- (89) Cuendet, M. *Molecular Dynamics Simulation: A Short Introduction*; 2008.
- (90) Lennard-Jones, J. E. On the Determination of Molecular Fields. II. From the Equation of State of a Gas. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1924**, *106*, 463–477.
- (91) VERLET, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. II. Equilibrium Correlation Functions. *Phys. Rev.* **1968**, *165*, 201–214.
- (92) Rahman, A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon. *Phys. Rev.* **1964**, *136*, A405–A411.
- (93) Gibbs, J. W. *Elementary Principles in Statistical Mechanics*; Charles Scribner’s Sons: New York, 1902.
- (94) Karplus, M.; Petsko, G. A. Molecular Dynamics Simulations in Biology. *Nature* **1990**, *347*, 631–639.
- (95) Van Gunsteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1990**, *29*, 992–1023.
- (96) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98–103.
- (97) Swope, W. C.; Andersen, H. C.; Berens, P. H.; Wilson, K. R. A Computer Simulation Method for the Calculation of Equilibrium Constants for the Formation of Physical Clusters of Molecules: Application to Small Water Clusters. *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*, 637–649.
- (98) Khoury, G. A.; Tamamis, P.; Pinnaduwege, N.; Smadbeck, J.; Kieslich, C. A.; Floudas, C. A. Princeton_TIGRESS: Protein Geometry Refinement Using Simulations and Support Vector Machines. *Proteins* **2014**, *82*, 794–814.
- (99) Martini, A. *Short Course on Molecular Dynamics Simulation Lecture 5: Boundary Conditions*; 2009.
- (100) Allen, M. Introduction to Molecular Dynamics Simulation. *Comput. Soft Matter From Synth. Polym. to Proteins* **2004**, *23*.
- (101) Periodic Boundary Conditions, ISAACS project, Central University Michigan <http://people.cst.cmich.edu/petko1vg/isaacs/phys/pbc.html> (accessed May 23, 2015).
- (102) Christen, M.; Hünenberger, P. H.; Bakowies, D.; Baron, R.; Bürgi, R.; Geerke, D. P.; Heinz, T. N.; Kastenholz, M. A.; Kräutler, V.; Oostenbrink, C.; Peter, C.; Trzesniak, D.; van Gunsteren, W. F. The GROMOS Software for Biomolecular Simulation: GROMOS05. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1719–1751.
- (103) Greengard, L. Fast Algorithms for Classical Physics. *Science* **1994**, *265*, 909–914.

- (104) Ewald, P. Ewald Summation. *Ann. Phys* **1921**.
- (105) De Leeuw, S. W.; Perram, J. W.; Smith, E. R. Simulation of Electrostatic Systems in Periodic Boundary Conditions. I. Lattice Sums and Dielectric Constants. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1980**, *373*, 27–56.
- (106) Grubmüller, H.; Heller, H.; Windemuth, A.; Schulten, K. Generalized Verlet Algorithm for Efficient Molecular Dynamics Simulations with Long-Range Interactions. *Mol. Simul.* **1991**, *6*, 121–142.
- (107) Loncharich, R. J.; Brooks, B. R. The Effects of Truncating Long-Range Forces on Protein Dynamics. *Proteins* **1989**, *6*, 32–45.
- (108) Feller, S. E.; Pastor, R. W.; Rojnuckarin, A.; Bogusz, S.; Brooks, B. R. Effect of Electrostatic Force Truncation on Interfacial and Transport Properties of Water. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 17011–17020.
- (109) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781–1802.
- (110) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089.
- (111) Hairer, E.; Lubich, C.; Wanner, G. *Geometric Numerical Integration: Structure-Preserving Algorithms for Ordinary Differential Equations*; 2002.
- (112) Rizzo, R. C.; Jorgensen, W. L. OPLS All-Atom Model for Amines: Resolution of the Amine Hydration Problem. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4827–4836.
- (113) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- (114) Abascal, J. L. F.; Vega, C. A General Purpose Model for the Condensed Phases of Water: TIP4P/2005. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 234505.
- (115) Flyvbjerg, H.; Petersen, H. G. Error Estimates on Averages of Correlated Data. *J. Chem. Phys.* **1989**, *91*, 461.
- (116) Wlodek, S. T.; Antosiewicz, J.; McCammon, J. A. Prediction of Titration Properties of Structures of a Protein Derived from Molecular Dynamics Trajectories. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 373–382.
- (117) Amadei, A.; Linssen, A. B.; Berendsen, H. J. Essential Dynamics of Proteins. *Proteins* **1993**, *17*, 412–425.
- (118) Krivov, S. V.; Karplus, M. Diffusive Reaction Dynamics on Invariant Free Energy Profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 13841–13846.

- (119) Zwanzig, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 1420.
- (120) Dixit, S. B.; Héning, J.; Chipot, C. Alchemical Free Energy Perturbation Calculations <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.6/ug/node36.html> (accessed Apr 2, 2015).
- (121) Chodera, J. D.; Mobley, D. L.; Shirts, M. R.; Dixon, R. W.; Branson, K.; Pande, V. S. Alchemical Free Energy Methods for Drug Discovery: Progress and Challenges. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21*, 150–160.
- (122) Michel, J.; Foloppe, N.; Essex, J. W. Rigorous Free Energy Calculations in Structure-Based Drug Design. *Mol. Inform.* **2010**, *29*, 570–578.
- (123) Shirts, M. R.; Mobley, D. L.; Brown, S. P. Free-Energy Calculations in Structure-Based Drug Design. 61–86.
- (124) Aberg, K. M.; Lyubartsev, A. P.; Jacobsson, S. P.; Laaksonen, A. Determination of Solvation Free Energies by Adaptive Expanded Ensemble Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 3770–3776.
- (125) Gumbart, J. C.; Roux, B.; Chipot, C. Standard Binding Free Energies from Computer Simulations: What Is the Best Strategy? *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 794–802.
- (126) Baptista, L.; Clemente da Silva, E.; Arbillá, G. Oxidation Mechanism of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) by OH Radical in Liquid Phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6867–6879.
- (127) Gohlke, H.; Klebe, G. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2644–2676.
- (128) Michel, J.; Essex, J. W. Prediction of Protein-Ligand Binding Affinity by Free Energy Simulations: Assumptions, Pitfalls and Expectations. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2010**, *24*, 639–658.
- (129) Jorgensen, W. L.; Ravimohan, C. Monte Carlo Simulation of Differences in Free Energies of Hydration. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 3050.
- (130) Pohorille, A.; Jarzynski, C.; Chipot, C. Good Practices in Free-Energy Calculations. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 10235–10253.
- (131) Mitchell, M. J.; McCammon, J. A. Free Energy Difference Calculations by Thermodynamic Integration: Difficulties in Obtaining a Precise Value. *J. Comput. Chem.* **1991**, *12*, 271–275.
- (132) Beutler, T. C.; Mark, A. E.; van Schaik, R. C.; Gerber, P. R.; van Gunsteren, W. F. Avoiding Singularities and Numerical Instabilities in Free Energy Calculations Based on Molecular Simulations. *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *222*, 529–539.
- (133) Michel, J.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Energetics of Displacing Water Molecules from Protein Binding Sites: Consequences for Ligand Optimization. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15403–15411.

- (134) Michel, J.; Taylor, R. D.; Essex, J. W. Efficient Generalized Born Models for Monte Carlo Simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 732–739.
- (135) Michel, J.; Verdonk, M. L.; Essex, J. W. Protein-Ligand Binding Affinity Predictions by Implicit Solvent Simulations: A Tool for Lead Optimization? *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7427–7439.
- (136) Wong, C. F.; McCammon, J. A. Dynamics and Design of Enzymes and Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3830–3832.
- (137) Lazaridis, T. Binding Affinity and Specificity from Computational Studies. *Current Organic Chemistry*, 2002, *6*, 1319–1332.
- (138) Abraham, D. Docking and Scoring Functions/Virtual Screening. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*; 1998; pp. 281–330.
- (139) Guedes, I. a.; de Magalhães, C. S.; Dardenne, L. E. Receptor–ligand Molecular Docking. *Biophys. Rev.* **2013**, *6*, 75–87.
- (140) Mukesh, B.; Rakesh, K. Molecular Docking: A Review. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm* **2011**, *2*, 1746–1751.
- (141) Kolb, P.; Irwin, J. J. Docking Screens: Right for the Right Reasons? *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 755–770.
- (142) Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. MOLECULAR RECOGNITION AND DOCKING ALGORITHMS. **2003**.
- (143) Huang, S.-Y.; Zou, X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 3016–3034.
- (144) Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749.
- (145) Zsoldos, Z.; Reid, D.; Simon, A.; Sadjad, S. B.; Johnson, A. P. eHiTS: A New Fast, Exhaustive Flexible Ligand Docking System. *J. Mol. Graph. Model.* **2007**, *26*, 198–212.
- (146) Kuhl, F. S.; Crippen, G. M.; Friesen, D. K. A Combinatorial Algorithm for Calculating Ligand Binding. *J. Comput. Chem.* **1984**, *5*, 24–34.
- (147) Smellie, A. S.; Crippen, G. M.; Richards, W. G. Fast Drug-Receptor Mapping by Site-Directed Distances: A Novel Method of Predicting New Pharmacological Leads. *J. Chem. Inf. Model.* **1991**, *31*, 386–392.
- (148) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. Multiple Automatic Base Selection: Protein–ligand Docking Based on Incremental Construction without Manual Intervention. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, *11*, 369–384.

- (149) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T. Time-Efficient Docking of Flexible Ligands into Active Sites of Proteins. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **1995**, *3*, 300–308.
- (150) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470–489.
- (151) Welch, W.; Ruppert, J.; Jain, A. N. Hammerhead: Fast, Fully Automated Docking of Flexible Ligands to Protein Binding Sites. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 449–462.
- (152) Miller, M. D.; Kearsley, S. K.; Underwood, D. J.; Sheridan, R. P. FLOG: A System to Select “Quasi-Flexible” Ligands Complementary to a Receptor of Known Three-Dimensional Structure. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1994**, *8*, 153–174.
- (153) Ewing, T. J.; Makino, S.; Skillman, A. G.; Kuntz, I. D. DOCK 4.0: Search Strategies for Automated Molecular Docking of Flexible Molecule Databases. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2001**, *15*, 411–428.
- (154) Trosset, J.-Y.; Scheraga, H. A. Prodock: Software Package for Protein Modeling and Docking. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 412–427.
- (155) Abagyan, R.; Totrov, M.; Kuznetsov, D. ICM?A New Method for Protein Modeling and Design: Applications to Docking and Structure Prediction from the Distorted Native Conformation. *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 488–506.
- (156) Clark, D. E.; Westhead, D. R. Evolutionary Algorithms in Computer-Aided Molecular Design. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1996**, *10*, 337–358.
- (157) Clark, D. E. Evolutionary Algorithms in Molecular Design. **1999**.
- (158) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C.; Leach, A. R.; Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- (159) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- (160) Jones, G. H.; Schneider, C.; Schneider, H. H.; Seidler, J.; Cole, B. J.; Stephens, D. N. Comparison of Several Benzodiazepine Receptor Ligands in Two Models of Anxiolytic Activity in the Mouse: An Analysis Based on Fractional Receptor Occupancies. *Psychopharmacology (Berl)*. **1994**, *114*, 191–199.
- (161) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular Recognition of Receptor Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- (162) Oshiro, C. M.; Kuntz, I. D.; Dixon, J. S. Flexible Ligand Docking Using a Genetic Algorithm. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1995**, *9*, 113–130.
- (163) Tsai, C.-J.; Ma, B.; Nussinov, R. Folding and Binding Cascades: Shifts in Energy Landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 9970–9972.

- (164) Ma, B.; Kumar, S.; Tsai, C. J.; Nussinov, R. Folding Funnels and Binding Mechanisms. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 713–720.
- (165) Kar, G.; Keskin, O.; Gursoy, A.; Nussinov, R. Allostery and Population Shift in Drug Discovery. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 715–722.
- (166) Changeux, J.-P.; Edelstein, S. Conformational Selection or Induced Fit? 50 Years of Debate Resolved. *F1000Prime Rep* **2011**, *3*.
- (167) Petukh, M.; Stefl, S.; Alexov, E. The Role of Protonation States in Ligand-Receptor Recognition and Binding. *Curr. Pharm. Des.*
- (168) Wang, R.; Lu, Y.; Wang, S. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2287–2303.
- (169) Huang, S.-Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X. Scoring Functions and Their Evaluation Methods for Protein-Ligand Docking: Recent Advances and Future Directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 12899–12908.
- (170) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins* **2003**, *52*, 609–623.
- (171) De Azevedo, W. F.; Dias, R. Computational Methods for Calculation of Ligand-Binding Affinity. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 1031–1039.
- (172) Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical Scoring Functions: I. The Development of a Fast Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Affinity of Ligands in Receptor Complexes. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, *11*, 425–445.
- (173) Baxter, C. A.; Murray, C. W.; Clark, D. E.; Westhead, D. R.; Eldridge, M. D. Flexible Docking Using Tabu Search and an Empirical Estimate of Binding Affinity. *Proteins* **1998**, *33*, 367–382.
- (174) Böhm, H. J. The Development of a Simple Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Constant for a Protein-Ligand Complex of Known Three-Dimensional Structure. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1994**, *8*, 243–256.
- (175) Gohlke, H.; Klebe, G. Statistical Potentials and Scoring Functions Applied to Protein-Ligand Binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 231–235.
- (176) Wallqvist, A.; Covell, D. G. Docking Enzyme-Inhibitor Complexes Using a Preference-Based Free-Energy Surface. *Proteins* **1996**, *25*, 403–419.
- (177) Sippl, M. J. Calculation of Conformational Ensembles from Potentials of Mean Force. An Approach to the Knowledge-Based Prediction of Local Structures in Globular Proteins. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 859–883.
- (178) Muegge, I.; Martin, Y. C. A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 791–804.

- (179) Boström, J.; Norrby, P.-O.; Liljefors, T. Conformational Energy Penalties of Protein-Bound Ligands. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1998**, *12*, 383.
- (180) Mooij, W. T. M.; Verdonk, M. L. General and Targeted Statistical Potentials for Protein-Ligand Interactions. *Proteins* **2005**, *61*, 272–287.
- (181) Jackman, L. M.; Cotton, A. F. *Dynamic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*; Academic Press Inc, 1975.
- (182) Sandstrom, J. *Dynamic Nmr Spectroscopy*; Academic Press Inc: London, 1983.
- (183) Oki, M. *Applications of Dynamic Nmr Spectroscopy to Organic Chemistry (Methods in Stereochemical Analysis)*; VCH Pub, 1985.
- (184) *INTRODUCTION TO CHEMICAL EXCHANGE WITH THE MEXICO PROGRAM*; 2001.
- (185) Bain, A. D. Chemical Exchange in NMR. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, *43*, 63–103.
- (186) Lian, L. Y. Effects of Chemical Exchange on NMR Spectra. In *NMR of Macromolecules: a practical approach*; Roberts, G. C. K., Ed.; 1993.
- (187) Bain, A. D.; Duns, G. J. A Unified Approach to Dynamic NMR Based on a Physical Interpretation of the Transition Probability. *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 819–824.
- (188) Veshtort, M.; Griffin, R. G. SPINEVOLUTION: A Powerful Tool for the Simulation of Solid and Liquid State NMR Experiments. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 248–282.
- (189) Roberts, J. D.; Hawkins, B. L.; Bremser, W.; Borcic, S. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Barriers to Internal Rotation in Some Halogenated Methylbutanes. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4472–4479.
- (190) Nakamura, M.; Oki, M.; Nakanishi, H. Restricted Rotation Involving the Tetrahedral Carbon. V. Direct Observation of the Hindered Rotation of a Methyl Group by High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7169–7171.
- (191) Bushweller, C. H.; O'Neil, J. W.; Bilofsky, H. S. Activation Parameters for Tert-Butyl Rotation in Tert-Butyldimethylamine. *Tetrahedron* **1971**, *27*, 5761–5766.
- (192) Anderson, J. E.; Pearson, H.; Rawson, D. I. Dynamic NMR and Molecular Mechanics Study of the Rotation of a 1-Adamantyl, a 1-Bicyclooctyl, a 1-Norbornyl, and a Tert-Butyl Group. The Relative Size of an Adamantyl Group. The Dilemma of Calculated Barriers to Rotation. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1446–1447.
- (193) Anderson, J. E.; de Meijere, A.; Kozhushkov, S. I.; Lunazzi, L.; Mazzanti, A. Conformational Studies by Dynamic NMR. 95. Rotation around the Adamantyl-Alkyl Bond. Remote Substituent Effect on Conformational Equilibrium. In *Journal of organic chemistry*; American Chemical Society, 2003; Vol. 68, pp. 8494–8499.

- (194) Hackett Bushweller, C.; Anderson, W. G. Barriers to Rotation and Rotamer Preferences in Acyclic Hydrocarbons. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 1811–1814.
- (195) Anderson, J. E.; Pearson, H. The Effect of Halogen Atoms in Barriers to Rotation in Substituted Ethanes. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 2779–2780.
- (196) Eleftheratos, S.; Spearpoint, P.; Ortore, G.; Kolocouris, A.; Martinelli, A.; Martin, S.; Hay, A. Interaction of Aminoadamantane Derivatives with the Influenza A Virus M2 Channel-Docking Using a Pore Blocking Model. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4182–4187.
- (197) Carugo, O.; Bordo, D. How Many Water Molecules Can Be Detected by Protein Crystallography? *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1999**, *55*, 479–483.
- (198) Kolocouris, A.; Tataridis, D.; Fytas, G.; Mavromoustakos, T.; Foscolos, G. B.; Kolocouris, N.; De Clercq, E. Synthesis of 2-(2-Adamantyl)piperidines and Structure Anti-Influenza Virus a Activity Relationship Study Using a Combination of NMR Spectroscopy and Molecular Modeling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3465–3470.
- (199) Stylianakis, I.; Kolocouris, A.; Kolocouris, N.; Fytas, G.; Foscolos, G. B.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. Spiro[pyrrolidine-2,2'-Adamantanes]: Synthesis, Anti-Influenza Virus Activity and Conformational Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1699–1703.
- (200) Kolocouris, A.; Hansen, R. K.; Broadhurst, R. W. Interaction between an Amantadine Analogue and the Transmembrane Portion of the Influenza A M2 Protein in Liposomes Probed by ¹H NMR Spectroscopy of the Ligand. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4975–4978.
- (201) Kolocouris, N.; Foscolos, G. B.; Kolocouris, A.; Marakos, P.; Pouli, N.; Fytas, G.; Ikeda, S.; De Clercq, E. Synthesis and Antiviral Activity Evaluation of Some Aminoadamantane Derivatives. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2896–2902.
- (202) Kolocouris, A.; Spearpoint, P.; Martin, S. R.; Hay, A. J.; López-Querol, M.; Sureda, F. X.; Padalko, E.; Neyts, J.; De Clercq, E. Comparisons of the Influenza Virus A M2 Channel Binding Affinities, Anti-Influenza Virus Potencies and NMDA Antagonistic Activities of 2-Alkyl-2-Aminoadamantanes and Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6156–6160.
- (203) Kanele, I.; Indulena, M.; Ryazantseva, G.; Dzeguze4, D.; Polis, J. Antiviral Activity of 2-Aminoadamantane. *Latv. PSR Zinat. Akad. Vestis* **1973**, *11*, 42–47.
- (204) Cady, S.; Wang, T.; Hong, M. Membrane-Dependent Effects of a Cytoplasmic Helix on the Structure and Drug Binding of the Influenza Virus M2 Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11572–11579.
- (205) Cady, S. D.; Mishanina, T. V; Hong, M. Structure of Amantadine-Bound M2 Transmembrane Peptide of Influenza A in Lipid Bilayers from Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR: The Role of Ser31 in Amantadine Binding. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1127–1141.
- (206) Hu, F.; Schmidt-Rohr, K.; Hong, M. NMR Detection of pH-Dependent Histidine-Water Proton Exchange Reveals the Conduction Mechanism of a Transmembrane Proton Channel. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3703–3713.

- (207) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236.
- (208) Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides †. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6474–6487.
- (209) Shivakumar, D.; Williams, J.; Wu, Y.; Damm, W.; Shelley, J.; Sherman, W. Prediction of Absolute Solvation Free Energies Using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1509–1519.
- (210) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577.
- (211) Martyna, G. J.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. Constant Pressure Molecular Dynamics Algorithms. *J. Chem. Phys.* **1994**, *101*, 4177.
- (212) Humphreys, D. D.; Friesner, R. A.; Berne, B. J. A Multiple-Time-Step Molecular Dynamics Algorithm for Macromolecules. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 6885–6892.
- (213) Bennett, C. H. Efficient Estimation of Free Energy Differences from Monte Carlo Data. *J. Comput. Phys.* **1976**, *22*, 245–268.
- (214) Boyce, S. E.; Mobley, D. L.; Rocklin, G. J.; Graves, A. P.; Dill, K. A.; Shoichet, B. K. Predicting Ligand Binding Affinity with Alchemical Free Energy Methods in a Polar Model Binding Site. *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 747–763.
- (215) Zeevaart, J. G.; Wang, L.; Thakur, V. V.; Leung, C. S.; Tirado-Rives, J.; Bailey, C. M.; Domaal, R. A.; Anderson, K. S.; Jorgensen, W. L. Optimization of Azoles as Anti-Human Immunodeficiency Virus Agents Guided by Free-Energy Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9492–9499.
- (216) Baggett, A. W.; Cournia, Z.; Han, M. S.; Patargias, G.; Glass, A. C.; Liu, S.-Y.; Nolen, B. J. Structural Characterization and Computer-Aided Optimization of a Small-Molecule Inhibitor of the Arp2/3 Complex, a Key Regulator of the Actin Cytoskeleton. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1286–1294.
- (217) Pearlman, D. A.; Charifson, P. S. Are Free Energy Calculations Useful in Practice? A Comparison with Rapid Scoring Functions for the p38 MAP Kinase Protein System †. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3417–3423.
- (218) Aldrich, P. E.; Hermann, E. C.; Meier, W. E.; Paulshock, M.; Prichard, W. W.; Synder, J. A.; Watts, J. C. Antiviral Agents. 2. Structure-Activity Relations of Compounds Related to 1-Adamantanamine. *J. Med. Chem.* **1971**, *14*, 535–543.
- (219) Jirgensons, A.; Kauss, V.; Kalvinsh, I.; Gold, M. R. A Practical Synthesis of Tert-Alkylamines via the Ritter Reaction with Chloroacetonitrile. *Synthesis (Stuttg.)* **2000**, *2000*, 1709–1712.

- (220) Davis, F. A.; Friedman, A. J.; Nadir, U. K. Chemistry of the Sulfur-Nitrogen Bond. 14. Arenesulfenic Acids from N-Alkylidenearenesulfinamides (sulfinimines). *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2844–2852.
- (221) Caldwell, J.; Collins, I. Rapid Synthesis of 4-Benzyl-4-Aminopiperidines by Addition of Grignard Reagents to N-(1-Boc-Piperidin-4-Ylidene)-Tert-Butanesulfinyl Imine. *Synlett* **2006**, *2006*, 2565–2568.
- (222) Liu, G.; Cogan, D. A.; Owens, T. D.; Tang, T. P.; Ellman, J. A. Synthesis of Enantiomerically Pure N-Tert-Butanesulfinyl Imines (Tert-Butanesulfinimines) by the Direct Condensation of Tert-Butanesulfinamide with Aldehydes and Ketones. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1278–1284.
- (223) Bertus, P.; Szymoniak, J. New and Easy Route to Primary Cyclopropylamines from Nitriles. *Chem. Commun. (Camb)*. **2001**, 1792–1793.
- (224) Bertus, P.; Szymoniak, J. Ti(II)-Mediated Conversion of α -Heterosubstituted (O, N, S) Nitriles to Functionalized Cyclopropylamines. Effect of Chelation on the Cyclopropanation Step. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3965–3968.
- (225) Laroche, C.; Bertus, P.; Szymoniak, J. Titanium-Mediated [4 + 1] Assembly of 1,3-Dienes and Nitriles: Formation of 3-Cyclopentenyl Amines and Cyclopentenones. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 3030–3032.
- (226) Wolan, A.; Six, Y. Synthetic Transformations Mediated by the Combination of titanium(IV) Alkoxides and Grignard Reagents: Selectivity Issues and Recent Applications. Part 1: Reactions of Carbonyl Derivatives and Nitriles. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 15–61.
- (227) Tomashenko, O.; Sokolov, V.; Tomashevskiy, A.; de Meijere, A. One-Pot Synthesis of Primary Tert-Alkylamines by the Addition of Organometallic Reagents to Nitriles Mediated by Ti(Oi-Pr)₄. *Synlett* **2007**, *2007*, 0652–0654.
- (228) Tomashenko, O. A.; Sokolov, V. V.; Tomashevskii, A. A.; Potekhin, A. A.; Meijere, A. Addition of Organometallic Reagents to Nitriles Promoted by titanium(IV) Isopropoxide as a Procedure of Synthesis of Primary Tert-Alkylamines. *Russ. J. Org. Chem.* **2007**, *43*, 1421–1426.
- (229) Wang, R.; Gregg, B. T.; Zhang, W.; Golden, K. C.; Quinn, J. F.; Cui, P.; Tymoshenko, D. O. Rapid Ti(Oi-Pr)₄ Facilitated Synthesis of α,α,α -Trisubstituted Primary Amines by the Addition of Grignard Reagents to Nitriles under Microwave Heating Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7070–7073.
- (230) Eisch, J. J.; Gitua, J. N. Astonishing Alkylation and Unusual Reduction Reactions of Anionic Titanium(II) Isopropoxide Complexes: Evidence for SET Processes in Transition-Metal Oxidative Additions. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, *2002*, 3091–3096.
- (231) ROKHUM, L.; BEZ, G. A Practical One-Pot Synthesis of Azides Directly from Alcohols. *Journal of Chemical Sciences*, *2012*, *124*, 687–691.
- (232) Kovalev, V. V.; Rozov, A. K.; Shokova, E. A. Novel Approach to Trisubstituted Adamantanes. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3983–3990.

- (233) Kovalev, V. V.; Rozov, A. K.; Shokova, E. A. Stereoselective Isomerisation of 2-Aryl-2-Hydroxyadamantanes: A Convenient Method for (Z)-2-Aryl-5-Hydroxyadamantanes. *Synlett* **1990**, *1990*, 739–740.
- (234) Raber, D. J.; Fort, R. C.; Wiskott, E.; Woodworth, C. W.; Schleyer, P. v. R.; Weber, J.; Stetter, H. Rearrangements in the Adamantane Series. *Tetrahedron* **1971**, *27*, 3–18.
- (235) McKervey, M. A.; Alford, J. R.; McGarrity, J. F.; Rea, E. J. P. Adamantane Rearrangements. The Behaviour of 2-Methyl-2-Adamantanol in Concentrated Sulphuric Acid. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 5165–5168.
- (236) Akhlaghinia, B.; Samiei, S. A Novel and Highly Selective Conversion of Alcohols, Thiols, and Silyl Ethers to Azides Using the 2,4,6-trichloro[1,3,5]triazine/n-Bu₄NN₃ System. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1311–1315.
- (237) Doyle, M. Characterization of Binding Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 31–35.
- (238) *Free Energy Calculations. Theory and Application in Chemistry and Biology*; Chipot, C.; Pohorille, A., Eds.; 1st ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- (239) Brown, S. P.; Muchmore, S. W.; Hajduk, P. J. Healthy Skepticism: Assessing Realistic Model Performance. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 420–427.
- (240) Kolocouris, A.; Tzitzoglaki, C.; Johnson, F. B.; Zell, R.; Wright, A. K.; Cross, T. A.; Tietjen, I.; Fedida, D.; Busath, D. D. Aminoadamantanes with Persistent in Vitro Efficacy against H1N1 (2009) Influenza A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4629–4639.
- (241) Τζιτζογλάκη, Χ. Δραστικά Αμινοαδαμαντάνια Που Περιορίζουν Τη Μετάλλαξη Προς Ανθεκτικά Στελέχη Του Νέου Ιού Influenza A S31N, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.