ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «Οργανική Χημεία»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου για το ένζυμο της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2. Χρήση βιβλιοθηκών για την εξεύρεση χημικών οργανικών ενώσεων με υψηλή βαθμονόμηση μοριακής πρόσδεσης.

ΕΛΕΝΗ ΚΟΥΛΟΥΡΙΔΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου για το ένζυμο της κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2. Χρήση βιβλιοθηκών για την εξεύρεση χημικών οργανικών ενώσεων με υψηλή βαθμονόμηση μοριακής πρόσδεσης.

ΚΟΥΛΟΥΡΙΔΗ ΕΛΕΝΗ

Α.Μ.: 31102

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεώργιος Κόκοτος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Βικτώρια Μαγκριώτη, Λέκτορας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 20/01/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ένζυμο κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 ($cPLA_2$) παρουσιάζει ως θεμελιώδη λειτουργία την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Το αραχιδονικό οξύ αποτελεί την πρόδρομο ένωση για το σχηματισμό των λιπιδικών μεσολαβητών της φλεγμονής, συμπεριλαμβανομένων και των εικοσανοειδών. Συνεπώς, το ένζυμο $cPLA_2$ αποτελεί ένα ενδιαφέροντα στόχο για βιοχημικές και δομικές μελέτες, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε μια βαθύτερη γνώση της αντιμετώπισης της φλεγμονής.

Στο πρώτο τμήμα της μεταπτυχιακής εργασίας, περιγράφεται η δημιουργία συμπλέγματος του ενζύμου με τον αναστολέα AX074 με τη μεθοδολογία της επαγόμενης προσαρμογής (Induced Fit). Η ένωση AX074 παρουσιάζει την ισχυρότερη βιολογική δράση από τους 2-οξοαμιδικούς αναστολείς που έχουν συντεθεί από την ομάδα του Καθηγητή κ. Γεώργιου Κόκοτου στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο δεύτερο τμήμα, περιγράφεται η δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέτη αναφοράς (Ligand-Based) και η διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο (Pharmacophore-Based Virtual Screening) εμπορικά διαθέσιμων βιβλιοθηκών ενώσεων. Για τις «ενώσεις κρούσης» (hits) που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία πραγματοποιήθησαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης με σκοπό τη βαθμονόμηση της πρόσδεσής τους.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Προσομοίωση μοριακής πρόσδεσης αναστολέων. Δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ανθρώπινη Κυτοσολική Φωσφολιπάση A_2, Επαγόμενη Προσαρμογή, Φαρμακοφόρο Μοντέλο, Διαδικασία Εικονικής Σάρωσης, Ενώσεις Κρούσης

ABSTRACT

The fundamental function of enzyme cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_{2)}$ is to release arachidonic acid from the phospholipid membranes. Arachidonic acid is the precursor for the formation of lipid mediators of inflammation, including eicosanoids. Therefore, the enzyme is an interesting target for biochemical and structural studies which can lead to a deeper knowledge of the treatment of inflammation.

In the first part of this thesis, the creation of a complex of the enzyme and the inhibitor AX074 is described by the Induced Fit methodology. AX074 presents the strongest biological activity of the 2-oxoamide inhibitors that have been synthesized by the group of Professor George Kokotos in the Laboratory of Organic Chemistry of University of Athens.

In the second part of this thesis, a pharmacophore model has been created based on the Ligand-Based methodology and the process of «Pharmacophore-Based Virtual Screening (VS)» has been applied to commercially available compound libraries. For «hits» compounds that emerged from this process, molecular docking experiments have been performed in order to investigate their docking scoring.

SUBJECT AREA: In silico screening for known inhibitors and new inhibitors. Creation of pharmacophore model.

KEYWORDS: Human Cytosolic Phospholipases $A_{2,}$ Induced Fit, Pharmacophore Model, Pharmacophore-Based Virtual Screening, Hits

Στο Θεό και στη ψυχή μου.
Η ερευνητική αυτή εργασία ανήκει
στην Κυρά του Ουρανού. Την Οδηγό μου.

Μέσα από χίλια κύματα,
μέσα από χίλια βράχια,
να σε χτυπούν νερά,
να σε χτυπούνε μάτια,
μα εκεί να στέκεσαι γερά,
έστω και χτυπημένος,
περήφανος, ελεύθερος,
χωρίς καμιάν ανάγκη,
γιατί εσύ μονάχα ξέρεις
πόσο περήφανος υπήρξες στη ζωή
και έτσι θα συνεχίσεις να υπάρχεις!!!!!

Έτσι περήφανη και εγώ
σε θέλω να πορεύεσαι,
με το κεφάλι να ατενίζει
όσο ψηλά βολεύεται,
του αετού τις φωλιές
να αγναντεύεις,
και έτσι θαρρετά να εκπαιδεύεσαι.
Κι όταν καλά μπολιαστείς
με του αετού τη γνώση,
να τρέξεις γρήγορα
στα ακάνθινα μονοπάτια
της μοριακής μοντελοποίησης
να τα εφαρμόσεις.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο για τη συνεργασία, την βοήθεια, την συμπαράσταση και την πολύτιμη συμβολή του στην ολοκλήρωσή της.

Για την ανάθεση του θέματος, τις συμβουλές του και τη συμπαράστασή του θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο Κόκοτο.

Για τη βοήθεια, τις συμβουλές και την συμπαράσταση που μου παρείχε, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα κ. Βικτώρια Μαγκριώτη.

Ευχαριστώ θερμά την επιτροπή αποδοχής των μεταπτυχιακών φοιτητών που με δέχτηκε ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια μετά από μια ενδεκαετή απουσία στον Πανεπιστημιακό χώρο και μου παρείχε όλα τα ερευνητικά εφόδια ώστε να διεκπεραιώσω επιτυχώς το ερευνητικό και εκπαιδευτικό τμήμα της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τα μέλη του Εργαστηρίου Μοριακής Μοντελοποίησης, τη Δρ. κ. Αικατερίνη Κουκουλίτσα, την υποψήφια διδάκτορα κ. Σοφία Βασιλακάκη, το μεταπτυχιακό φοιτητή κ. Ταχσίν Κελίτση (βάσεις δεδομένων NCI & Hitfinder), και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Πηνελόπη Κολοκοτρώνη.

Ευχαριστώ την Καθηγήτρια της Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α. κ.΄Αννα Τσαντίλη-Κακουλίδου για τις υποδείξεις της στο 3^{ο} κεφάλαιο της μεταπτυχιακής εργασίας.

Τον Dr. Thierry Langer για την παραχώρηση της άδειας χρήσης του λογισμικού LigandScout.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τη φίλη και συνάδελφο κ. Πωλίνα Νάκου, τη φίλη κ. Μαίρη Καλπουζάνη, τα "υπόλοιπα αδέλφια μου" από το παρελθόν, τη φίλη που προέκυψε μέσα από τη διαδικασία της μεταπτυχιακής εργασίας κ. Πηνελόπη Κολοκοτρώνη, καθώς και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κλεάνθη Φρούσιο. Ο καθένας τους ξεχωριστά τοποθέτησε ένα λιθαράκι για την επιστροφή μου στο Χημικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών και συνέτεινε στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας που για μένα ήταν όνειρο ζωής, που με "βάσταξε ζωντανή" πολλά χρόνια τώρα. Ευχαριστώ τους προπτυχιακούς φοιτητές και φοιτήτριες που επιτηρούσα στα εργαστήρια, γιατί από τα μάτια τους κατάλαβα ότι κάτι τους προσέφερα και εγώ με τη στάση μου έστω και αν αυτό ήταν πολύ λίγο. Το να μπορείς να προσφέρεις κάτι έστω και μικρό σε ένα νέο άνθρωπο είναι κάτι που θα με κάνει να φύγω ήσυχη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

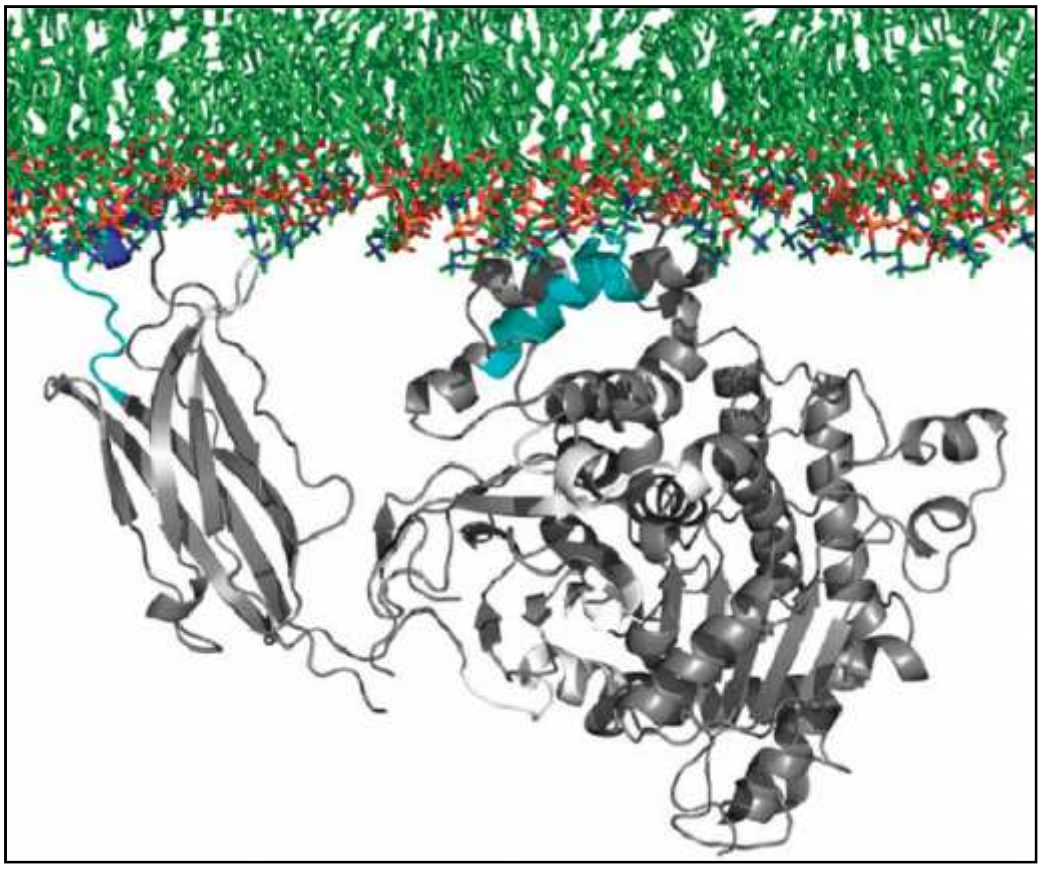
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Μοντελοποίησης του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών από το Μάρτιο του 2012 έως τον Ιούνιο του 2013.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο}

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΕΣ A_2



1.1 Ανακάλυψη της υπεροικογένειας της φωσφολιπάσης A_2

Οι φωσφολιπάσες αποτελούν ένα από τα παλαιότερα παραδείγματα ενζύμων των οποίων αναγνωρίστηκε και μελετήθηκε η ενζυμική δραστηριότητα. Η ανακάλυψη της υπεροικογένειας της φωσφολιπάσης A_2 (PLA_2) συνδέεται με την αντίστοιχη ανακάλυψη της δράσης λύσης των κυττάρων που προκαλείται από το δηλητήριο των φιδιών στο τέλος του 19^{ου} αιώνα. Ένας τύπος του ενζύμου, απομονώθηκε για πρώτη φορά, και χαρακτηρίστηκε από το δηλητήριο της κόμπρας και αργότερα από το δηλητήριο του κροταλία. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί έξι τύποι από διαφορετικές πηγές που αποτελούν την **υπεροικογένεια της φωσφολιπάσης A_2**. Αυτοί είναι οι : **$sPLA_2$**, **$cPLA_2$**, **$iPLA_2$**, **PAF-AH, $LPLA_2$, και AdPLA.**

Πίνακας 1.1: Υποκατηγορίες της υπεροικογένειας της φωσφολιπάσης A_2

Τύπος	**Ομάδα**	**Υποομάδα**	**Μοριακή Μάζα (kDa)**	**Καταλυτικά Αμινοξέα**
$sPLA_2$	GI	A,B	13-15	His/Asp
	GII	A,B,C,D,E,F	13-17	
	GIII		15-18	
	GV		14	
	GIX		14	
	GX		14	
	GXI	A,B	12-13	
	GXII	A,B	19	
	GXIII		<10	
	GXIV		13-19	
			ΑΜΙΝΟΞΕΑ/ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΑΖΑ (kDa)	
$cPLA_2$	GIV	GIVA($cPLA_2\alpha$), GIVB($cPLA_2\beta$), GIVC($cPLA_2\gamma$), GIVD($cPLA_2\delta$), GIVE($cPLA_2\varepsilon$), GIVF($cPLA_2\zeta$)	749/85, 1012/100-114, 541/61, 818/91, 838/95, 849/95	Ser/Asp
$iPLA_2$	GVI	A(β),B(γ),C(δ),D(ε), E(ζ),F(η)	84-90	Ser/Asp

PAF-AH	GVII	A(Lp-PLA_2), B(PAF-AH II)	40-45	Ser/His/Asp
	GVIII	A(α_1),B(α_2),β	26-40	
$LPLA_2$	GXV		45	Ser/His/Asp
AdPLA	GXVI		18	His/Cys

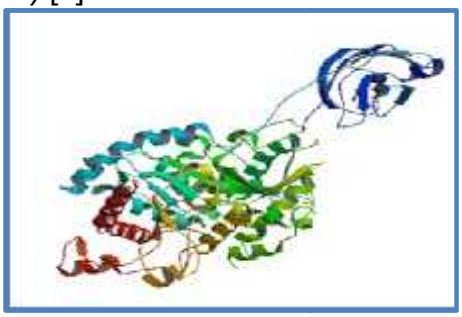
Η μελέτη των φωσφολιπασών έχει δημιουργήσει σημαντικές ερευνητικές προκλήσεις επειδή, σε αντίθεση με τα κλασικά υδατοδιαλυτά ένζυμα που επιδρούν σε υδατοδιαλυτά υποστρώματα, οι φωσφολιπάσες δρουν σε φωσφολιπίδια τα οποία σε υδατικό περιβάλλον **συσσωματώνονται** δημιουργώντας δομές όπως μικκύλια, κυστίδια, λιποσώματα κ.ά.

Παρόλο που οι περισσότερο μελετημένες φωσφολιπάσες είναι υδατοδιαλυτές, καταλύουν την υδρόλυση μη υδατοδιαλυτών υποστρωμάτων με καταλυτική δράση στη μεσεπιφάνεια που συνδέει το υδατικό περιβάλλον με το λιπόφιλο περιβάλλον της κυτταρικής μεμβράνης.

1.2 Κυτοσολικές φωσφολιπάσες A_2 (GROUP IV $cPLA_2$)

Η πρώτη κυτοσολική φωσφολιπάση που αναφέρθηκε στην βιβλιογραφία το 1986, ανακαλύφθηκε από τους Christina Leslie και Ruth Kramer και της αποδόθηκε το όνομα GIVA PLA_2. Αργότερα στα έτη 1998-1999 αναφέρθηκαν οι GIVB PLA_2 και GIVC PLA_2, και στα έτη 2004-2005 αναγνωρίστηκαν οι GIVD,GIVE, και GIVF PLA_2.[1]

Παρακάτω, περιγράφονται πληροφορίες για τη δομή και το μηχανισμό δράσης της **GIVA PLA_2** (το κρυσταλλομένο προς μελέτη ένζυμο βρίσκεται στη βάση δεδομένων πρωτεϊνών - Protein Data Base - **PDB : 1CJY,** Σχήμα 1.1.).[2]



Σχήμα 1.1: Κρυσταλλογραφική δομή της $cPLA_2$. Διακρίνεται με μπλε χρώμα η C2 περιοχή. Το υπόλοιπο τμήμα αποτελεί την καταλυτική περιοχή του ενζύμου.

1.3 Δομή και μηχανισμός δράσης της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 (human $cPLA_2$)

Το ένζυμο $cPLA_2$, μοριακού βάρους 85-kDa, παρουσιάζει ως θεμελιώδη λειτουργία την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος από τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες. Το αραχιδονικό οξύ αποτελεί την πρόδρομο ένωση για το σχηματισμό των λιπιδικών μεσολαβητών της φλεγμονής, περιλαμβανομένων και των εικοσανοειδών.

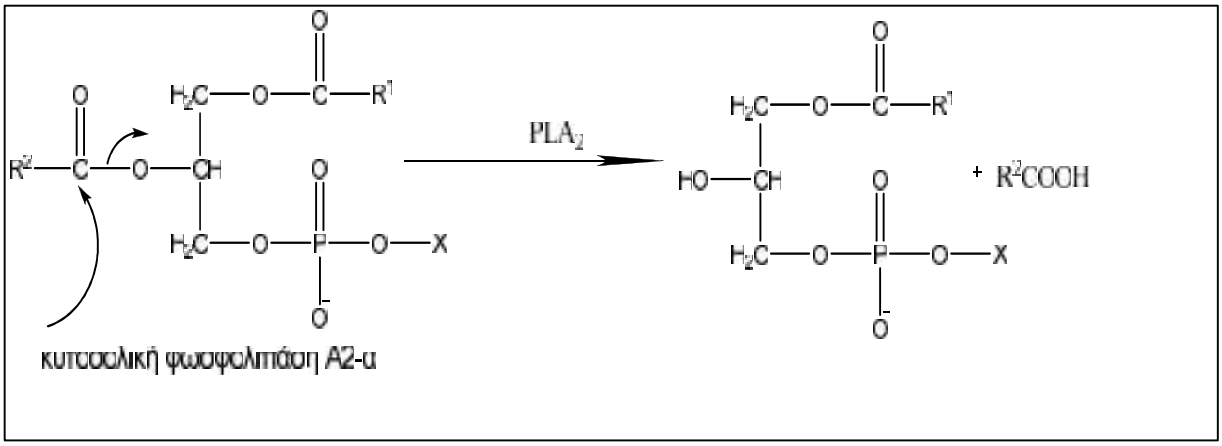
Σχήμα 1.2: Ο στρεσογόνος παράγοντας έχει ως απόρροια την απελευθέρωση του αραχιδονικού οξέος που αποτελεί πρόδρομο ένωση για το σχηματισμό των λιπιδικών μεσολαβητών της φλεγμονής. Το σχήμα έχει παραχωρηθεί από τη Λέκτορα Βικτώρια Μαγκριώτη.

Τα εικοσανοειδή, που αποτελούνται από τις προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες, θρομβοξάνια και λευκοτριένια, παίζουν σπουδαίους κυτταρικούς ρόλους, όπως για παράδειγμα στον έλεγχο της πίεσης του αίματος, στη μετακίνηση, έκκριση και απόπτωση των κυττάρων και συμμετέχουν στην έναρξη μιας σειράς διαδικασιών που καταλήγουν στη δημιουργία φλεγμονής σε διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένων του άσθματος και της αρθρίτιδας. Συνεπώς, το ένζυμο $cPLA_2$ έχει ρόλο-κλειδί στη βιοσύνθεση μορίων που σχετίζονται με ρυθμιστικές διαδικασίες και γι' αυτό το λόγο αποτελεί ένα ενδιαφέροντα στόχο για βιοχημικές και δομικές μελέτες οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε μια βαθύτερη γνώση του μεταβολισμού των εικοσανοειδών (Σχήμα 1.2).

Προσδιορίστηκαν έξι ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια $cPLA_2$ (α,β,γ,δ,ε,ζ), που παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ομοιότητας στις δομές τους, αλλά διαφέρουν σημαντικά στην εξειδίκευσή τους στα υποστρώματα που περιέχουν αραχιδονικό οξύ. Το ένζυμο $cPLA_2$-α, το περισσότερο

χαρακτηρισμένο και αυτό που σχετίζεται στενότερα με τα ενδοκυτταρικά σήματα, είναι εκλεκτικό σε πολύ μεγάλο βαθμό για τα φωσφολιπιδικά υποστρώματα που περιέχουν αραχιδονικό οξύ στην *sn*-2 θέση.[3]

Η ειδική αντίδραση που καταλύεται από την κυτοσολική φωσφολιπάση A_2-α στην *sn*-2 θέση του βασικού σκελετού της γλυκερόλης παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.3, όπου X = πολική ομάδα, R^1,R^2 = αλυσίδες λιπαρών οξέων.[1]



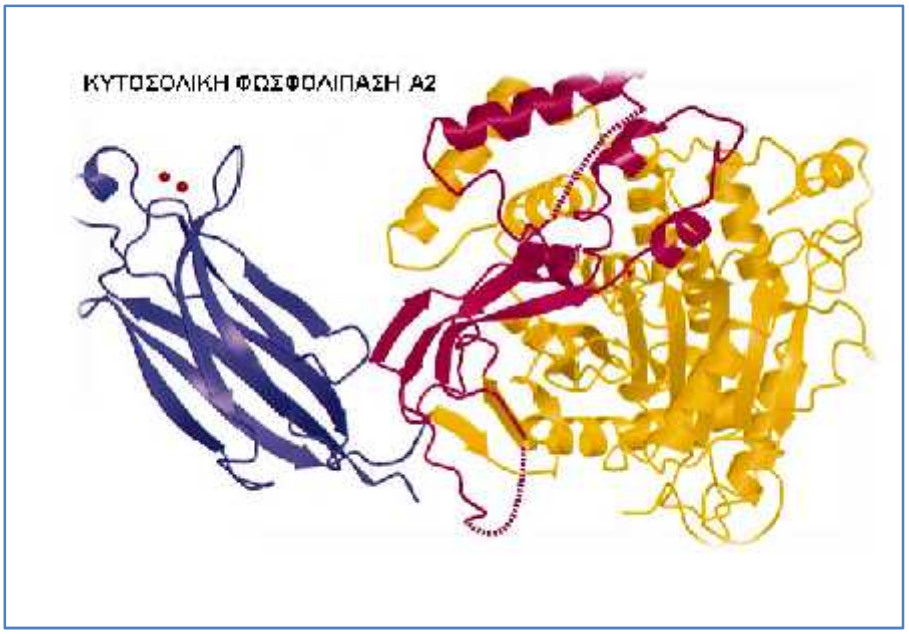
Σχήμα 1.3: Αντίδραση κατάλυσης από την κυτοσολική φωσφολιπάση A_2-α στην *sn*-2 θέση του βασικού σκελετού της γλυκερόλης [1]

Το ένζυμο ασκεί την εκλεκτική δράση του στοχεύοντας στη φωσφολιπιδική μεμβράνη και βασιζόμενο στη δράση εξωκυτταρικών παραγόντων που προκαλούν την απελευθέρωση ενδοκυτταρικού Ca^{2+}. Προκαλεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι κυκλοξυγονάσες (COX-1,COX-2) και οι λιποξυγονάσες που μεταβολίζουν το αραχιδονικό οξύ σε προσταγλανδίνες και λευκοτριένια σχετίζονται επίσης με τη φωσφολιπιδική μεμβράνη και με την αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+}. Η έναρξη της δράσης, ή η αυξημένη σε σχέση με τη φυσιολογική λειτουργία του ενζύμου δράση, έχει σχετιστεί με τα αυξημένα επίπεδα αραχιδονικού οξέος όπως και με τη σύνθεση λευκοτριένιων και προσταγλανδίνης. Τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το ένζυμο $cPLA_2$-α παίζει σπουδαίο ρόλο στην παραγωγή εικοσανοειδών.

Η πιο σπουδαία όμως απόδειξη του ρόλου του ενζύμου στη βιοσύνθεση μεσολαβητών της φλεγμονής προήλθε από την ανάλυση ποντικιών με απενεργοποιημένο γονίδιο μέσω γενετικού σχεδιασμού (knock-out) για το $cPLA_2$ ενζύμο, τα οποία ήταν αδύνατο να παράγουν λευκοτριένια, προσταγλανδίνες ή τον παράγοντα συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Platelet Aggregating Factor-PAF). Η σπουδαιότητα του ρόλου που παίζει η $cPLA_2$ στη

βιοσυνθετική πορεία αυτών των τριών μορίων της φλεγμονής επιβεβαιώνει ότι η συγκεκριμένη φωσφολιπάση είναι ένας εξαιρετικά ενδιαφέρον στόχος για τη δημιουργία νέων φαρμάκων από τη στιγμή που η αναστολή της επιδρά σε μια ποικιλία παθοφυσιολογικών καταστάσεων.

Η έναρξη της δράσης του ενζύμου με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} εξηγείται από τη δομή και διευθέτηση της πρωτεΐνης στο χώρο. Το μονομερές της $cPLA_2$-α αποτελείται από μια C2 περιοχή (138 αμινοξέα) που ενώνεται μέσω των αμινοξέων 139-143 με την καταλυτική μονάδα, η οποία διαφέρει από τις υπόλοιπες λιπάσες, αφού δεν παρουσιάζει τα κοινά χαρακτηριστικά αυτών όπως για παράδειγμα την κοινή καταλυτική τριάδα σερίνης-ασπαρτικό/ή γλουταμινικό οξύ-ιστιδίνη (611 αμινοξέα). Η πρόσδεση της C2 περιοχής στις φωσφολιπιδικές μεμβράνες πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει σε χωρική εγγύτητα την καταλυτική μονάδα του ενζύμου και το υπόστρωμα και εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου (Σχήμα 1.4).[3]

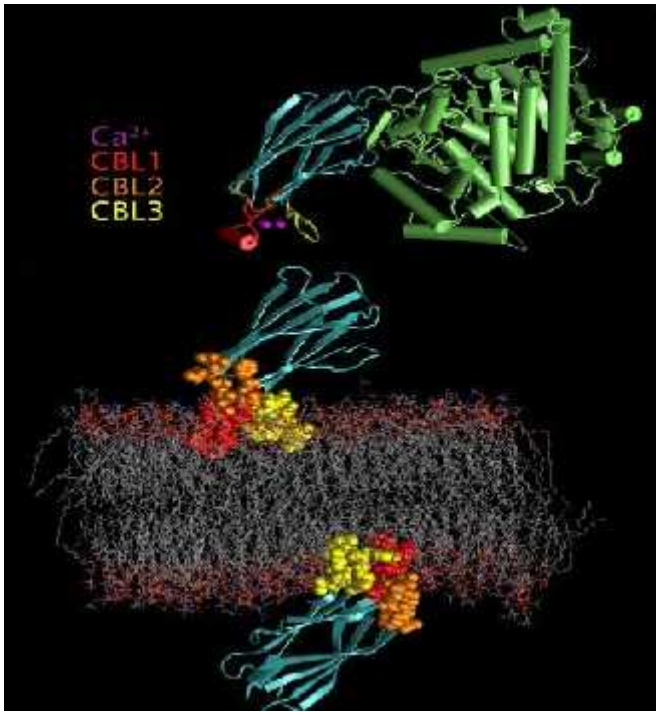


Σχήμα 1.4: Οι δύο περιοχές του μονομερούς της $cPLA_2$-α. Με μπλε χρώμα παριστάνεται η C2 περιοχή και τα ιόντα ασβεστίου με κόκκινο χρώμα. Η καταλυτική περιοχή αποτελείται από μια περιοχή με δευτεροταγή δομή β-φύλλου (κίτρινο χρώμα) και μια περιοχή που λειτουργεί ως κάλυμμα (cap region) που ανοίγει για να δεχτεί το ενεργό κέντρο το υπόστρωμα (ροζ χρώμα). Η περιοχή που χαρακτηρίζεται ως κάλυμμα αποτελείται από θετικά φορτισμένα αμινοξέα που μάλλον παίζουν ρόλο στην προσέγγιση του ενζύμου και του αρνητικά φορτισμένου υπόστρωματος.[3]

Στο παρακάτω σχήμα 1.5 περιγράφεται ο τρόπος που το ένζυμο $cPLA_2$ προσδένεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της C2 περιοχής. Αξίζει να

αναφερθεί ότι η ευλυγισία του συνδέσμου (αμινοξέα 139-143) που ενώνει τις δύο περιοχές του ενζύμου (C2 και καταλυτική περιοχή) καθώς και η έλλειψη αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πραγματοποιείται μια μικρή περιστροφή μεταξύ τους με σκοπό τη βελτιστοποίηση των αλληλεπιδράσεων με τη μεμβράνη-στόχο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το ενεργό κέντρο της $cPLA_2$ προστατεύεται από το υδατικό περιβάλλον από ευκίνητες περιοχές του ενζύμου (συγκεκριμένα το κάλυμμα του ενζύμου αποτελείται από τα 2/3 των ευκίνητων περιοχών της $cPLA_2$) οι οποίες όμως, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μετακινούνται για να έρθουν σε επαφή οι καταλυτικές ομάδες και το υπόστρωμα με αποτέλεσμα να εκθέτουν τη μεγάλη υδροφοβική περιοχή του καταλυτικού κέντρου στο διαλύτη.

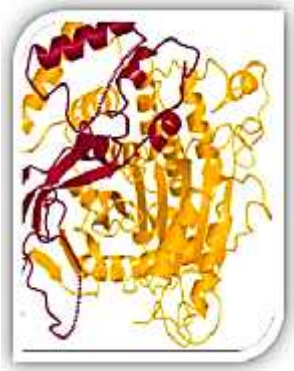


Σχήμα 1.5: Τρόπος πρόσδεσης του ενζύμου στην κυτταρική μεμβράνη. Διακρίνονται οι τρεις δυνατότητες πρόσδεσης (θηλιές δέσμευσης ιόντων ασβεστίου – CBL = Ca^{2+} binding loops) με κόκκινο, κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα.[5]

Εκτός από την αύξηση στο ενδοκυτταρικό ασβέστιο, η δράση του ενζύμου ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση της Ser505 από μια MAP (Mitogen activated protein) κινάση (μεγιστοποίηση της δραστηριότητας του ενζύμου). Επίσης, το ένζυμο ενεργοποιείται περαιτέρω με την πρόσδεση λιπιδικών

δεύτερων αγγελιοφόρων όπως η κεραμιδική 1 κινάση (C1P) και η διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PIP_2).[3,4]

1.4 Καταλυτική μονάδα της $cPLA_2$

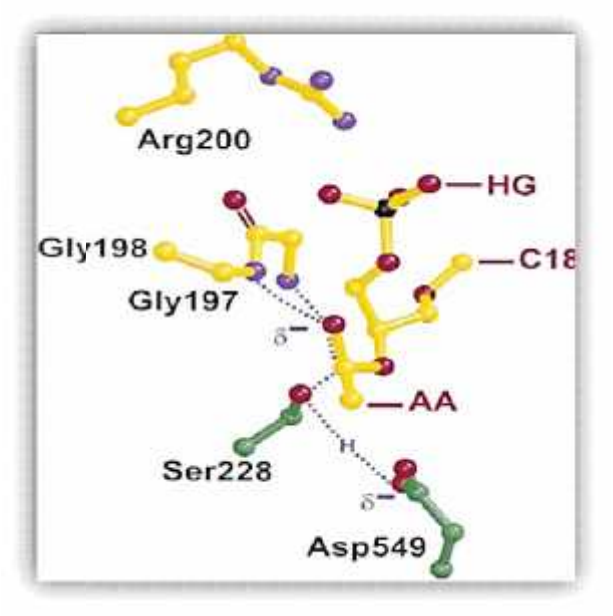


Σχήμα 1.6: Απεικόνιση καταλυτικής μονάδας ενζύμου

Υπάρχουν ομοιότητες ανάμεσα στην $cPLA_2$ και στην οικογένεια των α/β υδρολασών. Στην τελευταία παρουσιάζεται ένας κοινός πυρήνας ο οποίος περιέχει μια καταλυτική τριάδα παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται στις σερινοπρωτεάσες (σερίνη-ασπαρτικό /ή γλουταμινικό οξύ-ιστιδίνη) και λειτουργεί καταλυτικά μέσω ενός σερινο-άκυλο ενδιαμέσου. Ο καταλυτικός μηχανισμός της $cPLA_2$ προχωρεί επίσης μέσω ενός σερινο-άκυλο ενδιαμέσου χρησιμοποιώντας την Ser228 ως πυρηνόφιλο. Η Ser228 είναι παρούσα σε μια αλληλουχία πέντε αμινοξέων G-L-S-G-S που είναι παρόμοια με το κλασσικό μοτίβο των λιπασών G-X-S-X-G όπως εμφανίζεται στις α/β υδρολάσες. Επίσης, και η Asp549 είναι απαραίτητο αμινοξύ για τη δραστηριότητα του ενζύμου. Η ασυνήθιστη καταλυτική δυάδα της Ser228 και της Asp549 βρίσκεται τοποθετημένη σε μια βαθιά σχισμή στο κέντρο ενός κυρίαρχου υδροφοβικού «χωνιού». Καμία από τις 19 ιστιδίνες δεν παίζει ρόλο στη λειτουργία της $cPLA_2$. Ένα διαφορετικό αμινοξύ εμφανίζεται να απαιτείται για την κατάλυση, η Arg200. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προτείνεται ένας πρωτότυπος μηχανισμός ο οποίος περιγράφεται στα παρακάτω σχήματα από τους συγγραφείς του άρθρου «Crystal Structure of Human Cytosolic Phospholipase A_2 Reveals a Novel Topology and Catalytic Mechanism», Cell, (1999), 97, 349-360 (Σχήματα 1.7 και 1.8).

Σχήμα 1.7: ***Ενεργό κεντρο της $cPLA_2$ σε τρισδιάστατη απεικόνιση. Με πράσινο χρώμα: Ser228, Asp549. Με κίτρινο χρώμα: Arg200, Gly197, Gly198 (τα αμινοξέα Gly197,***

Gly198 δεν παρουσιάζονται με επισήμανση στο σχήμα, αλλά αποδώθηκε η παρουσία τους με τη δομή β-φύλλου κιτρίνου χρώματος). Ένα μόριο νερού φαίνεται να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την Asp549 και Thr330. [4]



Σχήμα 1.8: ***Μηχανισμός καταλυτικής δράσης cPLA$_2$. Πράσινο χρώμα: Καταλυτική δυάδα. Μαύρο χρώμα: Άτομα φωσφόρου. Gly197, Gly198: «Κοιλότητα του οξυανιόντος», σταθεροποιεί το αρνητικό φορτίο που προέρχεται από την πυρηνόφιλη προσβολή της Ser228. Arg200: Σταθεροποιεί τη φωσφορική ομάδα της πολικής κεφαλής. AA: Αραχιδονικό οξύ. HG: Πολική κεφαλή. C18: Αλυσίδα 18 ατόμων άνθρακα.[4]***

Η κρυσταλλογραφική μελέτη του ενζύμου αποκάλυψε την καταλυτική δυάδα της Ser228 και της Asp549. Παρατηρήθηκε πως το άτομο O_γ της Ser228 βρίσκεται σε απόσταση μόνο 2,9 Å από το $O_{\delta 2}$ της Asp549, με το τελευταίο να έχει τη γεωμετρία που απαιτείται για μεταφορά πρωτονίου. Η γουανιδινική ομάδα της Arg200 βρίσκεται σε απόσταση 9 Å από το O_γ της Ser228 και συνεπώς δε θα μπορούσε να παίξει το ρόλο του τρίτου μέλους της κατάλυσης (ανάλογο της οικογένειας των α/β υδρολασών). Όλες οι ιστιδίνες (ή οποιοδήποτε άλλο αμινοξύ με πολική πλευρική αλυσίδα) βρίσκονται τουλάχιστον 10 Å από την καταλυτική δυάδα και κυρίως τη Ser228. Υπάρχουν ενδείξεις που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ρόλος της Arg200 είναι πολλαπλός. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η Arg200 βρίσκεται στην ίδια θηλιά με τα αμινοξέα Gly197, Gly198 που αποτελούν τη λεγόμενη «κοιλότητα του οξυανιόντος». Σημαντικό είναι το γεγονός πως όταν δε σχηματίζονται οι δεσμοί υδρογόνου της πλευρικής αλυσίδας με τα αμινοξέα Thr680, Phe576 και Phe678, όπως στην περίπτωση της μετάλλαξης της Arg200 με Lys

(Pickard και συνεργάτες,1996) μπορούν να προκληθούν αλλαγές στη διαμόρφωση της θηλιάς που περιέχει την κοιλότητα του οξυανιόντος με δραματικές συνέπειες στη λειτουργία της $cPLA_2$.

Μετά την πρόσδεση του ενζύμου στην μεμβράνη μέσω της C2 περιοχής, ένα μόριο-υπόστρωμα μπορεί να διαχυθεί και να προσδεθεί στη στενή σχισμή του ενεργού κέντρου ώστε ο *sn*-2 εστερικός δεσμός **να είναι σε χωρική εγγύτητα** με το αμινοξύ Ser228. Η φωσφορική ομάδα της πολικής κεφαλής σταθεροποιείται από την πλευρική αλυσίδα της Arg200 γι' αυτό το λόγο το γουανιδινικό τμήμα της Arg200 δε βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με τη Ser228 και οι δύο αλυσίδες του λιπαρού οξέος μπορούν να κατευθυνθούν προς τα πίσω προς την κορυφή της σχισμής.

Μετά το σχηματισμό αυτού του συμπλέγματος ενζύμου-υποστρώματος, η Asp549 ενεργοποιεί τη Ser228 αποσπώντας ένα πρωτόνιο καθώς η τελευταία προσβάλλει πυρηνόφιλα τον *sn*-2 εστερικό δεσμό. Η «κοιλότητα του οξυανιόντος» που δημιουργείται από τον αμιδικό σκελετό των Gly197, Gly198 πολώνει τον *sn*-2 εστέρα και σταθεροποιεί τη μεταβατική κατάσταση του αναπτυσσόμενου τετραεδρικού ενδιαμέσου. Στη συνέχεια, η Asp549 μεταφέρει ένα πρωτόνιο στο φωσφολιπιδικό μόριο που αποχωρεί προκαλώντας το τετραεδρικό ενδιάμεσο να μετατραπεί σε σερινο-ακυλο μόριο. Υδρόλυση του τελικού αυτού ενδιαμέσου συμβαίνει στην συνέχεια με ανάλογο μηχανισμό. Η $cPLA_2$ μπορεί μετά είτε να αποσυνδεθεί από τη μεμβράνη είτε να δεσμεύσει ένα άλλο μόριο-υπόστρωμα επαναλαμβάνοντας τα βήματα που περιγράφονται παραπάνω.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν και άλλα παραδείγματα όπου μια πυρηνόφιλη σερίνη δρα χωρίς να εμπλέκεται καταλυτική τριάδα όπως για παράδειγμα στην ακυλάση της πενικιλίνης.

Πολύ σημαντική, είναι η παρατήρηση του A. Dessen και των συνεργατών του για τα πολλαπλά παραδείγματα λιπασών που υπάρχουν σε «κλειστή μορφή» (closed lid) και «ανοιχτή μορφή» (open lid) όπου ο δεύτερος όρος αναφέρεται σε πρωτεΐνη συγκρυσταλλωμένη με το υπόστρωμα ή με αναστολέα. Λιπάσες που υπάρχουν και στις δύο μορφές είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν το φαινόμενο που στην βιβλιογραφία είναι γνωστό ως μεσοεπιφανειακή ενεργοποίηση (interfacial activation) κατά το οποίο η καταλυτική

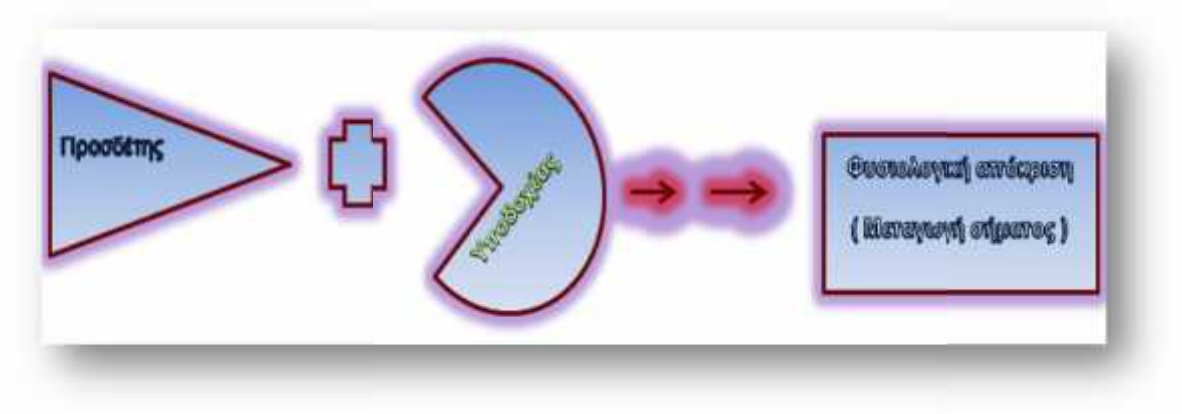
δραστηριότητα είναι μεγαλύτερη στο φυσικό περιβάλλο του ενζύμου. Η $cPLA_2$ ανήκει σε αυτή την κατηγορία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο}

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ

2.1 Μοριακή πρόσδεση

Με τον όρο μοριακή πρόσδεση (molecular docking) εννοούμε τους θεωρητικούς υπολογισμούς που μπορούν να διεξαχθούν προκειμένου να μελετηθεί η δυνατότητα πρόσδεσης ενός μικρού μορίου (δυνάμει προσδέτης) σε ένα μεγαλύτερο μόριο που ονομάζεται υποδοχέας. Η δυνατότητα πρόσδεσης έχει ως αποτέλεσμα είτε την αναστολή της λειτουργίας του υποδοχέα είτε τη διέγερση της δράσης του, παρέχοντας και στις δύο περιπτώσεις ως αποτέλεσμα μια φυσιολογική απόκριση, χαρακτηριστική της δράσης του προσδέτη (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1: Η μεταγωγή σήματος είναι απόρροια της πρόσδεσης βιοδραστικού μορίου στον υποδοχέα ή γενικά το κέντρο δράσης.

Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ ενός προσδέτη και ενός υποδοχέα, που οδηγούν στον αυθόρμητο σχηματισμό του συμπλέγματος υποδοχέα-προσδέτη, συμπεριλαμβάνουν όλα τα είδη. Για παράδειγμα, αν και πολύ σπάνια, παρατηρούνται ομοιοπολικοί δεσμοί, συχνότερα δε, εμφανίζονται αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσεως, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις ιόντων-διπόλων, διπόλων-διπόλων, μεταφοράς φορτίου και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις.[6,7]

Για τη μελέτη της πιθανότητας σχηματισμού τέτοιων συμπλόκων έχουν αναπτυχθεί διάφορα λογισμικά πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς. Σε αυτά τα λογισμικά, ο αλγόριθμος, τον οποίο χρησιμοποιούν, μπορεί να δώσει τις παρακάτω πληροφορίες:

1. Πιθανότητα αυθόρμητου σχηματισμού συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη,

2. Βαθμολόγηση της ενέργειας πρόσδεσης,

3. Διαμορφώσεις του συμπλόκου (πόζες).[7]

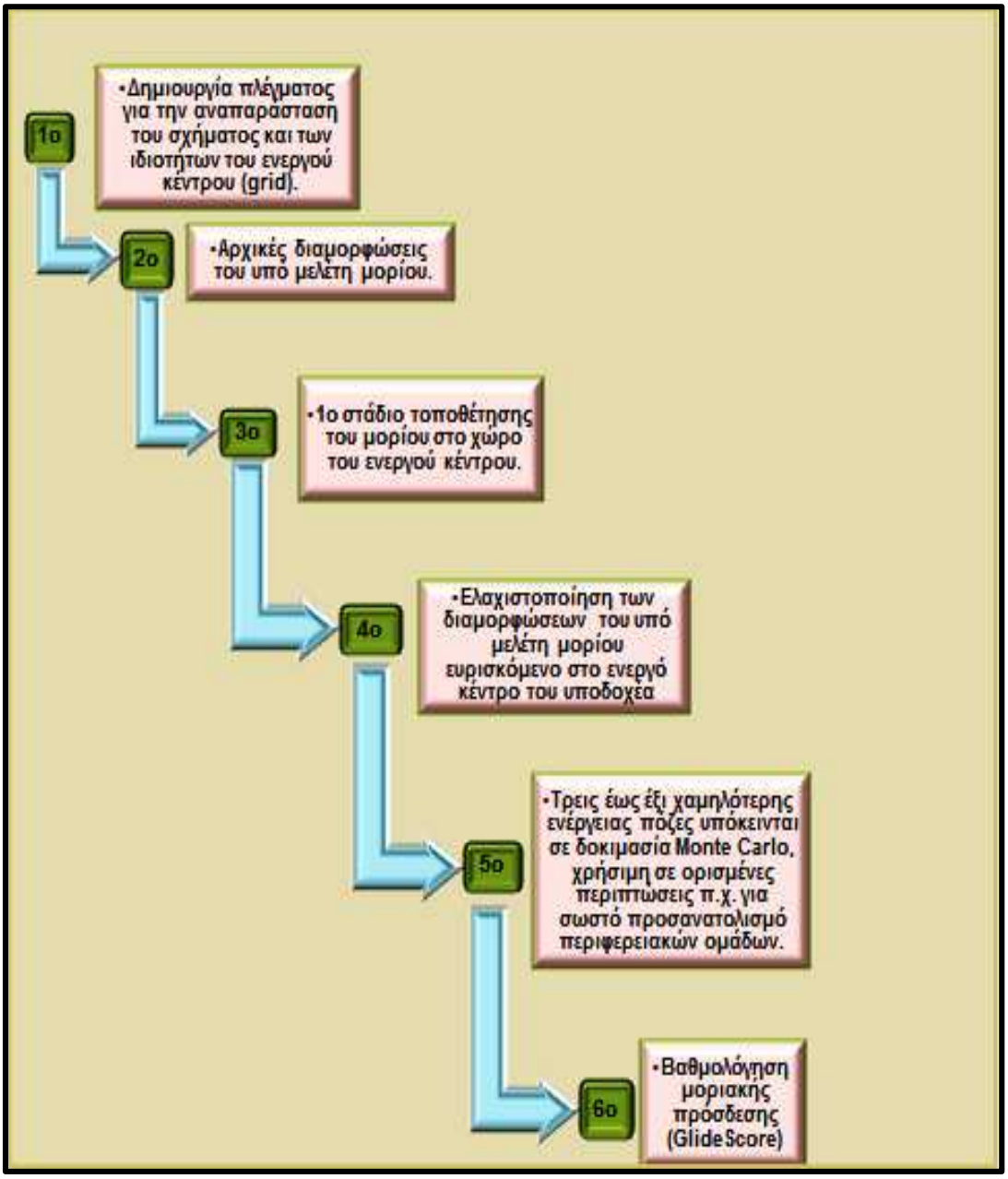
Η πρόοδος της μαθηματικής επιστήμης συνοδευόμενης και από αυτή των υπολογιστών οδήγησαν στην ανάπτυξη διαφόρων προσεγγίσεων όσο αφορά τη μοριακή πρόσδεση. Ταυτόχρονη πρόοδος επιτεύχθηκε και στην επίτευξη υψηλής διακριτικότητας κρυσταλλικών δομών υποδοχέα χωρίς ή συγκρυσταλλωμένων με βιοδραστικά μόρια.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκαν λογισμικά μοριακής πρόσδεσης, τα οποία παρέχονται από την εταιρία Schrödinger.

2.2 Λογισμικό Glide

Το λογισμικό Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) της εταιρίας Schrödinger χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ερευνητική εργασία για τη μελέτη της μοριακής πρόσδεσης ενώσεων στην ανθρώπινη κυτοσολική φωσφολιπάση (hn $cPLA_2$). Το λογισμικό έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μελετάται η πιθανότητα πρόσδεσης ενός μορίου στο ενεργό κέντρο ενός υποδοχέα εφαρμόζοντας εξαντλητική έρευνα της θέσης, του προσανατολισμού και του διαμορφωτικού χώρου που είναι διαθέσιμα για το μόριο.

Η χρήση του λογισμικού Glide αποσκοπεί στην τοποθέτηση και εύρεση πιθανών ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων (υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου κ.τ.λ.) μεταξύ μικρών μορίων και ενός μορίου-υποδοχέα, συνήθως μιας πρωτεΐνης. Στο λογισμικό Glide εμπεριέχεται η δυνατότητα υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης με δύο τρόπους: είτε θεωρώντας το μόριο πρόσδεσης άκαμπτο ή πλήρως ευέλικτο. Ο υποδοχέας θεωρείται άκαμπτος. Και στις δύο περιπτώσεις, μελετάται η τοποθέτηση του μορίου πρόσδεσης σε όλο το διαθέσιμο χώρο του ενεργού κέντρου με σκοπό την εύρεση απεικονίσεων που παρουσιάζουν ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις. Το αποτέλεσμα των υπολογισμών, δηλαδή η θέση, ο προσανατολισμός και η διαμόρφωση των υπό μελέτη μορίων στον υποδοχέα συνιστούν την απεικόνιση του προσδέτη (ligand pose).

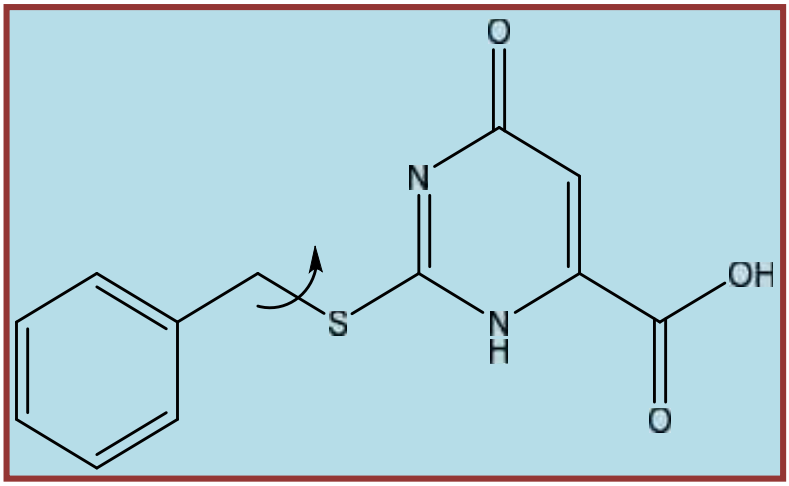


Σχήμα 2.2: Ροή εργασίας κατά τη διάρκεια υπολογισμού μοριακής πρόσδεσης με το λογισμικό Glide

Στη συνέχεια δίνονται ορισμένες λεπτομέρειες για κάθε βήμα που περιλαμβάνεται στο Σχήμα 2.2 :

•*Προετοιμασία πρωτεΐνης* : Περιλαμβάνει διαδικασίες όπως η προσθήκη ατόμων υδρογόνου που δε διακρίνονται στην κρυσταλλική δομή της, διόρθωση καταστάσεων πρωτονίωσης κ.τ.λ. Η ακρίβεια των αποτελεσμάτων με τη χρησιμοποίηση του λογισμικού Glide εξαρτάται από την ύπαρξη σωστών αρχικών δομών τόσο για το μακρομόριο-στόχο όσο και για τον πιθανό προσδέτη.

·Για τη *δημιουργία των διαμορφώσεων*, κάθε προσδέτης θεωρείται ότι αποτελείται από μια περιοχή που χαρακτηρίζεται ως πυρήνας (core) και ένα αριθμό στροφομερών ομάδων (rotamer group), καθεμιά η οποία ενώνεται με τον πυρήνα μέσω ενός περιστρεφόμενου δεσμού, όπως φαίνεται και στο παρακάτω Σχήμα 2.3 :



Σχήμα 2.3: ΄Ενωση 42010 από βιβλιοθήκη NCI. Ο αλγόριθμος Glide λαμβάνει υπόψη τις πιθανές διαμορφώσεις που μπορεί να λάβει μια ένωση κατά τη μοριακή πρόσδεση.

· *1^{ο} στάδιο πρόσδεσης*: Τοποθέτηση του μορίου στην επιθυμητή περιοχή πρόσδεσης με σκοπό τη μελέτη πιθανών αλληλεπιδράσεων.

· *4^{ο} και 5^{ο} βήμα*: μελετάται εκτενέστερα η τοποθέτηση του μορίου στο ενεργό κέντρο με βάση περισσότερα κριτήρια.

· *2^{ο} στάδιο πρόσδεσης*: Υπολογισμός βαθμολογίας πρόσδεσης των διαφόρων διαμορφώσεων εντός της περιοχής πρόσδεσης.

Η βαθμολογία πρόσδεσης δίδεται από τον τύπο :

GScore = 0.065*vdW + 0.130*Coul + Lipo + Hbond + Metal + BuryP + RotB + Site (2.1) όπου:

Πίνακας 2.1: Επεξήγηση των όρων που περιλαμβάνονται στη βαθμολογία πρόσδεσης με τη χρήση του αλγόριθμου Glide (Gscore-Σχέση 2.1).

΄Ορος	Επεξήγηση
GScore	Βαθμολογία πρόσδεσης.
vdW	Ενέργεια Van der Waals αλληλεπιδράσεων.
Coul	Ενέργεια Coulomb.
Lipo	Λιποφιλικός όρος (ευνοϊκές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις).
Hbond	Ενέργεια δεσμών υδρογόνου.
Metal	Ενέργεια αλληλεπιδράσεων με μέταλλο. Προσμετρώνται μόνο αλληλεπιδράσεις με αρνητικά φορτισμένα άτομα του προσδέτη.
BuryP	Ποινή για πολικές ομάδες (μη ευνοϊκή βαθμολόγηση των απώσεων των πολικών ομάδων).
RotB	Ποινή για περιστρεφόμενους δεσμούς που έχουν επιλεχθεί ως άκαμπτοι.
Site	Ενέργεια πολικών αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

[8-10]

Ο όρος *Docking score* που χρησιμοποιείται από τους χρήστες του λογισμικού συμπίπτει με τον όρο *GlideScore* εκτός των περιπτώσεων όπου ο χρήστης έχει θέσει ποινές για τις καταστάσεις πρωτονίωσης και ταυτομερισμού του προσδέτη με το λογισμικό Epik-συστήνεται από την εταιρεία Schrodinger-, οπότε και εμφανίζεται μια μικρή διαφορά στους δύο αυτούς όρους αφού οι ποινές αυτές εφαρμόζονται στον όρο "Docking score". [11,12]

Δηλαδή ισχύει:

Docking score = GlideScore – ποινές πρωτονίωσης και ταυτομερισμού του προσδέτη. (2.2)

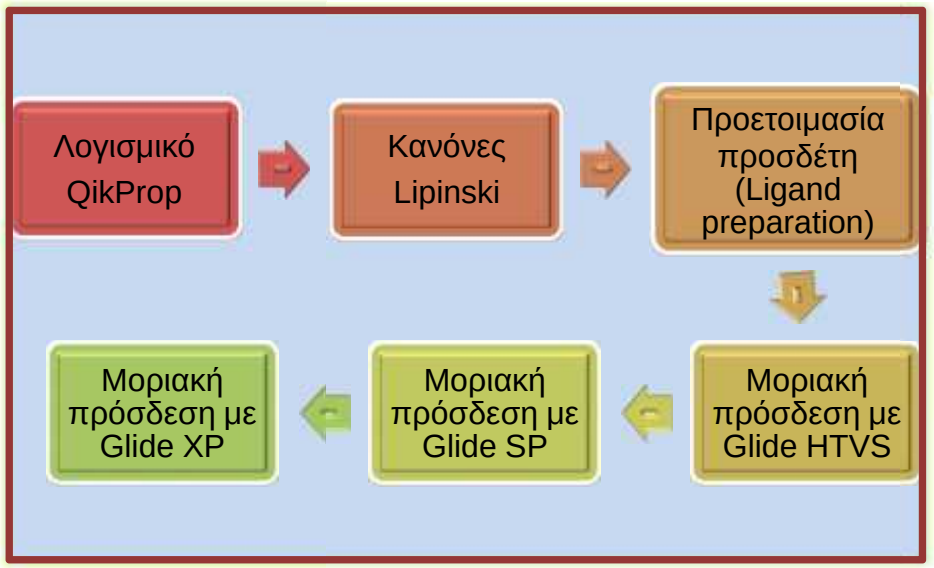
Δίνεται η δυνατότητα στο χρήστη της χρησιμοποίησης τριών τρόπων μοριακής πρόσδεσης με τον αλγόριθμο Glide, οπότε παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στα κριτήρια με τα οποία γίνονται οι υπολογισμοί.

- Glide HTVS (HTVS=High-Throughput Virtual Screening): Προτείνεται στην περίπτωση μελέτης μοριακής πρόσδεσης μεγάλων βιβλιοθηκών ενώσεων με σκοπό την εύρεση των μορίων με την μεγαλύτερη πιθανότητα ευνοϊκής πρόσδεσης στον υποδοχέα, χωρίς τη χρησιμοποίηση πολύ αυστηρών κριτηρίων όσο αφορά την τοποθέτηση του προσδέτη στο χώρο.
- Glide SP (SP=Standard Precision): Υπολογισμός μεγαλύτερης ακρίβειας για μικρότερο αριθμό μορίων.
- Glide XP (XP=EXtra Precision): Ο υπολογισμός στην περίπτωση αυτή γίνεται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια που δύναται να προσφέρει ο συγκεκριμένος αλγόριθμος. Για παράδειγμα, απορρίπτονται δομές που φέρουν ισχυρά πολικές ομάδες και είναι εκτεθειμένες στο διαλύτη (φαινόμενα αποδιαλύτωσης που μειώνουν την βαθμολογία πρόσδεσης εξαιτίας της αδυναμίας δημιουργίας δεσμών υδρογόνου-desolvation effects). Άλλο παράδειγμα των αυστηρότερων κριτηρίων που τίθενται σε αυτό τον τύπο βαθμολόγησης μοριακής πρόσδεσης παρουσιάζεται στην περίπτωση των δεσμών υδρογόνου, όπου περισσότερο σταθερός θεωρείται ο δεσμός υδρογόνου ανάμεσα σε ουδέτερους δότες-δέκτες.[13,14]

Συνδυάζοντας τους τρείς αυτούς τρόπους μοριακής πρόσδεσης σε μια διαδικασία που αποκαλείται «Ροή εργασίας της διαδικασίας εικονικής σάρωσης» (Virtual Screening Workflow), μπορούν να εξετασθούν μεγάλες βιβλιοθήκες ενώσεων ξεκινώντας από χιλιάδες ενώσεις, μειώνοντας σταδιακά τον αριθμό τους με βάση τα κριτήρια που τίθενται σε κάθε τρόπο μοριακής πρόσδεσης. Με τη διαδικασία αυτή, δύναται επίσης να φιλτραρισθεί σε αρχικό στάδιο το σύνολο των ενώσεων με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες

όπως αυτές προβλέπονται από το πρόγραμμα QikProp, που περιλαμβάνεται στη συνολική διαδικασία, όπως και να φιλτραρισθούν με βάση τα κριτήρια Lipinski.

Στο Σχήμα 2.4 παρουσιάζονται συνοπτικά τα στάδια της διαδικασίας της εικονικής σάρωσης και ακολούθως δίνεται σύντομη περιγραφή αυτών:



Σχήμα 2.4: Ροή εργασίας της διαδικασίας εικονικής σάρωσης-Virtual Screening Workflow (Schrödinger)

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.4, η διαδικασία ξεκινά με τον υπολογισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων με τη βοήθεια του QikProp. Μερικές από τις ιδιότητες οι οποίες μπορούν να υπολογιστούν είναι και οι: διαπερατότητα δέρματος (Skin permeability-log Kp), η πιθανότητα μεταβολισμού, η διαλυτότητα σε ύδωρ (Aqueous solubility-log S) κ.ά.

Στο επόμενο στάδιο γίνεται φιλτράρισμα των ενώσεων βάσει των κριτηρίων Lipinski. Έχοντας υπολογιστεί οι φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων, αποβάλλονται οι ενώσεις εκείνες που παρουσιάζουν τιμές τέτοιες που πιθανότατα τους προσδίδουν προβλήματα π.χ. αδυναμία απορρόφησης ή/και κατανομής στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι ενώσεις που προχωρούν στο επόμενο βήμα προετοιμάζονται ώστε να αποκτήσουν μια σωστή τρισδιάστατη δομή με τη διαδικασία LigPrep.

Τέλος, ακολουθούν οι υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης με Glide HTVS, Glide SP & Glide XP.[15-17]

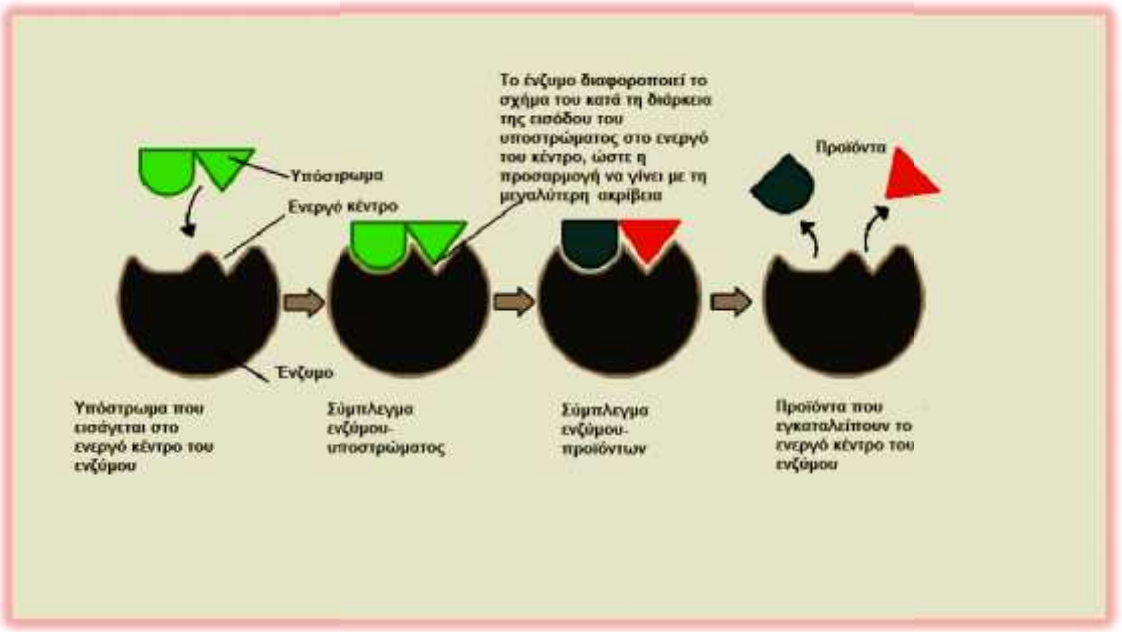
Δίνεται, επίσης, η δυνατότητα στο χρήστη χρησιμοποίησης μορίων νερού στο ενεργό κέντρο για τη μελέτη των επιδράσεων του διαλύτη στην τοποθέτηση ενός πιθανού προσδέτη στην περιοχή.[14]

Οι υπολογισμοί σε 282 περιπτώσεις διαθέσιμων συμπλεγμάτων υποδοχέων-προσδετών με το λογισμικό Glide απέδειξαν ότι η αναπαραγωγή της διαμόρφωσης απο το συγκεκριμένο λογισμικό με τη διαμόρφωση του συγκρυσταλλωμένου προσδέτη δεν διαφέρουν περισσότερο από 1 Å στις μισές περιπτώσεις και μόνο στο ένα τρίο αυτών η διαφορά είναι μεγαλύτερη από 2 Å.[9]

Το πρόβλημα του αλγόριθμου αυτού είναι ότι γίνεται χρήση μιας διαμόρφωσης του υποδοχέα συγκρυσταλλωμένου με ένα συγκεκριμένο προσδέτη, οπότε άλλα μόρια διαφορετικών διαστάσεων από τον συγκρυσταλλωμένο προσδέτη να μη δύνανται να παρουσιάζουν επιτυχείς βαθμολογίες πρόσδεσης, ακόμα και αν στην πραγματικότητα προσδένονται αποτελεσματικά. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω σημαντικών στερικών παρεμποδίσεων στη συγκεκριμένη διαμόρφωση του υποδοχέα όταν τα υπό μελέτη μόρια είναι μεγαλύτερα σε διαστάσεις από τον συγκρυσταλλωμένο προσδέτη ή λόγω μη ικανοποιητικής κατάληψης του ενεργού κέντρου όταν αυτά είναι μικρότερα. Παρόλα αυτά έχει προβλεφθεί να μπορεί ο υπολογισμός μοριακής πρόσδεσης με τη μεθοδολογία Glide να προσομοιάζει σε μικρό βέβαια, ποσοστό με το φαινόμενο επαγόμενης προσαρμογής (Induced Fit) στα Glide SP & Glide XP.[14]

2.3 Επαγόμενη προσαρμογή (Induced Fit-IF)

Ένας νέος αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης που αναπτύχθηκε από την εταιρεία Schrödinger, η οποία λαμβάνει υπόψη την ευελιξία του προσδέτη και του υποδοχέα, ονομάζεται "επαγόμενη προσαρμογή" (Induced Fit-IF).



Σχήμα 2.5: Προσαρμογή διαμόρφωσης υποδοχέα κατά την είσοδο του υποστρώματος (Induced Fit) [18]

Το λογισμικό Glide, όπως προαναφέρθηκε, είναι χρήσιμο στις περιπτώσεις που η διαμόρφωση του υποδοχέα δεν αλλάζει σημαντικά με την πρόσδεση ενός μορίου, στην περίπτωση που ο υποδοχέας πρέπει να προσαρμόσει τη διαμόρφωση του ώστε να εισαχθεί σωστά ένα συγκεκριμένο μόριο, όπως το φυσικό υπόστρωμα (Σχήμα 2.5), τότε είναι προτιμότερο να εκτελεστεί ο οποιοσδήποτε υπολογισμός μοριακής πρόσδεσης με τον αλγόριθμο IF. Η ακρίβεια της μεθόδου σε 21 περιπτώσεις υποδοχέων-προσδετών είναι μεγάλη. Σε 18 από αυτές, η διαφορά της διαμόρφωσης στο συγκρυσταλλωμένο σύμπλεγμα υποδοχέα-προσδέτη με την παραγόμενη διαμόρφωση με τον αλγόριθμο του IF παρουσίαζε RMSD ≤1.8 Å. Για τις τρείς περιπτώσεις όπου το RMSD ήταν ≥1,8 Å, ο προσδέτης είχε τοποθετηθεί σωστά και περιλαμβάνονταν όλες οι αλληλεπιδράσεις-κλειδιά.

Στη μεθοδολογία IF γίνεται συνδυασμός δύο λογισμικών: του Glide, για να παρέχεται στο υπό μελέτη μικρό μόριο η δυνατότητα ευελιξίας, και του Prime, προγράμματος της ιδίας εταιρείας, με το οποίο προσδίδεται ευελιξία και στον υποδοχέα μέσω κινήσεων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων και μιας ελάχιστης κίνησης του πρωτεϊνικού σκελετού. Με το λογισμικό Prime, επίσης, υπάρχει η δυνατότητα πρόβλεψης της σωστής δομής μιας πρωτεΐνης, και κυρίως του ενεργού της κέντρου, ακόμα και να υπάρχει η αντίστοιχη

κρυσταλλωμένη δομή. Με τη συνεισφορά αυτών των δύο λογισμικών, Glide & Prime, η μεθοδολογία IF δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη πρόβλεψης συμπλεγμάτων υποδοχέα-μορίων με ακρίβεια.

Η βαθμολόγηση της μοριακής πρόσδεσης γίνεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης} = \text{GlideScore} + 0.05*\text{PrimeEnergy} \quad (2.3)$$

Από τον παραπάνω τύπο, γίνεται κατανοητό ότι ο όρος GlideScore είναι αυτός που συνεισφέρει περισσότερο στη βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης.

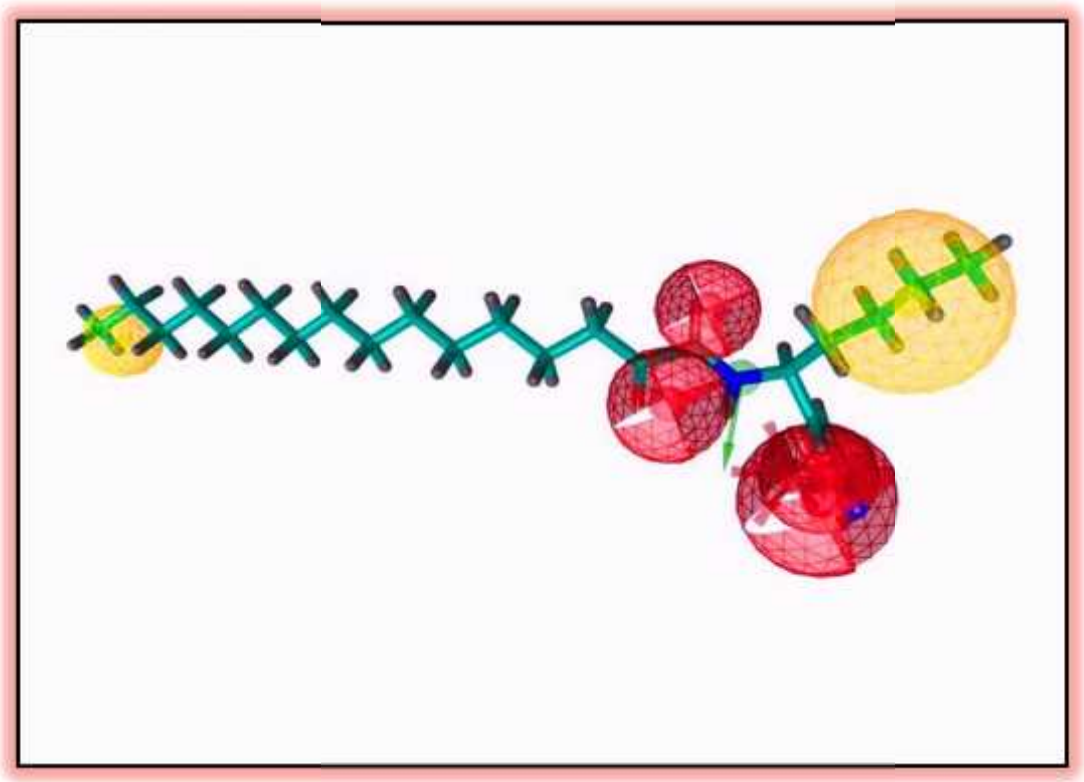
Η ροή εργασίας κατά τη διάρκεια ενός υπολογισμού μοριακής πρόσδεσης με βάση το IF πρωτόκολλο, παρουσιάζεται στο παρακάτω Σχήμα 2.6 και αποτελείται από τέσσερα βασικά στάδια:[19-21]

Σχήμα 2.6: **Βήματα που εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια υπολογισμού μοριακής πρόσδεσης με βάση τον αλγόριθμο IF.**

Η μεθοδολογία της επαγόμενης προσαρμογής μπορεί να εφαρμοστεί και στις περιπτώσεις όπου παρουσιάζονται σημαντικές διαμορφωτικές αλλαγές σε τμήματα βρόγχων (loop) των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα στις κινάσες. Και σε αυτές τις περιπτώσεις δύναται να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος εισάγοντας στην όλη διαδικασία και ένα επιπλέον βήμα, αυτό της πρόβλεψης των χαμηλών ενεργειακά διαμορφώσεων των θηλιών.[19]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο}

ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΑ ΜΟΝΤΕΛΑ



3.1 Ορθολογική προσέγγιση για την ανακάλυψη ενώσεων-οδηγών με τη χρήση φαρμακοφόρων μοντέλων

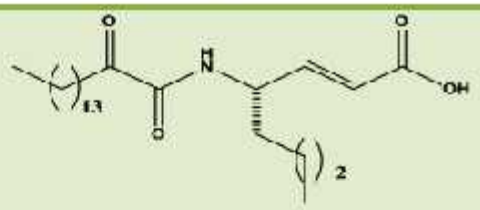
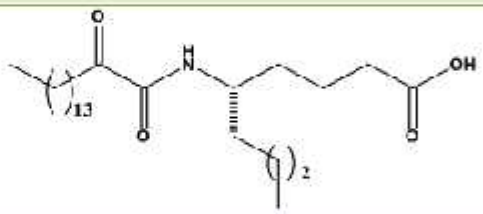
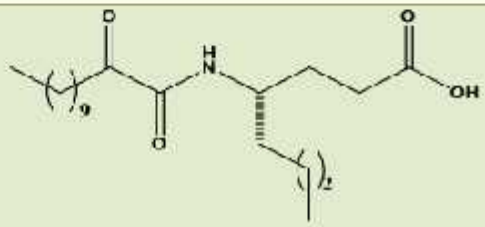
Ένας νέος ορθολογικός τρόπος προσέγγισης για την ανακάλυψη καινοτόμων φαρμακευτικών ουσιών αποτελεί αυτός της χρήσης φαρμακοφόρων μοντέλων.

Ο πρώτος ορισμός της έννοιας του φαρμακοφόρου δόθηκε το έτος 1909 από τον Ehrlich, ο οποίος όρισε ως φαρμακοφόρο ένα μοριακό σκελετό που φέρει τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για τη βιολογική δράση ενός φαρμάκου.[22] Ο πιο πρόσφατος ορισμός του φαρμακοφόρου έχει δοθεί από τη Διεθνή Ένωση Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Applied Chemistry-IUPAC). Σύμφωνα με αυτόν, το φαρμακοφόρο ορίζεται ως το σύνολο των στερητικών και ηλεκτρονιακών χαρακτηριστικών που είναι απαραίτητα για να διασφαλίσουν τη βέλτιστη αλληλεπίδραση ενός φαρμάκου και ενός συγκεκριμένου βιολογικού στόχου και που έχουν ως αποτέλεσμα την έναρξη λειτουργίας του βιολογικού στόχου ή την αναστολή λειτουργίας αυτού.[23]

Εφαρμόζονται δύο μεθοδολογίες για τη δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου : *(α) Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς (ligand-based).*

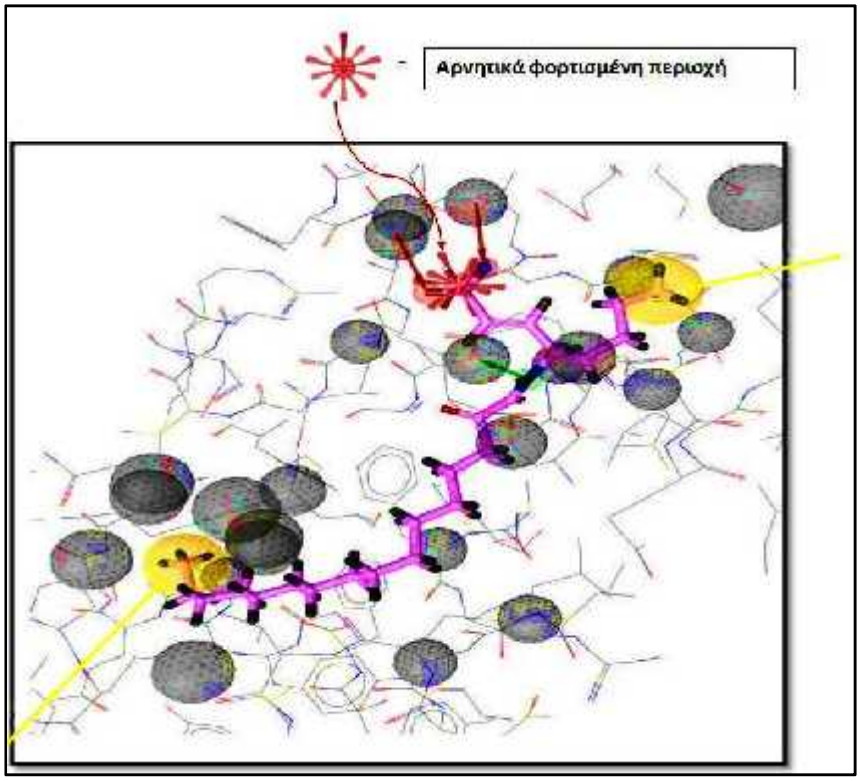
Η προσέγγιση αυτή δεν απαιτεί τη γνώση της τρισδιάστατης δομής του μακρομορίου στόχου. Η δημιουργία του φαρμακοφόρου βασίζεται στην εξαγωγή των κοινών δομικών, διαμορφωτικών και στερεοηλεκτρονιακών χαρακτηριστικών παρεμφερών ενώσεων με αυτών του μορίου αναφοράς που λειτουργεί ως υπόστρωμα, χαρακτηριστικά τα οποία θεωρούνται υπεύθυνα για τη βιοδραστικότητά τους. Οι προσεγγίσεις που είναι γνωστές ως CoMFA (Comparative Field Analysis) [24] και CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) [25] ανήκουν σε αυτή τη μεθοδολογία. Ορισμένα παρεμφερή δομικά μόρια που χρησιμοποιήθησαν (Πίνακας 3.1) υπερτίθενται με το μόριο αναφοράς για να εξαχθεί το φαρμακοφόρο μοντέλο το οποίο θα προσδίδει με ακρίβεια όλα τα απαιτούμενα στερεοηλεκτρονιακά χαρακτηριστικά για βιολογική δράση. Στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζεται το φαρμακοφόρο μοντέλο που δημιουργήθηκε στη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας για την ανθρώπινη κυτοσολική φωσφολιπάση με τη μεθοδολογία αυτή.

Πίνακας 3.1: Χημικές δομές των βιοδραστικότερων ενώσεων AX074, AX109, AX007 που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου και παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.1.

Όνομα	Χημική δομή
AX074	
AX109	
AX007	

Σχήμα 3.1: Φαρμακοφόρο μοντέλο που δημιουργήθηκε με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς. Στο σχήμα παριστάνεται το φαρμακοφόρο στο οποίο υπερτίθενται οι αναστολείς με την ισχυρότερη βιολογική δράση ως προς την $cPLA_2$: 1) AX074 (μπλε), 2) AX109 (πράσινο) και 3) AX007 (ροζ). Το φαρμακοφόρο αυτό μοντέλο αποτελείται από δύο υδρόφοβα χαρακτηριστικά (κίτρινες σφαίρες), ένα δότη δεσμού υδρογόνου (πράσινο βέλος), τέσσερις δέκτες δεσμού υδρογόνου (κόκκινες σφαίρες), και μία αρνητικά φορτισμένη περιοχή.

(β) Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος στο σύμπλεγμα προσδέματος-βιολογικού στόχου (structure-based).

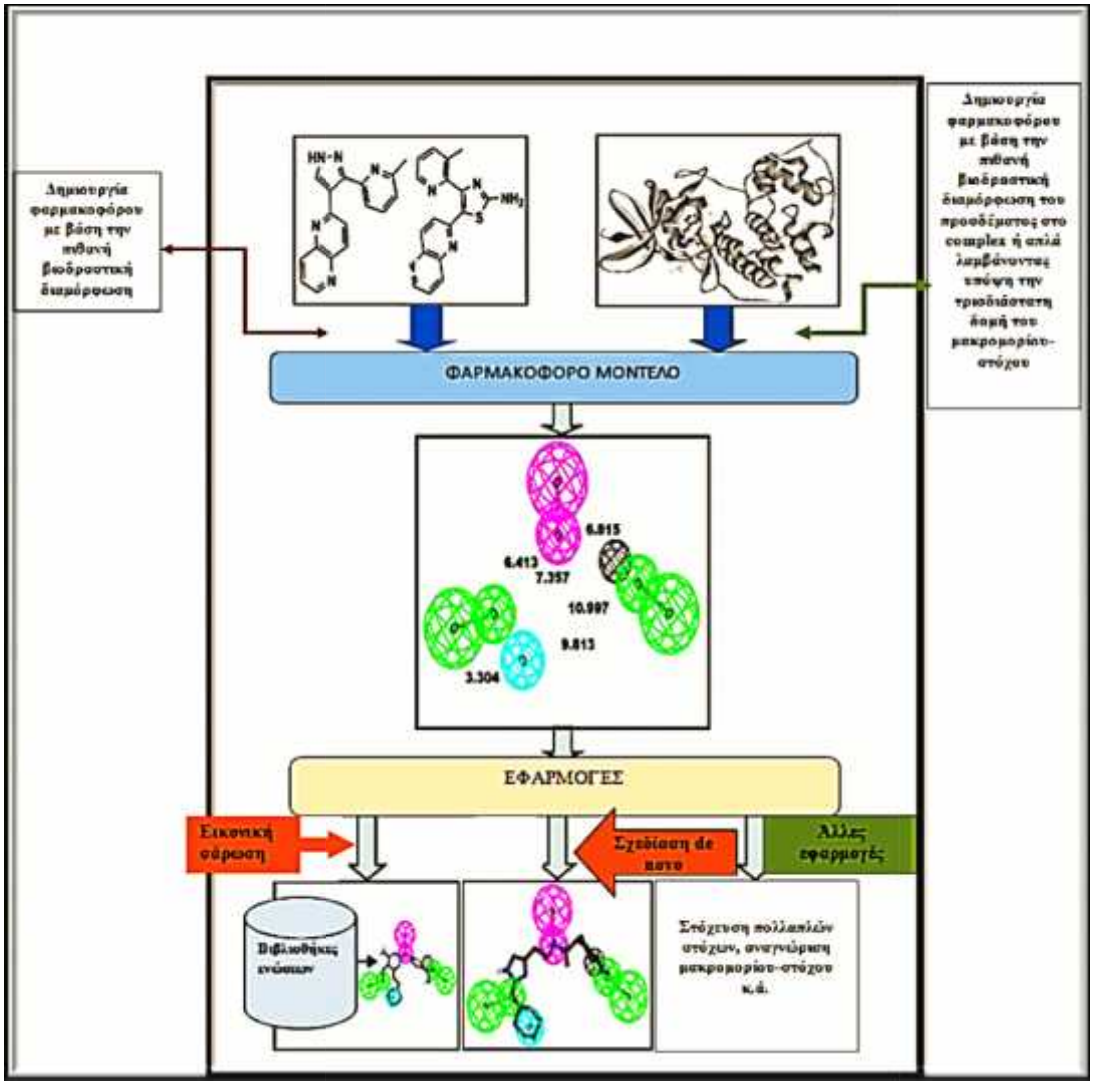


Σχήμα 3.2: Εικόνα φαρμακοφόρου μοντέλου με βάση την τρισδιάστατη (3D) δομή του συμπλέγματος μακρομορίου-προσδέματος (cPLA$_2$-AX074). Το φαρμακοφόρο μοντέλο σε αυτή την περίπτωση αποτελείται από δύο υδρόφοβα χαρακτηριστικά (κίτρινες σφαίρες), δύο δέκτες δεσμών υδρογόνου (κόκκινα βέλη), ένα δότη δεσμών υδρογόνου (πράσινο βέλος) και μία αρνητικά φορτισμένη περιοχή. Οι γκρι σφαίρες αναπαριστούν τις στερικές παρεμποδίσεις που υπάρχουν στην ενεργό περιοχή.

Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στη γνώση: i) της τρισδιάστατης απεικόνισης του μακρομορίου στόχου χωρίς την παρουσία κάποιου προσδέματος ("macromolecule (without ligand) based") ή ii) συνηθέστερα της τρισδιάστατης απεικόνισης του συμπλέγματος (complex) μακρομορίου-προσδέματος ("macromolecule-ligand-complex based"). Η τρισδιάστατη απεικόνιση λαμβάνεται συνήθως μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ ή της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού. Η υπέρθεση των μορίων στην περίπτωση αυτή γίνεται στο ενεργό, καταλυτικό ή αλλοστερικό κέντρο του υποδοχέα, νουκλεϊνικού οξέος ή βιολογικής μεμβράνης**.** Στο Σχήμα 3.2 παρουσιάζεται το φαρμακοφόρο μοντέλο που προέκυψε με βάση τη

μοριακή πρόσδεση του AX074 στο ένζυμο $cPLA_2$ κάνοντας χρήση της μεθοδολογίας της επαγόμενης προσαρμογής.

Οι δύο προαναφερόμενες προσεγγίσεις για την εξαγωγή φαρμακοφόρου μοντέλου έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στις διαδικασίες της εικονικής σάρωσης (virtual screening), στο *de novo* σχεδιασμό, και σε άλλες εφαρμογές όπως και στην 'πολυφαρμακολογία' όπου ο σχεδιασμός φαρμάκων απαιτεί τη στόχευση πολλαπλών στόχων (multitarget drug design). Η πρόοδος της υπολογιστικής χημείας (computational chemistry) τα τελευταία είκοσι χρόνια προσέφερε στη φαρέτρα του θεωρητικού φαρμακοχημικού μια μεγάλη ποικιλία ερευνητικών μεθοδολογιών στην εφαρμογή δημιουργίας ακριβέστερων φαρμακοφόρων μοντέλων.[26,27,28]



Σχήμα 3.3: Περιγραφή της δημιουργίας ενός φαρμακοφόρου μοντέλου και εφαρμογές αυτού [27,28]

3.2. Περιγραφή της μεθοδολογίας ανακάλυψης φαρμακοφόρου με βάση τη δομή του προσδέματος-βιολογικού στόχου

Στη μεθοδολογία αυτή εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης και προσδιορίζονται οι αλληλεπιδράσεις-κλειδιά μεταξύ προσδέματος-βιολογικού στόχου. Το LigandScout είναι ένα λογισμικό με το οποίο κυρίως εφαρμόζεται η μεθοδολογία δημιουργίας φαρμακοφόρου με βάση τη δομή του προσδέματος. Άλλα προγράμματα που δημιουργούν φαρμακοφόρα μοντέλα στηριζόμενα στο σύμπλεγμα προσδέματος-βιολογικού στόχου είναι τα Pocket v.2 και GBPM.

Στην περίπτωση που δεν υφίσταται τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλέγματος μακρομορίου στόχου με πρόσδεμα, η δυσκολία δημιουργίας φαρμακοφόρου αντιμετωπίζεται επιτυχώς λαμβάνοντας υπόψη μόνο την τρισδιάστατη απεικόνιση του μακρομορίου-βιολογικού στόχου, εφόσον αυτή υφίσταται. Παράδειγμα αυτού του τρόπου προσέγγισης, αποτελεί η μέθοδος ανάπτυξης φαρμακοφόρου με βάση τη δομή SBP (Structure-Based Pharmacophore) που εφαρμόστηκε με το λογισμικό Discovery Studio (Accelrys Inc.).[27] Οι LUDI (LUDI=λογισμικό) χάρτες αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο του μακρομορίου, οι οποίοι εστιάζουν στις λειτουργικές ομάδες που θα μπορούσαν να δώσουν αλληλεπιδράσεις με κάποιο μικρό μόριο [29], μετατρέπονται σε φαρμακοφόρο μοντέλο Catalyst (Catalyst:λογισμικό), το οποίο περιλαμβάνει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δότες δεσμών υδρογόνου και δέκτες δεσμών υδρογόνου.

Προβλήματα, που εμφανίζονται εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία εξεύρεσης φαρμακοφόρου με βάση τη δομή του προσδέματος-βιολογικού στόχου, έχουν σχέση με τον αριθμό των αλληλεπιδράσεων που προκύπτουν για μια συγκεκριμένη περιοχή πρόσδεσης στο μακρομόριο στόχο. Φαρμακοφόρο μοντέλο αποτελούμενο από αναπαραστάσεις αλληλεπιδράσεων περισσότερες από επτά δεν είναι κατάλληλο για πρακτικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα για την εικονική σάρωση μιας μεγάλης βιβλιοθήκης ενώσεων, γιατί με αυτό τον τρόπο καθίσταται εξαιρετικά δύσκολο να βρεθεί λύση που να ικανοποιεί την υπόθεση που θέτει το φαρμακοφόρο μοντέλο.[27]

Σε ένα φαρμακοφόρο μοντέλο κατανοείται η μοριακή βάση πρόσδεσης με το μακρομόριο, όχι μόνο της συγκρυσταλλωμένης ένωσης αναφοράς, αλλά και

για οποιαδήποτε άλλη άγνωστη ένωση που έχει τη δυνατότητα εμφάνισης των συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων (π.χ. δότες δεσμών, θετικά/αρνητικά φορτισμένα άτομα κ.ά.). Με τον τρόπο αυτό γίνεται εφικτό να ερευνηθούν μεγάλες βιβλιοθήκες ενώσεων, με απώτερο σκοπό την ανακάλυψη πρωτότυπων ενώσεων, που θα μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγοί (lead compounds) προκειμένου να διευκολύνουν την ανακάλυψη φαρμάκων με επιθυμητές ιδιότητες.[30] Η ευρέως εφαρμοζόμενη αυτή μεθοδολογία έχει παρουσιάσει αρκετές επιτυχίες τα τελευταία χρόνια, όπως για παράδειγμα την ανακάλυψη πρωτότυπων αναστολέων της DNA γυράσης.[31]

3.3 Περιγραφή της μεθοδολογίας ανακάλυψης φαρμακοφόρου με βάση τον προσδέτη

Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στη δημιουργία πολλαπλών διαμορφώσεων για κάθε ενεργό μόριο ώστε να διασφαλιστεί η διαμορφωτική του ευελιξία για κατάληψη του διαμορφωτικού χώρου (conformational space), ιδιαίτερα όταν δεν υπάρχουν δεδομένα συγκρυστάλλωσης υποδοχέα-προσδέματος.

Εκτός από την ανίχνευση της βιοδραστικής διαμόρφωσης των προσδεμάτων, ένα άλλο πρόβλημα στην εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής είναι η μη ύπαρξη ικανοποιητικού αριθμού βιολογικών δεδομένων για την επιλογή των μορίων εκγύμνασης (training set) βάσει των οποίων θα δημιουργηθεί το φαρμακοφόρο μοντέλο. Τα μόρια εκγύμνασης απαιτείται να παρουσιάζουν βιοδραστικότητα ως προς το μακρομόριο που μελετάται κάθε φορά.[27] Για την αξιολόγηση ενός φαρμακοφόρου μοντέλου που δημιουργείται με τη μεθοδολογία αυτή, συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται και μόρια τα οποία δεν παρουσιάζουν δράση και είναι δομικά παρεμφερή με αυτά που μελετώνται (decoys-παραπλανητικά).[32] Με τον τρόπο αυτό καθίσταται δυνατό να εκτιμηθεί εάν στο φαρμακοφόρο μοντέλο δύναται να “αναγνωρίζονται" οι ενώσεις που παρουσιάζουν βιολογική δράση και να απορρίπτονται τα ανενεργά μόρια.[33]

Υπάρχουν πολλά λογισμικά που υποστηρίζουν την τεχνική αυτή δημιουργίας φαρμακοφόρου μοντέλου όπως τα HipHop, PHASE, MOE κ.ά.

3.4 Διαδικασία εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο μοντέλο

Όταν δημιουργηθεί ένα φαρμακοφόρο μοντέλο, βασιζόμενο στις δύο μεθοδολογίες που περιγράφονται στα τμήματα 3.2 και 3.3, τότε

χρησιμοποιούνται βάσεις δεδομένων (compounds databases) για την εξεύρεση νέων προσδετών, διαδικασία η οποία ονομάζεται «εικονική σάρωση με βάση το φαρμακοφόρο *'pharmacophore-based Virtual Screening' (VS)*».[34] Οι ενώσεις, οι οποίες ικανοποιούν τα κριτήρια που τίθενται στο φαρμακοφόρο μοντέλο καλούνται «ενώσεις κρούσης» (hits). Είναι ενώσεις «νέοι οδηγοί», που μπορούν να οδηγήσουν σε φαρμακευτικά προϊόντα, αφού τροποποιηθούν δομικά ώστε να βελτιωθούν οι φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες.

Οι δυσκολίες που παρουσιάζονται κατά τη διαδικασία της εφαρμογής εικονικής σάρωσης οφείλονται σε δύο λόγους:

α) στη δημιουργία διαμορφώσεων για κάθε μόριο των προς μελέτη ενώσεων, και

β) στην αναγνώριση του φαρμακευτικού μοτίβου (pharmacophore pattern) δηλ. στην ανακάλυψη της διαμόρφωσης εκείνης που ικανοποιεί τα περισσότερα κριτήρια του φαρμακοφόρου μοντέλου που χρησιμοποιείται ως "οδηγός".

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που προκύπτει όταν εφαρμοστεί η εικονική σάρωση, οφείλεται στο μικρό ποσοστό εξεύρεσης ενώσεων κρούσεων και από αυτές ενώσεων που να παρουσιάζουν τελικά βιολογική δράση. Αυτό αποδίδεται σε πολλούς λόγους, ένας από τους οποίους είναι το γεγονός ότι δεν μπορεί να ληφθεί υπόψη με τις τεχνικές που περιγράφηκαν προηγουμένως, η ευελιξία του μακρομορίου-στόχου.[27]

Παρακάτω δίνονται πληροφορίες για: α) το λογισμικό LigandScout που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ερευνητική εργασία, και β) τη χρήση της βάσης δεδομένων Zinc στην πειραματική διαδικασία της εικονικής σάρωσης. Επίσης περιγράφονται «εν συντομία» οι βιβλιοθήκες ενώσεων του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου (National Cancer Institute-NCI) και Hitfinder που χρησιμοποιήθηκαν σε διαδικασία εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο.

3.5 Περιγραφή βασικών σημείων του προγράμματος LigandScout

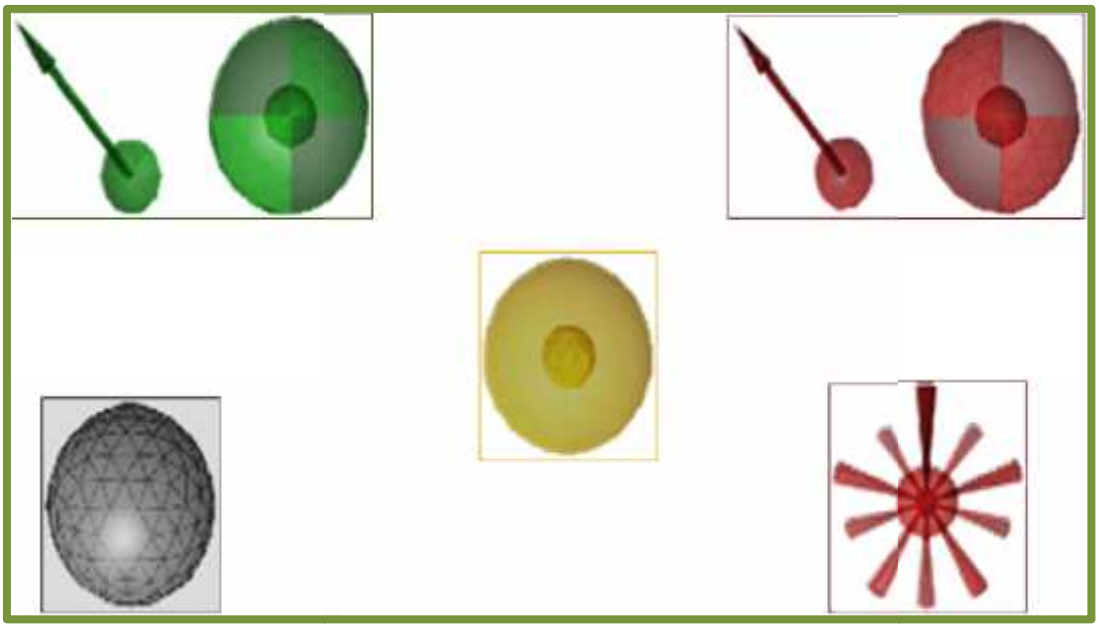
Το LigandScout είναι ένα λογισμικό της εταιρείας Inte:Ligand που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία φαρμακοφόρων μοντέλων και με τις δύο μεθοδολογίες που έχουν περιγραφεί. Αποτελείται από τέσσερα τμήματα (perspectives) στα οποία εκτελούνται διαφορετικής φύσεως εργασίες και παρέχονται ποικίλες δυνατότητες στους χρήστες για τη συλλογή των απαραίτητων πληροφοριών. Στον παρακάτω Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται τα τμήματα του λογισμικού LigandScout και οι λειτουργίες που εκτελούνται σε αυτά.

Πίνακας 3.2: Τμήματα και λειτουργίες του λογισμικού LigandScout

Τμήματα	Λειτουργίες
Structure-Based Modeling Perspective	Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την (πιθανή) βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος στο βιολογικό στόχο
Ligand-Based Modeling Perspective	Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς
Alignment Perspective	Υπερθέσεις μορίων και φαρμακοφόρων
Screening Perspective	Εικονική σάρωση με βάση το φαρμακοφόρο

Το φαρμακοφόρο μοντέλο που δημιουργείται από το λογισμικό LigandScout παριστάνεται με απεικονίσεις, οι οποίες υποδηλώνουν συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι απόρροια των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων που μελετώνται, όπως επίσης του είδους των ατόμων και της μεταξύ τους γωνίας. Για παράδειγμα, ο δεσμός υδρογόνου επιτυγχάνεται εάν η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων κυμαίνεται από 2,2-3,8 Å. Στο Σχήμα 3.4 που ακολουθεί δίνεται ο ορισμός απεικονίσεων που απαντώνται στα φαρμακοφόρα μοντέλα που δημιουργήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας

ερευνητικής εργασίας για την ανθρώπινη κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 ($cPLA_2$).



Σχήμα 3.4: Συμβολισμοί που απαντώνται στα φαρμακοφόρα μοντέλα με χρήση του λογισμικού LigandScout. Πράσινη σφαίρα ή βέλος: δότης δεσμού υδρογόνου, κόκκινη σφαίρα ή βέλος: δέκτης δεσμού υδρογόνου, γκρι σφαίρα: στερικές παρεμποδίσεις, κίτρινη σφαίρα: υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, κόκκινο "αστέρι": αρνητικά φορτισμένη περιοχή. Οι δότες ή δέκτες δεσμών υδρογόνου παριστάνονται με βέλος ή σφαίρες γιατί ο δεσμός υδρογόνου δεν εξαρτάται μόνο από την κατεύθυνση (βέλος) αλλά και από την απόσταση μεταξύ δύο ατόμων (σφαίρα).

Παρακάτω επεξηγούνται οι διάφορες λειτουργίες του λογισμικού :

· Τμήμα με την ονομασία *"Structure-Based Modeling Perspective"*: Εισάγεται το σύμπλεγμα μακρομόριο-προσδέτης και αυτομάτως δημιουργείται το φαρμακοφόρο μοντέλο που αναπαριστά τις αλληλεπιδράσεις προσδέματος-μακρομορίου. Πριν τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου ελέγχεται απαραίτητα η δομή του προσδέτη γιατί μπορεί να υπάρχει ασυμβατότητα στον τύπο αρχείου .pdb με το λογισμικό LigandScout.

· Τμήμα με την ονομασία *"Ligand-Based Modeling Perspective"*: Εισάγονται οι προσδέτες που θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου, δημιουργούνται πολλαπλές διαμορφώσεις αυτών με σκοπό τη διαμορφωτική ευελιξία για κατάληψη του διαμορφωτικού χώρου και ακολουθεί η δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου.

· Τμήμα με την ονομασία *"Alignment Perspective"*: Σε αυτό το τμήμα γίνονται υπερθέσεις φαρμακοφόρων ή / και φαρμακοφόρων / μορίων.

· Τμήμα με την ονομασία *"Screening Perspective"*: Τα φαρμακοφόρα που δημιουργούνται με τις μεθοδολογίες «Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την (πιθανή) βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέτη στο βιολογικό στόχο» και «Δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς», μπορούν να "μεταφερθούν" σε αυτό το τμήμα μέσω του Copyboard Widget και να ακολουθήσει εικονική σάρωση με βάση το φαρμακοφόρο οποιασδήποτε βιβλιοθήκης ενώσεων επιλέξει ο χρήστης.[30]

3.6 Zinc: Χωρίς περιορισμούς τράπεζα δεδομένων εμπορικώς διαθέσιμων ενώσεων για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της εικονικής σάρωσης (Virtual Screening) [35,36]

Μία από τις μεγαλύτερες δυσκολίες της διαδικασίας της εφαρμογής της εικονικής σάρωσης είναι η έλλειψη κατάλληλης τράπεζας δεδομένων μικρών μορίων για χρήση. Υπάρχουν τράπεζες δεδομένων που η πρόσβαση σε αυτές απαιτεί χρηματική συμβολή και άλλες οι οποίες περιέχουν ενώσεις μη κατάλληλα δομημένες (π.χ. λείπει η γνώση απόλυτης απεικόνισης των χειρόμορφων κέντρων).

Για να είναι, επίσης, χρήσιμη μια συλλογή ενώσεων, θα πρέπει να υπάρχει πληροφορία, εκτός από τη τρισδιάστατη δομή των ενώσεων που περιέχει, και για τον προμηθευτή. Επιπλέον, θα πρέπει να παρέχονται πληροφορίες για τη διαμορφωτική τους ευελιξία, να είναι γνωστές οι πολλαπλές καταστάσεις πρωτονίωσης τους (ταυτομερείς μορφές), η στερεοχημεία τους, οι ιδιότητες ισομερών θέσεως (regiochemical) και η απόλυτη απεικόνιση των χειρόμορφων κέντρων τους. Τέλος, είναι απαραίτητο η βάση δεδομένων να ενημερώνεται ταυτόχρονα με την ενημέρωση των καταλόγων των προμηθευτών.

Μερικές από τις βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιούνται, με αρκετά μειονεκτήματα όπως αυτά που προαναφέρθηκαν (έλλειψη διαμορφωτικών, στερεοχημικών και φυσικοχημικών δεδομένων) είναι οι εξής:

- Accelrys Available Chemicals Directory (ACD), (http://accelrys.com/products/databases/sourcing/available-chemicals-directory.html)
- ChemNavigator database (http://www.chemnavigator.com)
- Ligand.Info database (http://Ligand.info)
- ChemBank project (http://chembank.med.harvard.edu)
- Chemspider (http://www.chemspider.com)

Κριτήρια για τη δημιουργία της βάσης Zinc, όπως περιγράφονται στο άρθρο από τους δημιουργούς της, είναι τα εξής:

1. Οι ενώσεις, που περιέχονται στη βάση, να είναι εμπορικά διαθέσιμες ώστε να είναι δυνατό να αποτιμηθούν βιολογικά στην περίπτωση που μια δοκιμασία εικονικής σάρωσης παρουσιάσει δυνάμει προσδέματα ενός μακρομορίου. Για το λόγο αυτό, έχουν δημιουργηθεί οκτώ κατάλογοι (Πίνακας 3.3) που βασίζονται σε ιδιότητες όπως κόστος, χρόνος παράδοσης, ποσότητα που διατίθεται προς πώληση ώστε ο χρήστης να βρίσκει ακριβώς αυτό που τον ενδιαφέρει.

Πίνακας 3.3: Κατάλογοι βάσης δεδομένων Zinc

Είδη ενώσεων	***Απόδοση στα Ελληνικά***
building blocks	**δομικά τμήματα**
screening compounds	**ενώσεις σάρωσης**
procurement agents	**προμηθεύσιμες ενώσεις**
make-on-demand	**ενώσεις που παρασκευάζονται κατόπιν απαίτησης**
natural product	**φυσικά προϊόντα**
collabocules	**ενώσεις προερχόμενες από συνεργαζόμενες πηγές**
annotated	**προσαρτημένες ενώσεις**
boutique	**ενώσεις νεωτερισμού**

2. Υποσύνολα ενώσεων με μεταβλητές ιδιότητες όπως λειτουργικές ομάδες, μοριακό βάρος, και υπολογισμένο logP, να είναι εύκολες στη δημιουργία και διαχείρισή τους στη βάση.

3. Η βάση δεδομένων πρέπει να παρέχει πολλαπλές καταστάσεις πρωτονίωσης, ταυτομερείς μορφές, στερεοχημεία, προμηθευτές, και δυνατότητα ύπαρξης των απαραίτητων 3D διαμορφώσεων για τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης. Οι τρισδιάστατες απεικονίσεις των μορίων θα πρέπει να είναι αυτές που πιθανότατα να εμφανίζονταν σε κάποιο σύμπλεγμα μακρομορίου-προσδέματος.
4. Θα πρέπει να είναι εύκολο να γίνεται προσθήκη νέων μορίων, να υπάρχει ένα είδος ταυτότητας των ενώσεων για να γίνεται ευκολότερος ο εντοπισμός αυτών και των πληροφοριών που τις συνοδεύουν, να είναι εύκολη η αφαίρεση των ενώσεων που δεν είναι πλέον διαθέσιμες, και η διόρθωση αυτών που παρουσιάζουν λάθη, για παράδειγμα στις νέες ενώσεις που προστίθενται να υπάρχει δυνατότητα δημιουργίας του συνόλου των δυνατών καταστάσεων πρωτονίωσης.
5. Τέλος, η βάση θα πρέπει να είναι εύχρηστη στη διαχείρισή της, δηλαδή να παρέχει χρήσιμα υποσύνολα ενώσεων, να είναι εύκολη η αναζήτηση των ενώσεων, να είναι έτοιμη προς χρήση χωρίς να απαιτείται καμιά επιπλέον διαδικασία προετοιμασίας των μορίων, και θα πρέπει να ανανεώνεται τακτικά.

3.6.1 Μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία της βάσης

3.6.1.1 Πηγές ενώσεων και φίλτρα επιλογής αυτών

Στη βάση δεδομένων Zinc χρησιμοποιούνται 134 κατάλογοι προμηθευτών και συμπεριλαμβάνονται και ενώσεις που έχουν αναφερθεί σε περισσότερες από είκοσι άλλες βάσεις ενώσεων (π.χ.Drugbank, ChEMBL, PubChem). Στην τελευταία αυτή περίπτωση, η Zinc παρέχει ολόκληρη την αντίστοιχη βάση ενώσεων και ένα υποσύνολο αυτής με ενώσεις που πιθανότατα να είναι εμπορικά διαθέσιμες. Η επιλογή των ενώσεων που μπορεί να βρει κάποιος χρήστης στη Zinc γίνεται με βάση τα εξής κριτήρια:

- το μοριακό βάρος(<700),
- LogP (-4 <LogP< 6),
- δότες δεσμών υδρογόνου (<6)
- δέκτες δεσμών υδρογόνου (<11)

- αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών (<15).

Στη βάση δεδομένων δεν προστέθηκαν ενώσεις που περιλαμβάνουν άτομα πέρα των H,C,N,O,F,S,P,Si,Cl,Br,I με ελάχιστες εξαιρέσεις.

Χρησιμοποιείται, επίσης, φίλτρο για να αφαιρεθούν ανεπιθύμητες ενώσεις, οι οποίες θεωρούνται μη κατάλληλες από τους δημιουργούς της Zinc για τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης. Για παράδειγμα, αφαιρούνται τα αλκυλαλογονίδια που θεωρούνται πολύ δραστικές ενώσεις ή μόρια που περιέχουν μέταλλα ή βόριο γιατί δεν υφίστανται παράμετροι για αυτά τα άτομα στο πεδίο δυνάμεων MMFF94.[37] Στο διαδικτυακό χώρο http://blaster.docking.org/filtering παρέχονται πληροφορίες για τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για το αρχικό φιλτράρισμα των ενώσεων που θα συμπεριληφθούν στην βάση δεδομένων Zinc. Κάθε χρήστης της Zinc μπορεί να επιλέξει ενώσεις από τα υποσύνολα που καλούνται "πρότυπες" (standard) στα οποία δεν περιέχονται μόρια πολύ δραστικά και προβληματικά και υπάρχει, επίσης, η δυνατότητα επιλογής των υποσυνόλων που καλούνται "επιθυμητά" (clean) τα οποία περιέχουν μόρια με πρόσφορες λειτουργικές ομάδες (benign).

3.6.1.2 Προετοιμασία μορίων-Πρωτόκολλο

Πραγματοποιείται μετατροπή των 2D SDF αρχείων των προμηθευτών σε SMILES με την χρησιμοποίηση του λογισμικού OpenEye’s OEChem. Τυπικά, το 70% των μορίων είναι μη χειρόμορφα και δεν εμφανίζουν δομική ασάφεια. Για τα υπόλοιπα οι πληροφορίες που παρέχονται από τους προμηθευτές είναι ασαφείς. Το γεγονός ότι οι περισσότερες εμφανίζουν ένα ή δύο στερεογονικά κέντρα δομικής ασάφειας καθιστά τη δημιουργία δύο και τεσσάρων στερεοισομερών. Παρέχεται η δυνατότητα στον χρήστη να χρησιμοποιήσει μία απεικόνιση του μορίου για γρηγορότερη σάρωση ή τη χρησιμοποίηση υποομάδων της βάσης που δεν εμφανίζουν δομικές ασάφειες.

- Για να εξασφαλιστεί η μοναδικότητα στη βάση, δημιουργείται μια "δοκιμαστική" (trial) τρισδιάστατη δομή με το λογισμικό Corina [38] για κάθε ένωση που θα περιληφθεί στη Zinc ώστε να της δοθεί ένας μοναδικός αριθμός "ταυτότητας" που θα τη χαρακτηρίζει. Στη συνέχεια, η δοκιμαστική αυτή δομή μελετάται σε 4 περιοχές pH χρησιμοποιώντας την

εφαρμογή Schrodinger’s Epik version 2.1209 (περιλαμβάνονται για παράδειγμα οι αποπρωτονιώσεις καρβοξυλικών οξέων και τετραζολών και οι πρωτονιώσεις των περισσότερων αλειφατικών αμινών). Οι τέσσερις περιοχές pH είναι οι: α. pH = 7,05, β. pH = 6-8, γ. pH = 7-9,5, δ. pH = 4,5-6. Οι περιοχές αυτές εξασφαλίζουν την ορθή σε κάθε περιοχή pH ταυτομερή μορφή. Οι περισσότερες πρωτεΐνες απαιτούν τρισδιάστατες ταυτομερείς μορφές προσδετών που να είναι συμβατές με περιοχές pH τιμών (6-8) αφού οι φυσιολογικές λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών παρατηρούνται στις «εν λόγω» τιμές pH. Υπάρχουν και παραδείγματα όπως οι περιοχές πρόσδεσης των μεταλλοενζύμων που απαιτούν διαμορφώσεις συμβατές με υψηλότερες τιμές pH (8-9). Τέτοιο παράδειγμα, αποτελεί τα αποπρωτονιωμένα σουλφοναμίδια. Ακολουθεί η εφαρμογή του λογισμικού OpenEye’s Omega για τη δημιουργία 3D μοντέλων. Με τη χρήση του λογισμικού AMSOL [39] υπολογίζονται τα μερικά ατομικά φορτία, τα οποία θεωρούνται σημαντικοί ηλεκτροστατικοί παράγοντες, για τη διαμόρφωση κάθε κατάστασης πρωτονίωσης, στερεοϊσομερούς, και ταυτομερούς.

- Για τα μόρια που περιέχονται στη βάση Zinc δίνονται πληροφορίες για τις μοριακές ιδιότητές τους. Αυτές περιλαμβάνουν το μοριακό βάρος, τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών, το logP, τον αριθμό των δοτών δεσμών υδρογόνου, τον αριθμό των δεκτών δεσμών υδρογόνου, υπολογιζόμενα από το λογισμικό Molinspiration’s mib. Δίνονται, επίσης, πληροφορίες για τον αριθμό των χειρόμορφων κέντρων, τον αριθμό των διπλών δεσμών (E/Z ισομερή) και τον αριθμό των άκαμπτων τμημάτων. Για τις πολικές και άπολες ένεργειες αποδιαλύτωσης (desolvation) χρησιμοποιείται το λογισμικό AMSOL (πρωτόκολλο Wei).
- Ειδικά, για τον υπολογισμό logP για κάθε ένωση που αποθηκεύεται στην Zinc, χρησιμοποιείται η εφαρμογή που παρέχεται από την Molinspiration, και συμφωνεί με τις πειραματικά υπολογισμένες logP για μεγάλη ποικιλία ενώσεων. Η εφαρμογή αυτή στηρίζεται στον αλγόριθμο xLogP (Wang).[40]
- Για κάθε μόριο, επίσης, δίνονται πληροφορίες για τον προμηθευτή και τον αριθμό καταλόγου για κάθε εμπορική πηγή της ένωσης. Επίσης, όποτε

αυτό είναι δυνατόν παρέχονται πληροφορίες για τη βιολογική δραστηριότητα και λειτουργικότητα των ενώσεων.

3.7 Δομή της Zinc

Η βάση δεδομένων σχεδιάστηκε με τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται εύκολα η προσθήκη μιας νέας ένωσης, να υπάρχουν υποομάδες ενώσεων με βάση τις ιδιότητες που προαναφέρθηκαν και να μπορεί ο χρήστης να δημιουργήσει το ερωτηματολόγιό του ώστε να εντοπίσει την ομάδα ενώσεων που τον ενδιαφέρει. Επίσης, έχει προβλεφθεί η εύκολη πρόσβαση στην βάση (download). Για αυτό το λόγο οι διάφορες υποκατηγορίες ενώσεων παρέχονται σε συμπιεσμένους φακέλους που παραλαμβάνονται μέσω του διαδικτύου με γρήγορους ρυθμούς (ready-to-download compressed files).

Η διαδικτυακή τοποθεσία της βάσης δεδομένων βρίσκεται στη διεύθυνση **http://zinc.docking.org** και περιλαμβάνει πάνω από 20 εκατομμύρια εμπορικώς διαθέσιμα μόρια σε διαμορφώσεις που απαντώνται σε βιολογικά συστήματα. Οι ενώσεις κατηγοριοποιούνται και σε άλλες κατηγορίες εκτός των "πρότυπων" και "επιθυμητών" που προαναφέρθηκαν. Για παράδειγμα υπάρχει το υποσύνολο υπό τον τίτλο *"ενώσεις που προσομοιάζουν τις οδηγούς" (lead-like)* οι οποίες έχουν εύρος μοριακών βαρών 150 - 350, logP < 4, αριθμό δοτών δεσμών υδρογόνου≤3, αριθμό δεκτών δεσμών υδρογόνου ≤6 και το υποσύνολο "δομικά τμήματα που προσομοιάζουν αυτά που μπορούν να προσδώσουν βιολογικές ιδιότητες*" (fragment-like)* τα οποία έχουν τιμές -2 <logP< 3, λιγότερους από τρεις δότες δεσμών υδρογόνου, λιγότερους από 6 δέκτες δεσμών υδρογόνου, λιγότερους από τρείς περιστρεφόμενους δεσμούς και μοριακό βάρος μικρότερο από 250. Εμφανίζονται και άλλα υποσύνολα ενώσεων, όπως για παράδειγμα το υποσύνολο υπό τον τίτλο "φυσικά προϊόντα" ή το υποσύνολο "μεταβολίτες".

Αξίζει, εδώ να αναφερθεί ότι στη Zinc περιλαμβάνονται ενώσεις που παραβιάζουν τον κανόνα του Lipinski εξαιτίας υψηλών τιμών logP. Αυτό συμβαίνει λόγω της αβεβαιότητας των υπολογιζόμενων αυτών τιμών.

Οι ενώσεις της βάσης παρέχονται στους χρήστες σε αρχεία SMILES, mol2, SDF, DOCK flexible.

3.8 Αναζήτηση στην ZINC

Οι χρήστες έχουν τη δυνατότητα αναζήτησης κάνοντας χρήση διαφόρων κριτηρίων, όπως για παράδειγμα αυτό της δόμησης της συγκεκριμένης προς μελέτη ένωσης. Άλλα κριτήρια μπορούν να είναι η βιολογική δραστικότητα, οι φυσικές ιδιότητες, ο προμηθευτής, το όνομα μιας ένωσης ακόμα και το μακρομόριο στόχος μιας ερευνητικής προσπάθειας.

Στο Σχήμα 3.5 που παριστά το διαδικτυακό χώρο της τράπεζας δεδομένων Zinc αναγράφονται οι τρόποι που μπορεί να χρησιμοποιήσει ένας χρήστης προκειμένου να αναζητήσει τις επιθυμητές για εκείνον ενώσεις δεδομένων αναλόγως του ερευνητικού του στόχου.

Σχήμα 3.5: Διαδικτυακός χώρος : http://zinc.docking.org

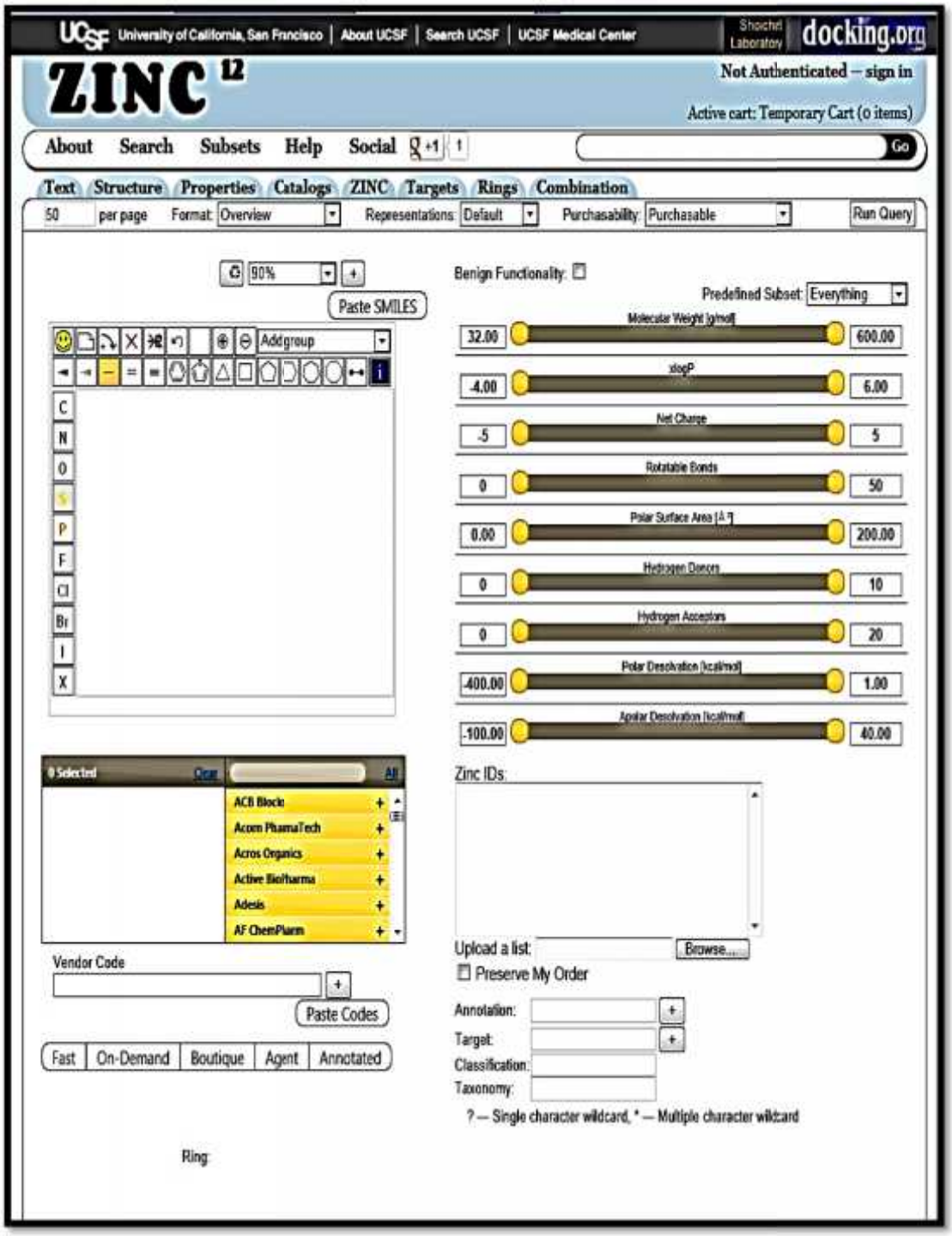
Οι τρόποι αυτοί είναι: (α) Μέσω λέξεων-κλειδιών στην στήλη Text (κείμενο). (β) Σχεδιάζοντας την επιθυμητή δομή στην στήλη Structure (δομή). (γ) Μέσω των φυσικών ιδιοτήτων (Properties). Παρέχεται η δυνατότητα στο χρήστη να ορίσει το εύρος των τιμών που επιθυμεί να έχουν οι φυσικές ιδιότητες που

παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.5 και οι οποίες αποδίδονται στα ελληνικά στον Πίνακα 3.4 .

Πίνακας 3.4: Απόδοση όρων Σχήματος 3.5 στα ελληνικά

Φυσικές ιδιότητες	***Απόδοση στα ελληνικά***
Molecular Weight [g/mol]	Μοριακό Βάρος
xlogP	-
Net Charge	Ολικό φορτίο
Rotatable Bonds	Περιστρεφόμενοι δεσμοί
Polar Surface Area	Πολική επιφάνεια
Hydrogen Donors	Δότες δεσμών υδρογόνου
Hydrogen Acceptors	Δέκτες δεσμών υδρογόνου
Polar Desolvation [kcal/mol]	Πολική αποδιαλύτωση
Apolar Desolvation [kcal/mol]	’Απολη αποδιαλύτωση

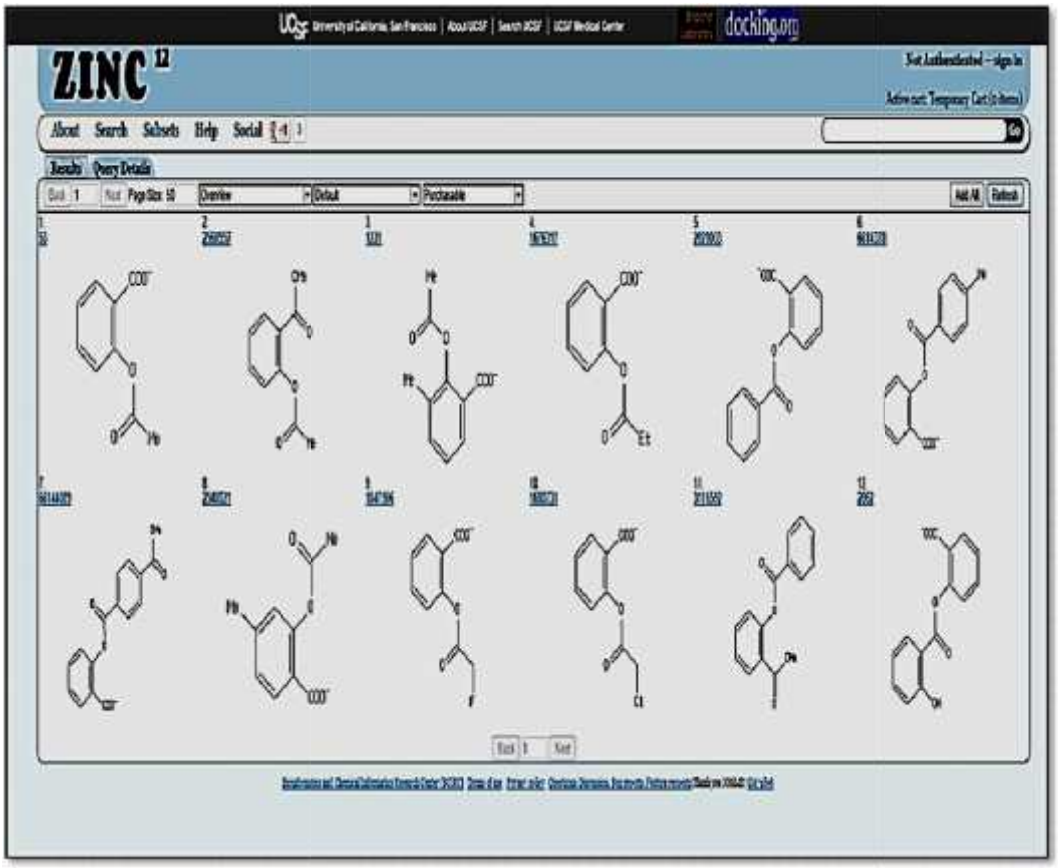
(δ) Με βάση τους καταλόγους στη στήλη Catalogs και την ταυτότητα που έχει λάβει μια ένωση που συμπεριλαμβάνεται στην Zinc. (ε) Ανάλογα του επιθυμητού βιολογικού στόχου (στήλη Targets). (στ) Στη στήλη Rings αναζητούνται ενώσεις που περιέχουν το δακτύλιο που ο χρήστης θα ορίσει π.χ. σκελετό ανθρακενίου. (η) Τέλος, στη στήλη Combination υπάρχει ένας σύνθετος τύπος ερωτηματολογίου που περιλαμβάνει όλα τα προηγούμενα κριτήρια αναζήτησης. Στο Σχήμα 3.6 που ακολουθεί παρουσιάζεται ένα σύνθετο ερωτηματολόγιο όπου διακρίνονται τα επιμέρους κριτήρια αναζήτησης όπως οι φυσικές ιδιότητες, η δυνατότητα σχεδίασης δομών, η δυνατότητα επιλογής καταλόγων καθώς και τα υπόλοιπα κριτήρια αναζήτησης που μπορεί ένας χρήστης να χρησιμοποιήσει στην τράπεζα δεδομένων Zinc.



Σχήμα 3.6: Ερωτηματολόγιο σύνθετης αναζήτησης, διαδικτυακός χώρος: http://zinc.docking.org

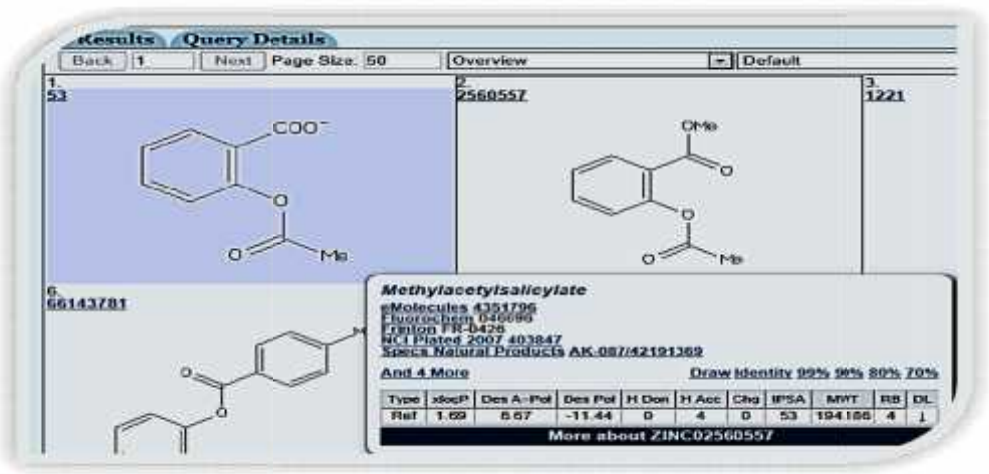
Τα αποτελέσματα της αναζήτησης μπορεί ο χρήστης να τα επιθεωρήσει είτε σε πολύ λίγο χρόνο ή περιμένοντας περισσότερο αν δόθηκαν περισσότερο περίπλοκα ερωτηματολόγια. Στο παρακάτω Σχήμα 3.7 φαίνονται τα αποτελέσματα της αναζήτησης, σχεδιάζοντας π.χ. τον τύπο της ασπιρίνης και ζητώντας να βρεθούν επιπλέον και οι δομές που ομοιάζουν κατά 90% με τον τύπο που σχεδιάστηκε. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα στον

χρήστη να δημιουργήσει τα υποσύνολα ενώσεων που επιθυμεί για μετέπειτα χρήση.



Σχήμα 3.7: Αποτελέσματα αναζήτησης της ασπιρίνης και παρεμφερών δομών στη βάση δεδομένων Zinc (Διαδικτυακός χώρος: http://zinc.docking.org)

Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 3.7, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναζήτησης με τον κωδικό με τον οποίο καταχωρήθηκε το κάθε μόριο στη βάση, συνοδευόμενο από τη δισδιάστατη δομή του. Με ανακύληση του ποντικιού σε κάθε δομή παρέχονται επιπλέον πληροφορίες, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.8 :



Σχήμα 3.8: Με ανακύληση του ποντικιού στη δομή με αριθμό ταυτότητας Zinc 02560557 παρέχονται επιπλέον πληροφορίες για τη συγκεκριμένη ένωση.

Παρακάτω παρατίθεται ένα παράδειγμα για το πως μπορεί ένας χρήστης να χρησιμοποιήσει τη βάση δεδομένων Zinc προκειμένου να διευκολυνθεί στη διαδικασία της εικονικής σάρωσης.

Πρόβλημα : Χρήστης επιθυμεί να ανακαλύψει προσδέματα (ligands) δυνάμει καινοτόμα υποψήφια φάρμακα για μια πρωτεΐνη-στόχο. Απαιτείται, λοιπόν, μια βιβλιοθήκη εμπορικώς διαθέσιμων ενώσεων της κατηγορίας "lead-like". Τα βήματα που πρέπει να ακολουθήσει για να πραγματοποιήσει τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης με σκοπό την ανακάλυψη νέων ενώσεων-οδηγών περιγράφονται στη συνέχεια:

Α) Από τον κατάλογο Subsets επιλέγει Properties. Β) Στον οριζόντιο άξονα επιλέγει τη στήλη lead-like. Γ) Στον κάθετο άξονα επιλέγει την γραμμή Standard. Δ) Επιλέγεται ο τίτλος lead-like στην πάνω αριστερά γωνία του πίνακα όπου διασταυρώνονται οι επιλογές των περιπτώσεων (Β) & (Γ). Ε) Ο χρήστης επιλέγει πως θα αποθηκεύσει τη βιβλιοθήκη του υποσυνόλου lead-like για να τη χρησιμοποιήσει στη διαδικασία της εικονικής σάρωσης. Παρέχονται οι δυνατότητες της αποθήκευσης σε SDF ή MOL2 ή flexibase ή SMILES αρχεία. Επιλέγεται η καρτέλα Downloads αμέσως μετά το κύριο μενού εντολών της ιστοσελίδας της Zinc όταν ο χρήστης επιθυμεί οι ενώσεις που θα χρησιμοποιήσει στη διαδικασία της εικονικής σάρωσης να είναι συμβατές με συγκεκριμένες περιοχές pH.

Στο άρθρο [36] των John.J.Irwin και συνεργατών του παρατίθενται και άλλα χρήσιμα παραδείγματα για τη χρήση της Zinc.

3.9 Διαδικτυακός χώρος : http://www.molinspiration.com

Στο διαδικτυακό αυτό χώρο, ο χρήστης έχει τη δυνατότητα να υπολογίσει σημαντικές μοριακές ιδιότητες μιας ένωσης, όπως για παράδειγμα τον αριθμό των δοτών δεσμών υδρογόνου, καθώς και την πιθανότητα βιοδραστικότητας της ένωσης σε μακρομόρια που αποτελούν τους σημαντικότερους στόχους φαρμάκων.

3.9.1 Υπολογισμός μοριακών ιδιοτήτων

- logP: Συντελεστής μερισμού στο σύστημα οκτανόλης νερού. Χρησιμοποιείται σε μελέτες QSAR (Ποσοτικές σχέσεις δομής δράσης) και στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων ως κριτήριο της λιποφιλίας του μορίου. Η λιποφιλία επηρεάζει την απορρόφηση των φαρμάκων από τον οργανισμό, τη βιοδιαθεσιμότητα, τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις φαρμάκου–υποδοχέα, το μεταβολισμό και την τοξικότητά τους. Υπάρχουν πολλά συστήματα υπολογισμού της παραμέτρου logP.[41] miLogP: Μέθοδος που χρησιμοποιείται στο διαδικτυακό χώρο http://www.molinspiration.com/ για τον υπολογισμό του logP. Για το 50,5% των μορίων που έχει υπολογιστεί το logP με τη μέθοδο miLogP και έχει συγκριθεί με την πειραματικά υπολογιζόμενη τιμή logP έχει βρεθεί σφάλμα < 0,25, στο 80.2% σφάλμα < 0,5, και στο 96,5% σφάλμα < 1,0. Μόνο στο 3,5% των μορίων παρατηρήθηκε σφάλμα μεγαλύτερο από 1,0.

- Μοριακή Πολική Επιφάνεια (Molecular Polar Surface Area TPSA): Θεωρείται κριτήριο απορρόφησης ενός φαρμάκου με αντιστρόφως ανάλογη σχέση. Σχετίζεται με την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου.[42]

- Κανόνας Lipinski ή "κανόνας των 5"[43] : Σύμφωνα με αυτό τον κανόνα, τα μόρια που είναι περισσότερο πιθανό να έχουν κατάλληλες βιοφαρμακευτικές ιδιότητες είναι αυτά που έχουν logP≤ 5, μοριακό βάρος≤ 500, δέκτες δεσμών υδρογόνου ≤ 10, δότες δεσμών υδρογόνου≤ 5. Μόρια που παραβιάζουν δύο ή περισσότερα κριτήρια του κανόνα αυτού πιθανόν να παρουσιάζουν πρόβλημα βιοδιαθεσιμότητας κατά την χορήγηση από το στόμα.

- Αριθμός περιστρεφόμενων δεσμών (Number of Rotatable Bonds–nrotb): Κριτήριο της μοριακής ευελιξίας.
- Μοριακός όγκος (Molecular volume): Η ιδιότητα αυτή αποτελεί ένα από τα φαρμακοχημικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τόσο τη διαπερατότητα όσο και την πρόσδεση στον υποδοχέα, σχετιζόμενο με το μέγεθος και την ευκαμψία της κοιλότητας του ενεργού κέντρου. [44-47]

3.9.2 Υπολογισμός πιθανότητας βιοδραστικότητας

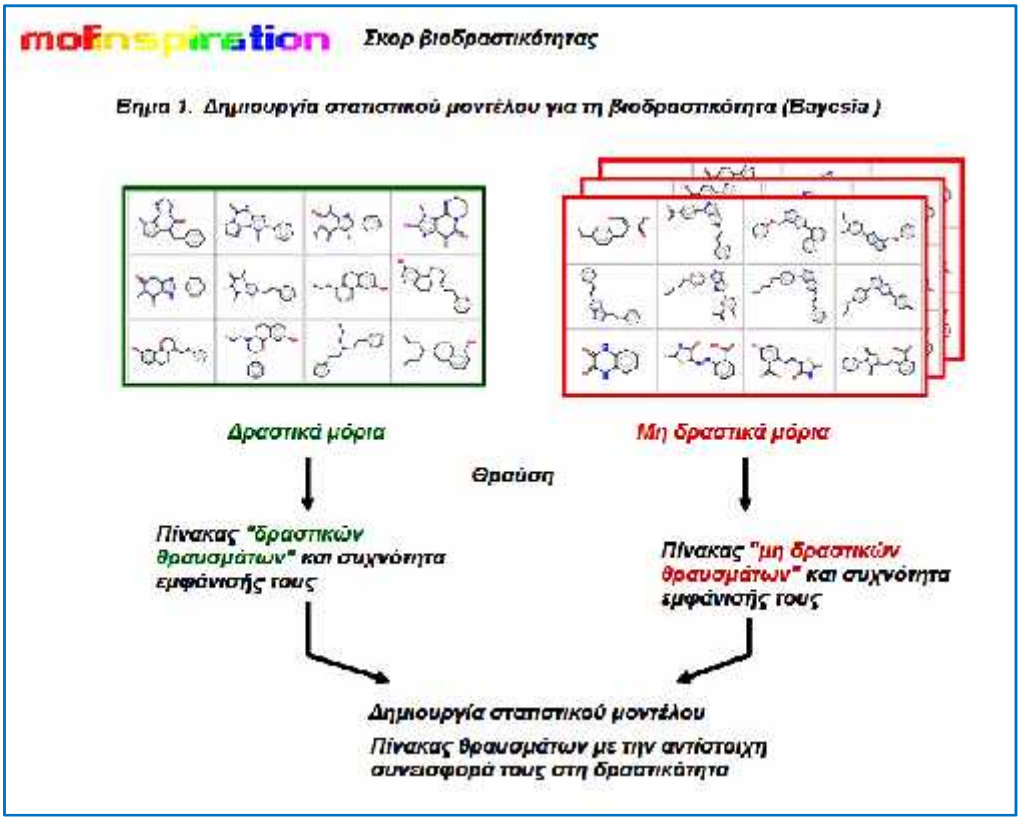
Η φαρμακομοριακή ομοιότητα (druglikeness) μπορεί να οριστεί ως μια περίπλοκη ισορροπία διαφόρων μοριακών ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών στη δομή ενός μορίου, τα οποία οδηγούν στο συμπέρασμα αν μια συγκεκριμένη ουσία προσομοιάζει με κάποιο γνωστό φάρμακο. Αυτές οι ιδιότητες, κυρίως η λιποφιλία, η ηλεκτρονική διασπορά, το μέγεθος του μορίου, η ευελιξία του, τα χαρακτηριστικά που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε δεσμούς υδρογόνου, όλα αυτά μαζί με άλλα φαρμακομοριακά χαρακτηριστικά επηρεάζουν την συμπεριφορά ενός μορίου σε ένα ζωντανό οργανισμό συμπεριλαμβανόμενης της βιοδιαθεσιμότητας, της μεταφοράς του μορίου, της τοξικότητας και της μεταβολικής σταθερότητας (metabolic stability).

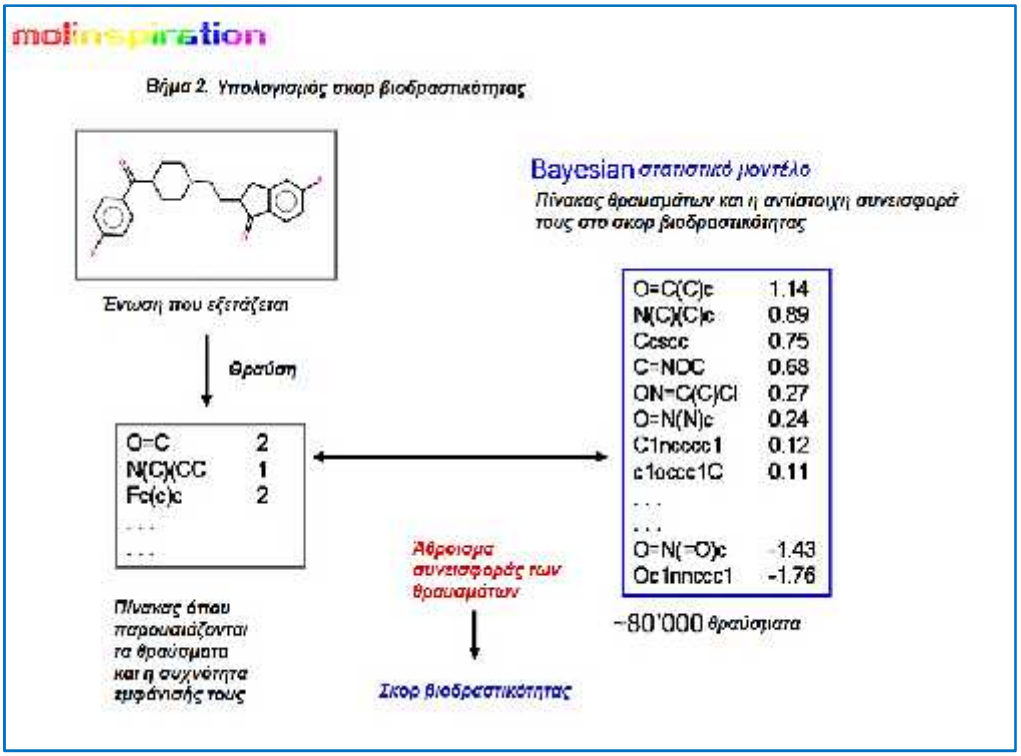
Η ποικιλία των φαρμακευτικών στόχων (καθένας από τους οποίους απαιτεί ένα διαφορετικό συνδυασμό μοριακών χαρακτηριστικών) είναι τόσο μεγάλη που είναι πιθανό να βρεθεί ένας κοινός παρανομαστής «βάσει» του οποίου να εκφραστεί η ομοιότητα ενός μορίου με ένα φάρμακο όπως για παράδειγμα οι κανόνες του Lipinski. Παρόλα αυτά ποσοτικά κριτήρια όπως το να τίθενται όρια στο μοριακό βάρος, στο logP, στον αριθμό των δοτών ή δεκτών υδρογόνου απλά βοηθούν στην εύκολη διάκριση ενώσεων που δε θα μπορούσαν ποτέ να είναι βιολογικά δραστικές.[43]

Στη Molinspiration θεωρείται ότι πρέπει να δοθεί έμφαση στις διάφορες κατηγορίες μακρομορίων-φαρμακευτικών στόχων και να αποδοθεί σε αυτές ένα σκόρ δραστικότητας μορίων. Στη μέθοδο που ακολουθείται χρησιμοποιείται Bayesian στατιστική ανάλυση. Συγκεκριμένα, συγκρίνονται δομές δραστικά ενεργών ενώσεων ως προς ένα μακρομόριο-στόχο με δομές μη ενεργών ενώσεων για να διακριθούν ποια δομικά χαρακτηριστικά (τα οποία με την σειρά τους αποδίδουν συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες) είναι αυτά που συναντώνται στα ενεργώς δραστικά μόρια.

3.9.3 Αξιολόγηση των μορίων

Η αξιολόγηση των μορίων δείχνεται στο Σχήμα 3.9 και ακολουθεί τα πιο κάτω βήματα.





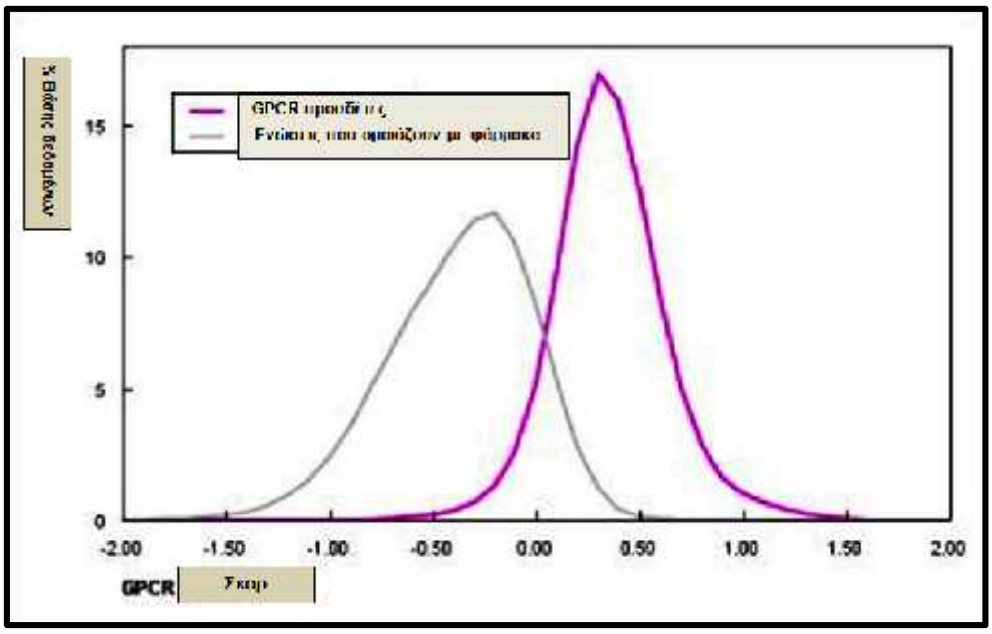
Σχήμα 3.9: Βήματα που εκτελούνται ώστε να προκύψει το σκορ βιοδραστικότητας.[49]

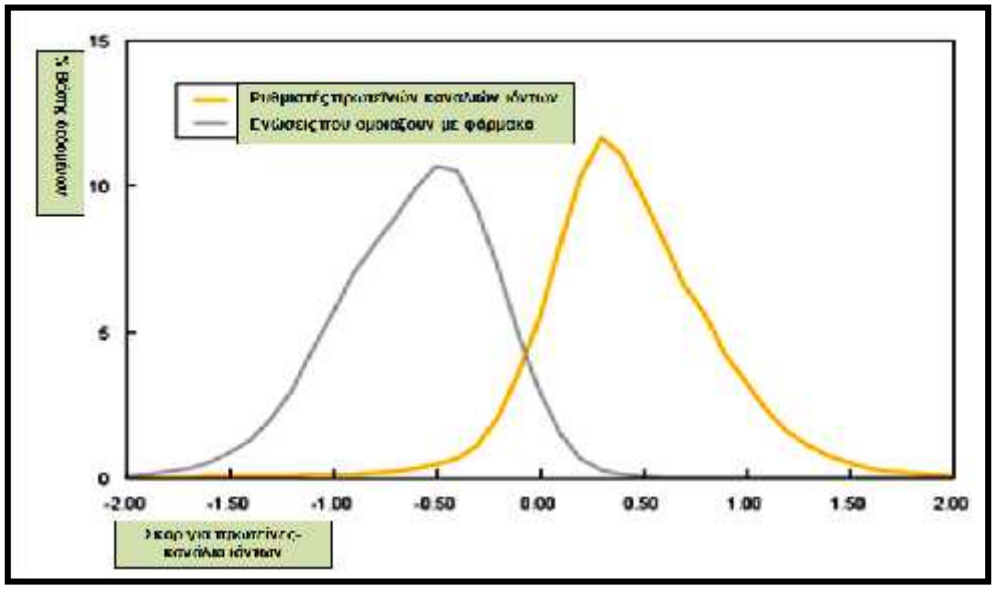
Το 1^{ο} βήμα στη διαδικασία περιλαμβάνει την ανάλυση δραστικών ενώσεων ως προς ένα βιολογικό στόχο (ενώσεις εκγύμνασης) και σύγκριση αυτών με μη δραστικές ενώσεις. Με βάση αυτή την ανάλυση, δημιουργείται ένα μοντέλο διαφόρων θραυσμάτων (στατιστικό μοντέλο), των οποίων η συνεισφορά στη δραστικότητα βαθμολογείται ανάλογα.

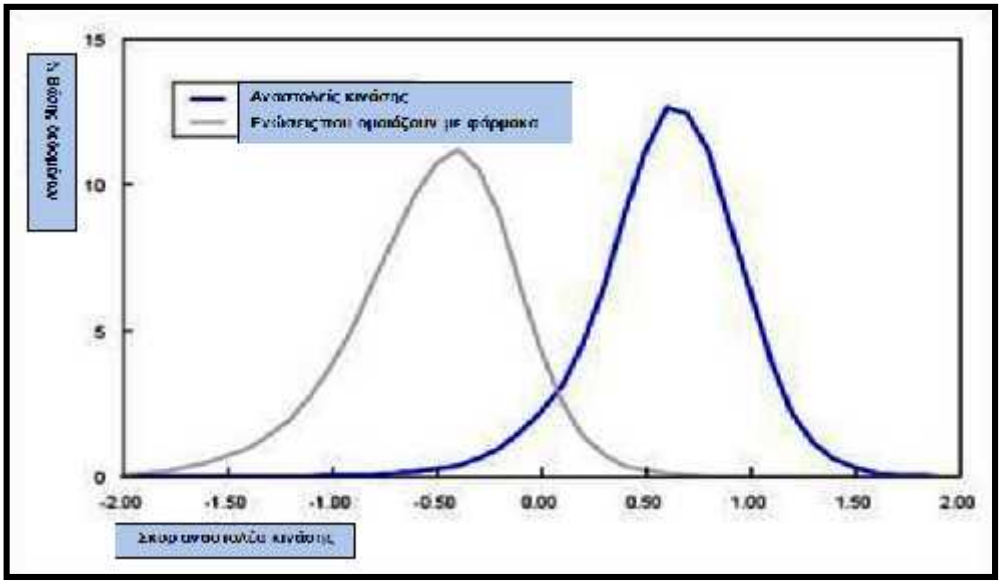
Το 2^{ο} βήμα περιλαμβάνει ανάλυσή της υπό μελέτη ένωσης και υπολογισμό της συνεισφοράς καθενός «δραστικού δομικού τμήματος» της. ΄Ετσι, προκύπτει το σκορ βιοδραστικότητας, το οποίο αποτελεί μια ένδειξη για την πιθανή βιοδραστικότητα ως προς ένα βιολογικό στόχο.

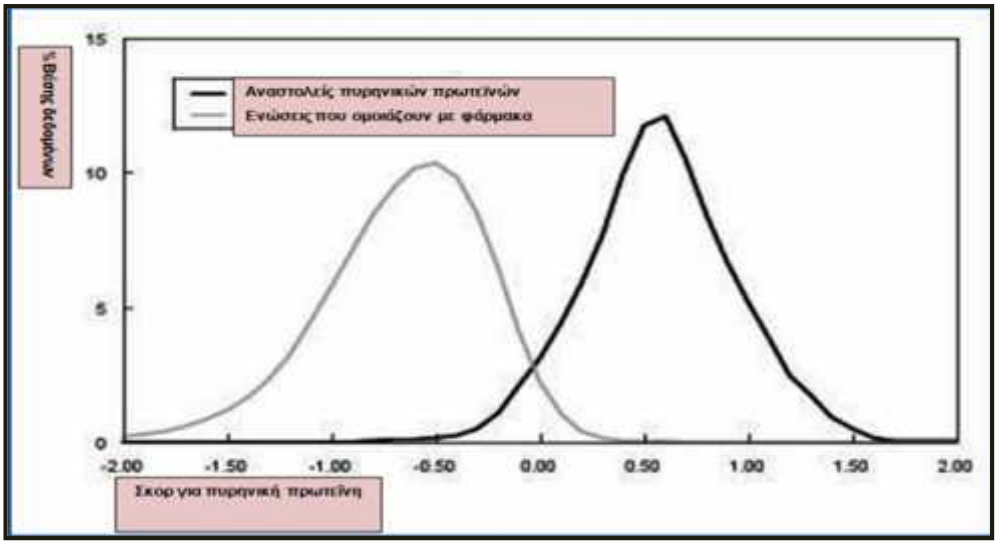
Στις παρακάτω εικόνες του Σχήματος 3.10 φαίνεται η διασπορά των τιμών δραστικότητας, για τις έξι κυριότερες κατηγορίες φαρμακευτικών στόχων, των γνωστών δραστικά ενεργών μορίων (διάφορα χρώματα) κάθε κατηγορίας καθώς και οι τιμές των ουσιών που ομοιάζουν με φάρμακα της συγκεκριμένης κατηγορίας (γκρι χρώμα). Οσο υψηλότερο είναι το σκόρ για μια ένωση που μελετάται τόσο μεγαλύτερη πιθανότητα υπάρχει να είναι ενεργό το συγκεκριμένο μόριο.

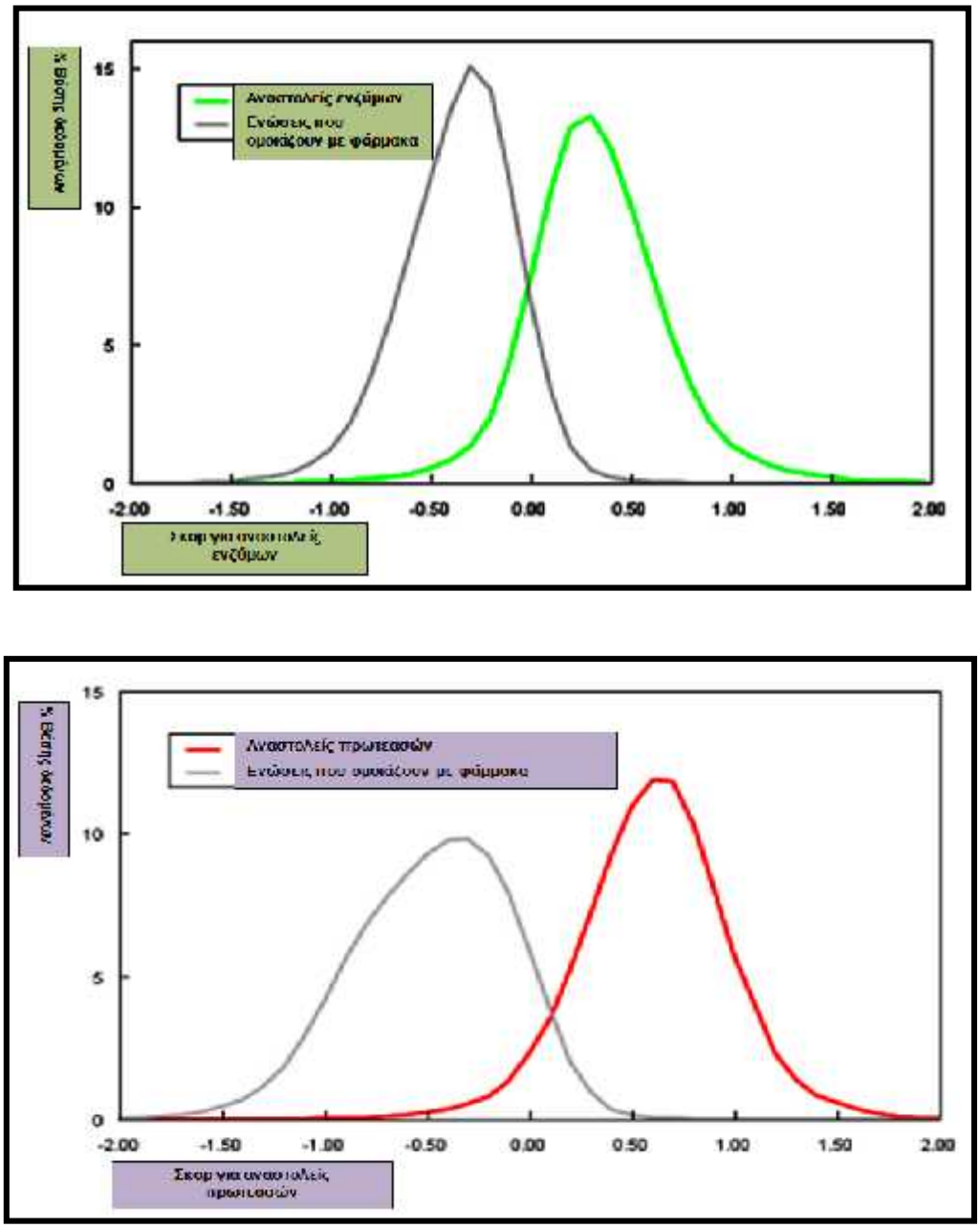
Παρακάτω, δίνονται τα κριτήρια αξιολόγησης δραστικών και ενώσεων που ομοιάζουν με φάρμακα για κάθε κατηγορία μακρομορίων στόχων σε μορφή γραφήματος όπως αυτά καταγράφονται στο διαδικτυακό χώρο [48,49].




% Βάσης δεδομένων
15
10
5
0
Ρυθμιστές πρωτεϊνών καναλιών ιόντων
Ενώσεις που ομοιάζουν με φάρμακα
-2.00
-1.50
-1.00
-0.50
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00


% Βάσης δεδομένων
15
10
5
0
Αναστολείς κινάσης
Ενώσεις που ομοιάζουν με φάρμακα
-2.00
-1.50
-1.00
-0.50
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00

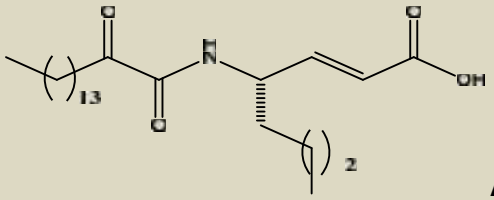

% Βάσης δεδομένων
15
10
5
0
Αναστολείς πυρηνικών πρωτεϊνών
Ενώσεις που ομοιάζουν με φάρμακα
-2.00
-1.50
-1.00
-0.50
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
Σκορ για πυρηνική πρωτεΐνη



Σχήμα 3.10: Γραφήματα από το διαδικτυακό τόπο [48] που δείχνουν το διαχωρισμό μεταξύ ενώσεων που ομοιάζουν με φάρμακα και ενεργών βιολογικά μορίων για τις συγκεκριμένες κατηγορίες μακρομορίων-φαρμακευτικών στόχων που περιγράφονται.

Με βάση τον υπολογισμό της πιθανότητας βιοδραστικότητας σε ορισμένους στόχους για τον αναστολέα AX074 της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης, παρατηρείται πως παρουσιάζει υψηλό σκορ βιοδραστικότητας ως προς τρείς κατηγορίες : 1) ως προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (0,22), 2) ως αναστολέας ενζύμων (0,35), 3) ως αναστολέας πρωτεασών (0,63).

Πίνακας 3.5: Υπολογισμός μοριακών ιδιοτήτων και πιθανότητας βιοδραστικότητας του αναστολέα AX074

 **AX074**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	7,278
TPSA	83,468
natoms	29,0
MW	409,611
nON	5
nOHNH	2
nviolations	1
nrotb	20
Molecular volume	436,201
Στόχοι φαρμάκων	***Σκορ***
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,19

Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	0,02
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,26
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,22
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,35
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,63

3.10 Βιβλιοθήκη ενώσεων NCI

Η συλλογή ενώσεων του National Cancer Institute (NCI) αποτελεί ένα σύνολο τρισδιάστατων (3D) δομών για περισσότερα από 400,000 φάρμακα. Δημιουργήθηκε με το λογισμικό Chem-X, ακολουθώντας μια συγκεκριμένη διαδικασία για το σχεδιασμό των τρισδιάστατων απεικονίσεων των μορίων, διαδικασία για την οποία δίνονται πληροφορίες στο διαδικτυακό χώρο http://dtp.nci.nih.gov/docs/3d_database/dis3d.html. Η συλλογή αυτή χρησιμοποιείται για εικονικές σαρώσεις με βάση το φαρμακοφόρο και για στατιστικές έρευνες (μελέτες δομής-δράσης).[50-52]

3.11 Βιβλιοθήκη ενώσεων Hitfinder

Οι ενώσεις σε αυτή τη συλλογή ακολουθούν τους κανόνες Lipinski, ώστε να αυξάνει η πιθανότητα να αποτελούν ενώσεις διαλυτές στον ανθρώπινο οργανισμό, βιοδιαθέσιμες (bioavailable), και να διαπερνούν τις μεμβράνες (membrane-permeable). Ο αριθμός των ενώσεων ανέρχεται στις 14,400. [53,54]

3.12 Βιβλιοθήκη ενώσεων PubChem-National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Η συλλογή ενώσεων PubChem περιλαμβάνει μόρια με τις αντίστοιχες πληροφορίες για την βιολογική δράση που αυτά παρουσιάζουν ως προς βιολογικούς στόχους.[55]

Κεφάλαιο 4: Στόχοι μεταπτυχιακής εργασίας

α) Μελέτη συμπλόκου του ενζύμου κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 ($cPLA_2$) με οξοαμιδικά ανάλογα,

β) Δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου του ενζύμου κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 ($cPLA_2$),

γ) Εξεύρεση οργανικών ενώσεων-αναστολέων του ενζύμου κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 ($cPLA_2$) που να έχουν αντληθεί από χημικές βιβλιοθήκες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{ο}

ΤΕΧΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΩΝ ΚΑΙ ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΣΘΗΚΑΝ ΣΤΙΣ *IN SILICO* ΜΕΛΕΤΕΣ

5.1 Χρήση λογισμικών εταιρίας Schrödinger

5.1.1 Προετοιμασία πρωτεΐνης (Protein Preparation Wizard)

Η δομή μιας πρωτεΐνης, που παρέχεται σε τύπο αρχείου pdb, δεν είναι κατάλληλη για άμεση χρήση σε υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης. Συνήθως, αποτελείται από το βασικό σκελετό (heavy atoms) και μπορεί να συμπεριλαμβάνει συγκρυσταλλωμένο προσδέτη, ή/και μόρια νερού, ή/και μεταλλικά ιόντα κ.ά. Μερικά αρχεία περιλαμβάνουν πολυμερείς δομές (multimeric), οι οποίες πρέπει να μετατραπούν στην απλούστερη δυνατή δομή για διευκόλυνση των μετέπειτα υπολογισμών. ΄Αλλα προβλήματα που μπορούν να παρουσιαστούν είναι η δυσκολία στη διάκριση μεταξύ των NH και O, ή η ελλιπής πληροφόρηση στο θέμα των τυπικών φορτίων. Για τους πιο πάνω λόγους λοιπόν, κρίνεται απαραίτητη η "προετοιμασία" μιας πρωτεΐνης, ώστε η δομή που θα προκύψει να είναι κατάλληλη για χρησιμοποίηση σε μετέπειτα θεωρητικούς υπολογισμούς.

Πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα για την προετοιμασία της δομής της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης $cPLA_2$, χρησιμοποιώντας τον οδηγό για την προετοιμασία πρωτεΐνης «Protein Preparation Wizard» της εταιρίας Schrödinger.

I. Εισαγωγή της δομής της πρωτεΐνης (**PDB:1CJY)** από το διαδικτυακό χώρο ***www.rcsb.org*** (Protein Data Bank-PDB),

II. Διατήρηση του ενός μονομερούς (1CJYA),

III. Protein Preparation Wizard:

- Ταυτοποίηση των δεσμών (Assign bond orders),
- Προσθήκη υδρογόνων σε όλα τα άτομα (Add hydrogens),
- Αποδέσμευση των μεταλλικών ιόντων από δεσμούς με γειτονικά άτομα (Create zero bonds to metals),
- Δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών ανάμεσα σε γειτονικά άτομα θείου (Create disulfide bonds),

- Προσθήκη πλευρικών αλυσίδων με χρήση του Prime (Fill in missing side chains using Prime),
- Προσθήκη βρόγχων με χρήση του Prime (Fill in missing loops using Prime),
- Απομάκρυνση των μορίων νερού και του μορίου 2-N-μορφολινο-αιθανοσουλφονικού οξέος (MES:(2-(N-Morpholino)-EthaneSulfonic acid),
- Βελτιστοποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου (Refine H-bond assignments),
- Βελτιστοποίηση των θέσεων των ατόμων υδρογόνου του ενζύμου (Impref minimization).[8,56,57]

5.1.2 Προετοιμασία αναστολέων και διαμορφωτική τους ανάλυση

Η διαδικασία ξεκινά με το σχεδιασμό της δομής του μορίου χρησιμοποιώντας τη γραφική διεπιφάνεια χρήστη Maestro. Ακολουθεί το βήμα "clean-up geometry" που αποδίδει μια μικρής ακρίβειας βελτιστοποίηση στη δομή της ένωσης και έπειτα πραγματοποιείται η διαδικασία LigPrep με στόχο μια σωστή τρισδιάστατη δομή του μορίου σε βασικές συνθήκες pH, όπου παρατηρούνται οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου.[58] Στο βήμα αυτό επιλέγεται και η επιθυμητή χειρομορφία του μορίου και εξετάζεται η δυνατότητα ύπαρξης ταυτομερών.[56,59,60] Εφαρμόζεται, στη συνέχεια, ελαχιστοποίηση της ενέργειας με σκοπό τη μέγιστη ακρίβεια στη δομή που τελικώς προκύπτει.

- *Ελαχιστοποίηση ενέργειας*: Χρησιμοποιείται ο αλγόριθμος PRCG, πεδίο δυνάμεων το OPLS_2005 (το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005 αποδίδει εξαιρετικά μεγάλη ακρίβεια ακόμα και σε περίπλοκες δομές, όπως αυτές των πρωτεϊνών). Επαναλήψεις (Iterations) κατά την ελαχιστοποίηση: 3000 (κριτήριο λήξης των σαρώσεων E_{i+1}-E_i<0,05 kJ mol^{-1}).

Τέλος, πραγματοποιείται η διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης:

- *Διαμορφωτική ανάλυση* : Πεδίο δυνάμεων OPLS_2005, Μέθοδος διαμορφωτικής ανάλυσης Mixed MCMM/Low-Mode Conformational Search Methods (μέθοδος που αποδίδει μεγάλης ακρίβειας αποτελέσματα ακόμα και σε ιδιαίτερα απαιτητικές περιπτώσεις θεωρητικών υπολογισμών, π.χ. στη διαμορφωτική κατάληψη του χώρου ενός μορίου που βρίσκεται προσδεδεμένο στο ενεργό κέντρο μιας πρωτεΐνης), Torsion Sampling Options: Enhanced (η επιλογή αυτή είναι κατάλληλη στις περιπτώσεις αμιδίων και εστέρων). Επαναλήψεις (Iterations): 1000.

- Για τη μελέτη της ενέργειας ενός μορίου συναρτήσει της περιστροφής δίεδρης γωνίας τ_1, όπως μελετάται στο κεφάλαιο «Διαμορφώσεις του αναστολέα AX074», απο τον κατάλογο "Applications" επιλέγεται η εντολή "Macromodel"→"Coordinate Scan" και ορίζονται τα επιθυμητά πεδία. Μέσω του Πίνακα Δημιουργίας Γραφημάτων (Project Table) είναι εφικτή η δημιουργία γραφημάτων της ενέργειας συναρτήσει των τιμών της δίεδρης γωνίας που επιλέγεται για μελέτη.

- Για την ομαδοποίηση των διαμορφώσεων που πραγματοποιείται στο Κεφάλαιο «Διαμορφώσεις του αναστολέα AX074» χρησιμοποιείται η επιλογή "Tools→Ligand Filtering" και για την εκτέλεση της υπέρθεσης διαμορφώσεων επιλέγεται "Tools→Superposition".[61,62]

5.1.3 Μοριακή πρόσδεση με χρήση του αλγόριθμου Glide

Στους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης με χρήση του αλγόριθμου Glide, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Ορισμός της περιοχής του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Receptor Grid Generation). Με τον τρόπο αυτό ορίζονται το σχήμα και οι ιδιότητες της περιοχής πρόσδεσης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με δύο τρόπους: α) στην περίπτωση συμπλέγματος μακρομορίου-προσδέτη επιλέγεται ο συγκρυσταλλωμένος προσδέτης, β) διαφορετικά, η περιοχή ορίζεται με την επιλογή κρίσιμων, με βάση την βιβλιογραφία, αμινοξέων,

- Ακρίβεια μετρήσεων: Επιλέχθηκε, οι υπολογισμοί να πραγματοποιούνται με τη μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια που μπορεί να προσφέρει ο αλγόριθμος, δηλαδή να εκτελείται υπολογισμός Glide XP (XP = EXtra Precision), θεωρώντας το μόριο πρόσδεσης πλήρως ευέλικτο.[10]

5.1.4 Μοριακή πρόσδεση με χρήση της επαγόμενη προσαρμογής (Induced Fit-IF)

Στους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης με χρήση της μεθοδολογίας επαγόμενης προσαρμογής, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Ορισμός της περιοχής του ενεργού κέντρου του ενζύμου: στην περίπτωση της επαγόμενης προσαρμογής, η περιοχή πρόσδεσης επιλέγεται και πάλι, είτε με βάση τον συγκρυσταλλωμένο προσδέτη στο σύμπλεγμα μακρομορίου-προσδέτη, είτε ορίζεται με βάση τα κρίσιμα αμινοξέα όπως αυτά αναφέρονται στην βιβλιογραφία,
- Το μόριο πρόσδεσης θεωρείται πλήρως ευέλικτο,
- Protein Preparation Constrained Refinement (επιλογή για την εκδοση Schrödinger 2010 - στη νεότερη έκδοση των λογισμικών Schrodinger 2012, η επιλογή δεν κρίνεται απαραίτητη στους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης με επαγόμενη προσαρμογή, όπου η πρωτεΐνη έχει προετοιμαστεί με τη νέα έκδοση της διαδικασίας Protein Preparation Wizard. Χρησιμοποιούνται, επίσης, οι εντολές Trim Side Chains: Automatic based on B-factor, Refine Residues within 5 Å & Optimize side chains, και Glide Redocking XP.[63]

5.1.5 Ροή εργασίας της διαδικασίας εικονικής σάρωσης (Virtual Screening Workflow)

Εκτελέστηκε μια σειρά εργασιών με σκοπό την απλοποίηση της διαδικασίας της εικονικής σάρωσης μεγάλου αριθμού ενώσεων (Workflows→Virtual Screening Workflow). Αυτή περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Επιλογή και προετοιμασία των μορίων με τη χρήση του λογισμικού LigPrep,
- Φιλτράρισμα των ενώσεων (υπολογισμός φυσικοχημικών ιδιοτήτων με τη χρήση του λογισμικού QikProp, επιλογή ενώσεων σύμφωνα με τα κριτηρία Lipinski, απόρριψη ενώσεων με ιδιαίτερα δραστικές λειτουργικές ομάδες που δε θεωρούνται κατάλληλες για τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης π.χ. εποξείδια),
- Υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης με διαφορετικά επίπεδα ακρίβειας (Glide HTVS→Glide SP→Glide XP).[15]

5.2 Χρήση λογισμικού LigandScout

Στο τμήμα 3.5 έχουν ήδη αναφερθεί τα βασικά σημεία του λογισμικού. Για κάθε τμήμα του, ο χρήστης μέσω του καταλόγου "Edit" και επιλέγοντας την εντολή "Preferences", έχει τη δυνατότητα να ορίσει παραμέτρους όπως για παράδειγμα τη δημιουργία ή μη ταυτομερών. Μέσω της γραφικής διεπιφάνειας χρήστη, είναι δυνατή η εκτέλεση υπολογισμών και στα τέσσερα βασικά τμήματα του λογισμικού.

5.2.1 Ενώσεις εκγύμνασης, ενώσεις αξιολόγησης, ενώσεις παραπλανητικά μόρια

Τα μόρια σχεδιάζονται και αποκτούν σωστή τρισδιάστατη δομή για pH~8, δεδομένου ότι οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας της πρωτεΐνης παρατηρούνται στη βασική περιοχή [58], με χρήση λογισμικών της εταιρείας Schrodinger (LigPrep). Αποθηκεύονται σε αρχείο mol2 ώστε να είναι συμβατά με το λογισμικό LigandScout και να περιλαμβάνουν τις αντίστοιχες τρισδιάστατες ιδιότητες (π.χ. χειρομορφία).

Δημιουργούνται, με χρήση του λογισμικού LigandScout, για κάθε κατηγορία ενώσεων, πεντακόσιες διαμορφώσεις με σκοπό την πλήρη κατάληψη του διαμορφωτικού χώρου. Για το σκοπό αυτό, στο τμήμα «Ligand-Based Modeling Perspective» γίνεται εισαγωγή των μορίων, και επιλέγεται η εντολή "Generate Conformations for Ligand-Set". Στο παράθυρο διαλόγου που

εμφανίζεται ο χρήστης επιλέγει τις επιθυμητές ρυθμίσεις. Δίνεται η εντολή "Apply BEST settings". Οι ενώσεις όλων των κατηγοριών αποθηκεύονται και ως αρχείο τύπου ldb με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους στη διαδικασία αξιολόγησης του φαρμακοφόρου μοντέλου.

5.2.2 Δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου

Η δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος στο σύμπλεγμα προσδέτη-βιολογικού στόχου πραγματοποιείται στο τμήμα "Structure-Based Modeling Perspective". Γίνεται εισαγωγή του συμπλέγματος (αρχείο τύπου pdb) και δίνεται η εντολή «Create Pharmacophore». Υπάρχει η δυνατότητα ορισμού διαφόρων ιδιοτήτων (π.χ. απαραίτητες αποστάσεις για να επιτευχθεί δεσμός υδρογόνου) από το χρήστη στην επιλογή "Structure-Based Modeling Settings".

Η δημιουργία φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέτη αναφοράς (ligand-based) πραγματοποιείται στο τμήμα "Ligand-Based Modeling Perspective". Γίνεται εισαγωγή των μορίων εκγύμνασης, δημιουργούνται πολλαπλές διαμορφώσεις (5.2.1) και δίνεται η εντολή «Run Ligand-Based Pharmacophore Creation». Στο τμήμα "Screening Perspective", πραγματοποιείται η διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο, ώστε να γίνει η αξιολόγηση του φαρμακοφόρου μοντέλου που δημιουργήθηκε. Στην περίπτωση της δημιουργίας φαρμακοφόρου μοντέλου με τη μεθοδολογία που βασίζεται στον προσδέτη αναφοράς, υπάρχει επίσης η δυνατότητα ορισμού διαφόρων κριτηρίων από το χρήστη με τη επιλογή "Ligand-Based Modeling Settings".

5.2.3 Υπέρθεση φαρμακοφόρων

Η υπέρθεση των δύο λύσεων για τη δημιουργία του τελικού φαρμακοφόρου (Κεφάλαιο "Δημιουργία Φαρμακοφόρου Μοντέλου για την Ανθρώπινη Κυτοσολική Φωσφολιπάση (human $cPLA_2$)" πραγματοποιείται στο τμήμα υπερθέσεων μορίων ή/και φαρμακοφόρων "Alignment Perspective" (Align Features).

5.2.4 Βάση δεδομένων Zinc

Απο το διαδικτυακό χώρο http://zinc.docking.org/→Επιλογή: Subsets→Επιλογή: Property→Επιλογή: Special→επιλέγεται η βιβλιοθήκη ZDD (ZINC Drug Database). Όλες οι ενώσεις στη βάση δεδομένων Zinc είναι έτοιμες για χρήση σε διάφορους υπολογισμούς. Με χρήση του λογισμικού LigandScout δημιουργούνται διαμορφώσεις των ενώσεων που περιέχονται στη βιβλιοθήκη (με χρήση της γραμμής εντολών), μετατρέπονται σε αρχείο τύπου ldb και χρησιμοποιούνται στην εικονική σάρωση με βάση το φαρμακοφόρο.

5.2.5 Βάση δεδομένων Pubchem

Απο το διαδικτυακό χώρο http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ επιλέγεται http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/ και αποθηκεύονται οι ενώσεις σε αρχείο sdf (μοναδική επιλογή). Οι ενώσεις, που επιλέχθηκαν, παρουσιάζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τους οξοαμιδικούς αναστολείς της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης. Πραγματοποιείται προετοιμασία των ενώσεων πριν τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο γιατι δεν είναι γνωστό εάν οι ενώσεις στη συγκεκριμένη βάση δεδομένων είναι έτοιμες προς χρήση. Για αυτό το λόγο, γίνεται ελαχιστοποίηση με το λογισμικό LigandScout για βελτιστοποίηση της δομής, προετοιμασία μορίου σε βασικές συνθήκες pH (αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλομάδες), και δημιουργία ταυτομερών όπου αυτό είναι εφικτό. Δημιουργείται, τελικά, αρχείο τύπου ldb με πενήντα διαμορφώσεις για κάθε ένωση.

Πίνακας 5.1: Αριθμός ταυτότητας των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν από την βιβλιοθήκη Pubchem.

60167560	57345781	57345767	57336518	53486298
46930987	46228468	44155856	42642645	42636535
42598643	25195294	25145656	25102847	25062766

25034599	25031915	24958200	24889392	24786555
24770514	24768261	24753719	23635314	23290919
22049997	21634109	21081761	18538483	16747683
16718576	16666708	16220172	16108977	16095342
11749858	11689883	11667240	11610526	11507802
11494970	11485656	11442891	11398092	11381449
11351021	11282283	11234052	11219835	10367662
10231331	10071819	10018576	9953769	9935767
9931205	914412	9911830	9888590	9874913
9846180	9814186	9810996	9809715	9808844
9804992	9549289	6918848	6918837	6918554
5995818	5329099	5289418	2776272	1549120
1515259	1367100	1366531	1366290	1364672
1363954	1363773	1363534	1363085	1359860
1359148	1358227	1358112	1357338	1356519
1355526	1355476	1355432	1355393	1355377
1355287	1355269	1355242	1355227	1355055
1355047	1354995	1354971	1354956	1352998
1352704	1352655	1351589	1349373	1336997
1334501	1255228	1255057	1252264	1251786

1249419	1237313	1237181	1227509	1180478
1169039	1163072	1151770	1150508	1110947
686287	638278	551369	542959	520488
449054	446541	445858	444795	444732
444305	441401	311434	300471	252682
222786	216326	216239	176167	150610
134018	132999	123964	104842	92409
72172	71360	65935	62451	53276
41969	21102	4996	3826	2703
2538	2516	2006		

5.2.6 Βάση δεδομένων Hitfinder

Δημιουργούνται πεντακόσιες διαμορφώσεις (γραμμή εντολών-αρχείο τύπου ldb) για κάθε ένωση που συμπεριλαμβάνεται στη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη ενώσεων χωρίς περαιτέρω επεξεργασία της.

5.2.7 Η συλλογή ενώσεων του National Cancer Institute (NCI)

Λόγω του μεγάλου αριθμού των ενώσεων που περιέχει η συγκεκριμένη βιβλιοθήκη ενώσεων, ο αριθμός των διαμορφώσεων που επιλέχθηκε να δημιουργηθούν είναι εικοσιπέντε (γραμμή εντολών-αρχείο τύπου ldb).

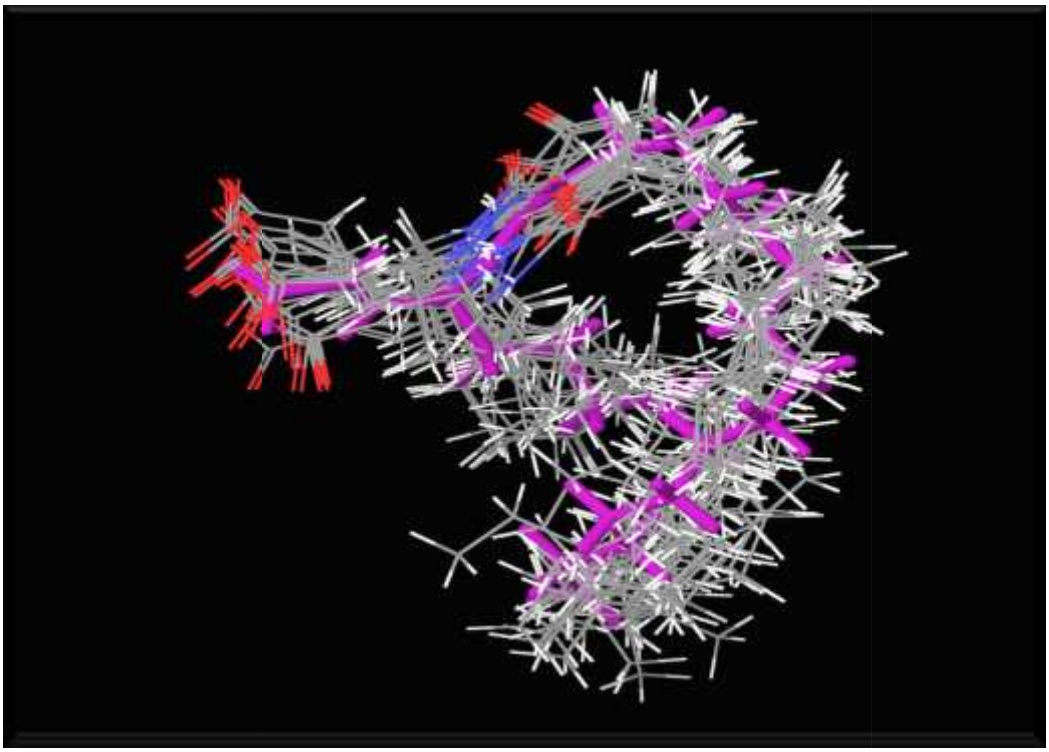
5.2.8 Εικονική σάρωση βιβλιοθηκών με βάση το φαρμακοφόρο

Η διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο πραγματοποιήθηκε στο τμήμα "Screening Perspective". Εισάγεται το φαρμακοφόρο μοντέλο και οι βιβλιοθήκες ενώσεων που πρόκειται να μελετηθούν, και δίνεται η εντολή «Perform Screening». Η βαθμολογία προσαρμογής στο φαρμακοφόρο παρουσιάζεται σε πίνακα μετά την

ολοκλήρωση της διαδικασίας (η βαθμολόγηση πραγματοποιείται με βάση την επιλογή "Pharmacophore Fit").[30]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο}

ΔΙΑΜΟΡΦΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ AX074



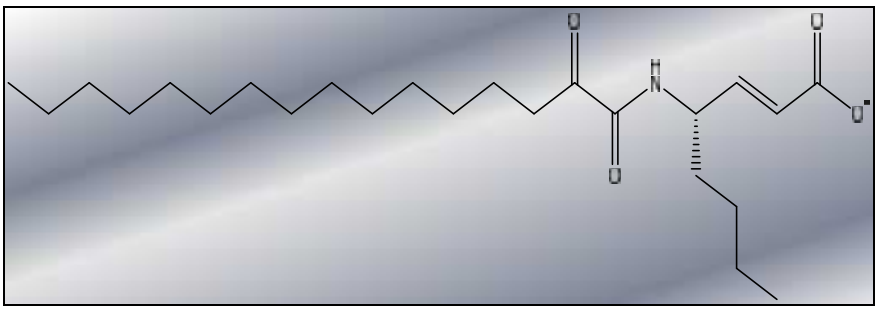
6.1 Εισαγωγή στη διαμορφωτική ανάλυση

Οι φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες ενός μορίου εξαρτώνται από την τρισδιάστατη δομή του, δηλ. τη διαμόρφωσή του. Είναι απαραίτητο να εφαρμόζεται διαμορφωτική ανάλυση του δυνάμει φαρμακευτικού μορίου ώστε να προκύψουν οι ενεργειακά ευνοϊκές διαμορφώσεις, που θεωρούνται οι πιθανές βιοδραστικές, ώστε να μπορεί να προβλεφθεί, στη συνέχεια, ποιες είναι αυτές που συνεισφέρουν στο βιολογικό αποτέλεσμα.

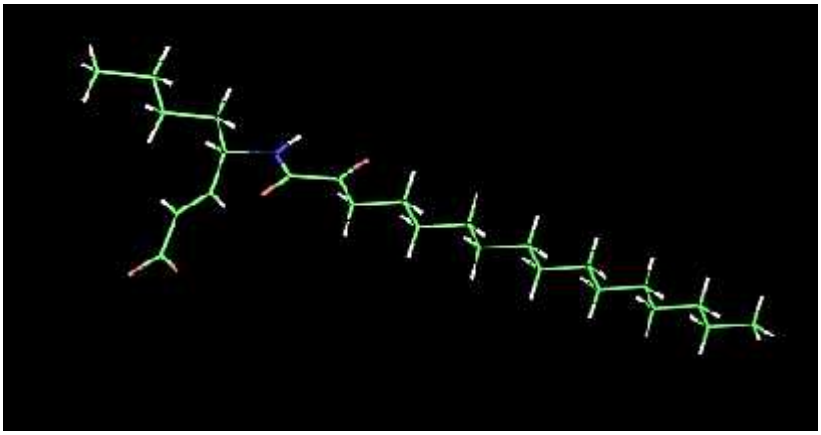
Η πορεία που ακολουθείται για την εύρεση της πιθανής βιοδραστικής διαμόρφωσης είναι η εξής:

6.2 Δημιουργία τρισδιάστατης δομής

Δόμηση του μορίου σε δύο διαστάσεις (Σχήμα 6.1) και με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού μετατροπή της δισδιάστατης δομής σε τρισδιάστατη (Σχήμα 6.2).



Σχήμα 6.1: Δισδιάστατη απεικόνιση του AX074 (βασικό pH)



Σχήμα 6.2: Τρισδιάστατη απεικόνιση του AX074 όπως προέκυψε με χρήση του λογισμικού Pymol.

6.3 Ελαχιστοποίηση ενέργειας

Δομώντας ένα μοριακό σύστημα και μοντελοποιώντας το σε τρεις διαστάσεις προκύπτει μια διαμόρφωση με ελάχιστη πιθανότητα να αντιστοιχεί σε κάποιο ενεργειακό ελάχιστο. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης της ενέργειας (minimization algorithms) προς επίτευξη του στόχου αυτού.

Οι κυριότεροι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης που χρησιμοποιούνται είναι :

α. **αλγόριθμοι πρώτης τάξης**

Είναι οι αλγόριθμοι που στη σειρά Taylor ανάλυσης ενέργειας χρησιμοποιούνται οι δύο πρώτοι όροι. Οι κυριότεροι αλγόριθμοι αυτής της κατηγορίας είναι ο Βαθύτατης Κατάδυσης (Steepest Descents), ο Βαθμιδωτής Σύζευξης (Conjugated Gradient) και ο Powell.

β. **αλγόριθμοι δεύτερης τάξης**

Είναι οι αλγόριθμοι που στη σειρά Taylor ανάλυσης ενέργειας χρησιμοποιούνται οι τρεις πρώτοι όροι. Παράδειγμα αποτελεί ο αλγόριθμος Newton-Raphson.

6.4 Εξερεύνηση διαμορφωτικού χώρου

Το μόριο που προκύπτει από τα δύο παραπάνω στάδια (δόμηση του μορίου, μετατροπή της δισδιάστατης δομής σε τρισδιάστατη, ελαχιστοποίηση ενέργειας) αποτελεί μία πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του μορίου. Μερικά μόρια, όπως η μεθανόλη, οφείλουν τις ιδιότητές τους σε αυτή τη μοναδική διαμόρφωσή τους. Μόρια, όμως, με συνθετότερη δομή και φαρμακευτικό ενδιαφέρον μπορούν να λάβουν διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Μία από αυτές τις διαφορετικές διαμορφώσεις μπορεί να είναι υπεύθυνη για το βιολογικό ρόλο που εξασκείται μέσω ενός συγκεκριμένου υποδοχέα. Ισχύει ότι ο*ι χαμηλότερες ενεργειακά διαμορφώσεις (τοπικά ελάχιστα ή ολικά ελάχιστα) είναι οι πιθανότερες να αποτελούν τις βιοδραστικές διαμορφώσεις*.

Διαμορφωτική ανάλυση, ονομάζεται η εξερεύνηση του διαμορφωτικού χώρου προς εύρεση του συνόλου των ενεργειακά χαμηλών διαμορφώσεων του μορίου. Ο λόγος για τον οποίο εφαρμόζεται η διαμορφωτική ανάλυση είναι για να εξευρεθεί η βιοδραστική διαμόρφωση, αυτή δηλαδή που οδηγεί σε βιολογικό αποτέλεσμα και η οποία είναι πιθανό να μην αντιστοιχεί πάντοτε σε ολικό ελάχιστο. Μπορεί, επίσης, να είναι αναγκαίο για ένα μόριο να προσλαμβάνει περισσότερες από μία διαμορφώσεις ώστε να προσδένεται σε ένα υποδοχέα με τη διαμόρφωση Α και τελικά να σταθεροποιείται σ' αυτόν με τη διαμόρφωση Β.

Με τη χρήση μόνο αλγόριθμων ελαχιστοποίησης της ενέργειας δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί διαμορφωτική ανάλυση όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Χρειάζεται και ένας αλγόριθμος που θα παράγει νέες εναρκτήριες διαμορφώσεις. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση αλγόριθμου διαμορφωτικής ανάλυσης.

Οι αλγόριθμοι διαμορφωτικής ανάλυσης στηρίζονται στις μεταβολές των ευέλικτων δίεδρων γωνιών ενός μορίου. Οι κύριες κατηγορίες είναι:

α. **αλγόριθμοι συστηματικής αναζήτησης**

Στους αλγόριθμους αυτούς εξετάζεται ο διαμορφωτικός χώρος του υπό μελέτη μορίου εκτελώντας συνεχείς και προβλέψιμες μεταβολές στην αρχική διαμόρφωση. Χρησιμοποιούνται για μοριακά συστήματα που περιέχουν μέχρι και δεκαπέντε δίεδρες γωνίες.

β. **αλγόριθμοι τυχαίας αναζήτησης**

Με τους αλγόριθμους αυτής της κατηγορίας μπορεί να γίνει μετάβαση από μια περιοχή της δυναμικής ενέργειας σε μια εντελώς διαφορετική μέσα σε ένα βήμα με μεταβολή είτε των ατομικών καρτεσιανών συντεταγμένων είτε των δίεδρων γωνιών.

γ**. Μοριακή Δυναμική**

Η προσομοίωση της μοριακής τροχιάς μπορεί να εφαρμοστεί για την εξερεύνηση του δαμορφωτικού χώρου ενός μορίου. Κατά τη διάρκεια της

Μοριακής Δυναμικής, το μελετώμενο σύστημα θερμαίνεται σταδιακά μέχρι να φτάσει σε μια θερμοκρασία στην οποία και παραμένει μέχρι να φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας. Με τη θέρμανση δίνεται στο σύστημα η απαραίτητη ενέργεια για να υπερπηδήσει ενεργειακά φράγματα και με τον τρόπο αυτό είναι εφικτή η μελέτη διαφορετικών περιοχών της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας καθώς και η παραγωγή διαφορετικών διαμορφώσεων. Αφού το σύστημα ισορροπήσει προσομοιώνεται η τροχιά του (trajectory) και ελαχιστοποιείται η ενέργειά του σε διάφορες χρονικές στιγμές (snapshots) της.

6.5 Περιγραφή διαμορφωτικής ανάλυσης του αντιφλεγμονώδους AX074 σε διάφορα περιβάλλοντα

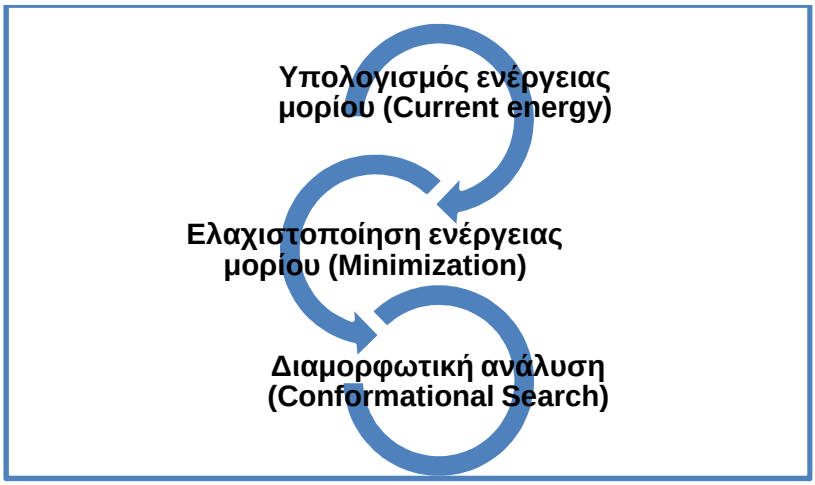
6.5.1 Σχεδιασμός δομής

Το Maestro αποτελεί τη γραφική διεπιφάνεια χρήστη (graphical user interface) σχεδόν για όλα τα προγράμματα της εταιρίας Schrödinger και παρέχει μια μεγάλη ποικιλία εργαλείων για τη δόμηση μορίων και την τροποποίηση αυτών. Η ράβδος δόμησης (build toolbar) παρέχει τα βασικά εργαλεία γι' αυτό το σκοπό. Περισσότερες δυνατότητες σχεδίασης δίνονται στην εντολή Build (δόμηση) όπου παρέχονται έτοιμα δομικά τμήματα για χρησιμοποίηση. Επιπλέον, υπάρχει η διαδικασία *LigPrep* με την οποία διορθώνονται οι δομές, δημιουργείται ποικιλία δομών, αφαιρούνται ανεπιθύμητες διαμορφώσεις, και βελτιστοποιούνται οι δομές.

6.5.2 Πειραματικός υπολογισμός ενέργειας, ελαχιστοποίηση ενέργειας δομών, διαμορφωτική ανάλυση του μορίου AX074

Για τη διαμορφωτική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *Macromodel 9.8.* Πρόκειται για πρόγραμμα μοριακής μηχανικής, βασισμένο σε πεδία δυνάμεων που αναπτύχθηκαν από τους ερευνητές της εταιρίας Schrödinger, με δυνατότητες εφαρμογής σε μια μεγάλη ποικιλία χημικών συστημάτων.

Στο Σχήμα 6.3 επεξηγείται συνοπτικά τα βήματα που ακολουθούνται για τη διαμορφωτική ανάλυση ενός μορίου:



Σχήμα 6.3: Βήματα για την εκτέλεση της διαμορφωτικής ανάλυσης

Επιλέχθηκε ως μέθοδος ελαχιστοποίησης ο αλγόριθμος Βαθμιδωτής Σύζευξης πρώτης τάξης **PRCG** (Polak-Ribiere Conjugate Gradient).

Το πρόγραμμα Macromodel παρέχει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης των εξής μεθόδων διαμορφωτικής ανάλυσης :

1. **Μέθοδος πολλαπλών ελαχίστων Monte Carlo (Monte Carlo Multiple Minimum-MCMM):** Η μέθοδος αυτή είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική στην πραγματοποίηση σφαιρικής έρευνας, εξερευνώντας κοντινές και απομακρυσμένες περιοχές της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας σε ένα μόλις βήμα, μεταβάλλοντας τυχαία τις δίεδρες γωνίες του υπό μελέτη μορίου. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η εύρεση πολλαπλών τοπικών ελαχίστων. Πρακτικά, ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιείται για μοριακά συστήματα έως δεκαπέντε δίεδρων γωνιών προκειμένου να αποφευχθούν μεγάλης διάρκειας χρόνοι αναζήτησης.

2. **Συστηματική μέθοδος ψευδο-Monte Carlo (Systematic Pseudo-Monte Carlo-SPMC):** Με τη μέθοδο αυτή εξασφαλίζεται η εύρεση όλων των πιθανών διαμορφώσεων ελαχίστης ενέργειας (conformational minima) και είναι ικανοποιητική για μικρά μόρια.

3. **Χαμηλής συχνότητας μέθοδος εφαρμογής διαμορφωτικών μεθόδων ανάλυσης** (**Low-Mode Conformational Search Methods):** Μέθοδος που επιτρέπει την εξερεύνηση της επιφάνειας δυναμικής ενέργειας πολλαπλών

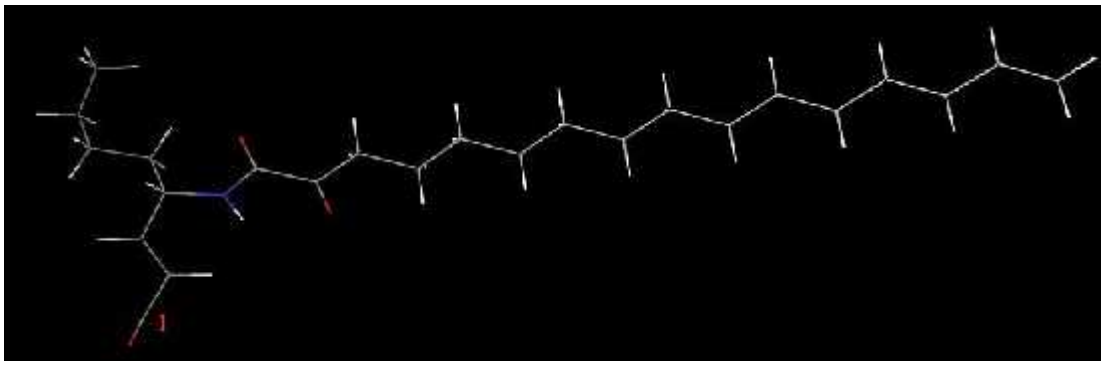
διαφορετικών μορίων χωρίς να είναι απαραίτητη η παρέμβαση του χρήστη. Η μέθοδος Large Scale (μεγάλης κλίμακας) Low-Mode, παρόμοιας λειτουργίας, χρησιμοποιείται για τη διαμορφωτική ανάλυση μακρομορίων (π.χ. βελτιστοποίηση μοντέλων ομόλογης σειράς).

4. **Ανάμιξη μεθόδων διαμορφωτικής ανάλυσης 1 και 3 (Mixed MCMM/Low-Mode Conformational Search Methods):** Έχει αποδειχθεί η ταχύτερη και πιο ικανοποιητική μέθοδος για μια μεγάλη ποικιλία μοριακών συστημάτων. Έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε περιπτώσεις πολύπλοκων συστημάτων, όπως για παράδειγμα της εξερεύνησης του διαμορφωτικού χώρου ενός προσδέτη στο ενεργό κέντρο πρωτεΐνης. Συνδυάζει χαρακτηριστικά των τριών πιο πάνω μεθόδων γι' αυτό επιλέχθηκε ως μέθοδος εφαρμογής.

Πραγματοποιήθηκε διαμορφωτική ανάλυση του αναστολέα AX074 του ενζύμου $cPLA_2$ σε διαλύτες H_2O, $CHCl_3$ (λιγότερο πολικός διαλύτης) και σε κενό, καθώς η επίδραση του διαλύτη μπορεί να μεταβάλει δραματικά την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση ενός μορίου, ιδιαίτερα όταν αυτό διαθέτει πολικές λειτουργικές ομάδες.

6.5.2.1 *Cisoid* και *transoid* διαμορφώσεις του AX074 σε διαλύτη H_2O

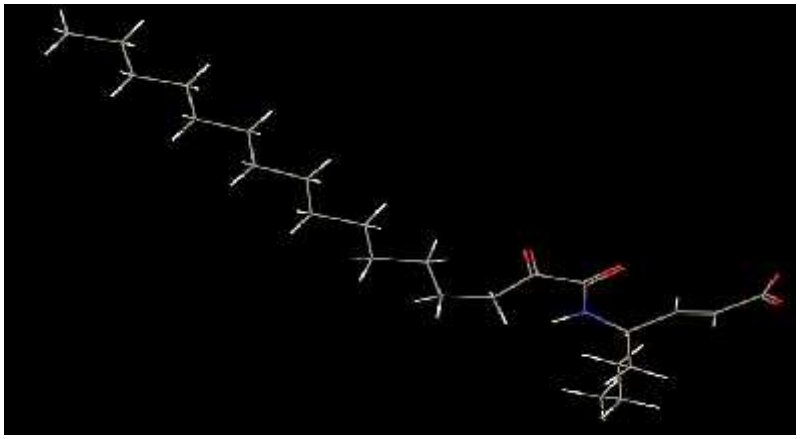
Αρχικά παράχθηκε μια τρισδιάστατη *transoid* δομή του μορίου όπως παριστάνεται στο Σχήμα 6.4 :



Σχήμα 6.4: Τρισδιάστατη *transoid* απεικόνιση του AX074

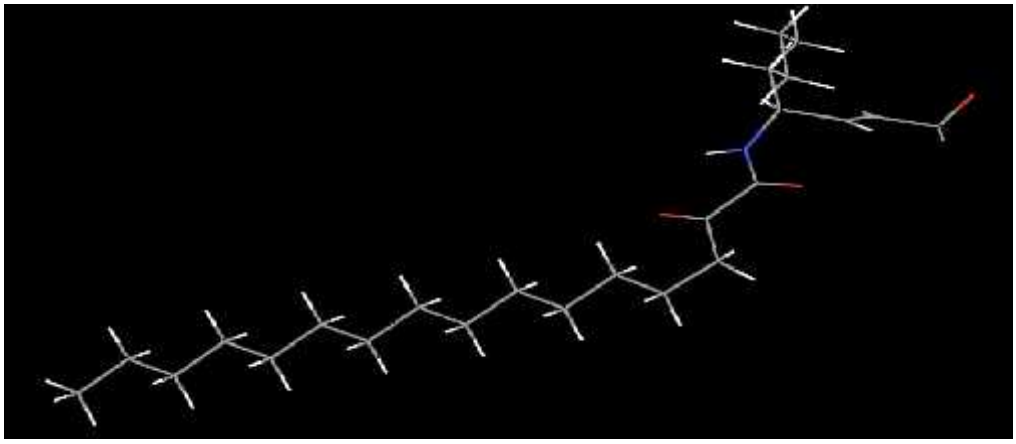
Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η ενέργεια της δομής που προέκυψε από τη διαδικασία του LigPrep με τη χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS_2005 και σε διαλύτη νερό. Αυτή βρέθηκε ίση με -349,18 kJ mol^{-1}. Ακολούθως, ελαχιστοποιήθηκε η ενέργεια του μορίου κάνοντας χρήση 2140 σαρώσεων με τον αλγόριθμο PRCG στο ίδιο περιβάλλον θέτοντας ως κριτήριο λήξης των σαρώσεων E_{i+1}-E_i<0,05 kJ mol^{-1}.Η ελαχιστοποιημένη ενέργεια υπολογίστηκε ίση με -358,98 kJ mol^{-1}. Τέλος, επιτεύχθηκε διαμορφωτική ανάλυση του μορίου (βήματα: 1000). Προέκυψαν 291 διαμορφώσεις με ενέργειες που κυμαίνονταν από -374,85 kJ mol^{-1} έως -353,86 kJ mol^{-1}.

Όμοια σχεδιάστηκε ο AX074 στη *cisoid* δισδιάστατη δομή του και μετατράπηκε στην τρισδιάστατη δομή, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.5 :



Σχήμα 6.5: Τρισδιάστατη απεικόνιση της *cisoid* δομής του AX074

Υπολογίστηκε η ενέργεια της δομής με τη χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS_2005 και σε διαλύτη νερό. Βρέθηκε ίση με -332,12 kJ mol^{-1}. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μορίου κάνοντας χρήση 2000 σαρώσεων με τον αλγόριθμο PRCG στο ίδιο περιβάλλον και θέτοντας ως κριτήριο λήξης των σαρώσεων E_{i+1}-E_i<0,05 kJ·mol^{-1}. Η ελαχιστοποιημένη ενέργεια υπολογίστηκε ίση με -352,12 kJ mol^{-1}. Δεν πραγματοποιήθηκε το τρίτο στάδιο, αυτό της διαμορφωτικής ανάλυσης, γιατί με την ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μορίου, πραγματοποιήθηκε η μετατροπή του σε *transoid* διαμόρφωση, όπως φαίνεται και στην εικόνα του Σχήματος 6.6:

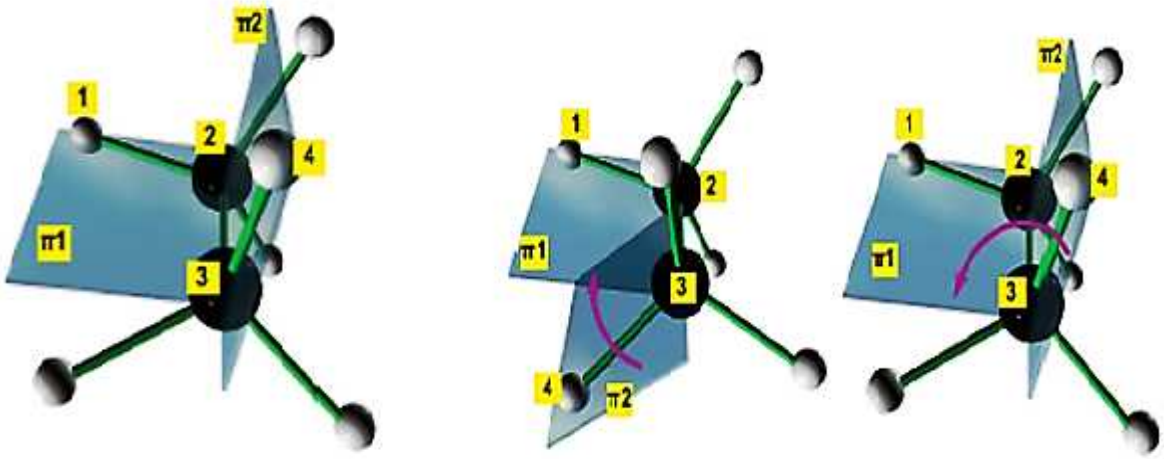


Σχήμα 6.6: Με την ελαχιστοποίηση της ενέργειας η *cisoid* διαμόρφωση μετατρέπεται στην αντίστοιχη *transoid* διαμόρφωση.

6.5.2.1.1 Ορισμός δίεδρης γωνίας

Δίνεται ο ορισμός της δίεδρης γωνίας :

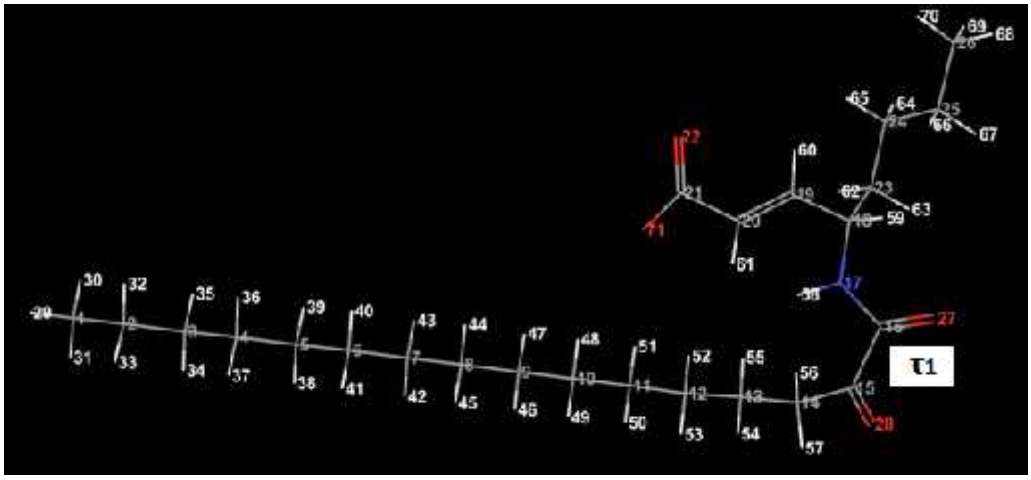
Δίεδρη γωνία : Είναι η γωνία που σχηματίζεται μεταξύ δύο επιπέδων, που ορίζονται από τρεις διαδοχικούς δεσμούς όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.7:



Σχήμα 6.7: Δίεδρη γωνία: είναι η γωνία μεταξύ των επιπέδων π1 και π2. Η δίεδρη γωνία μπορεί να λάβει θετικές ή αρνητικές τιμές ανάλογα με το εάν η περιστροφή του επιπέδου π2, για να υπερτεθεί με το επίπεδο π1 (το επίπεδο π1 διατηρείται σταθερό), γίνει σύμφωνα με τους δείκτες του ρολογιού ή αντίθετα με τους δείκτες του ρολογιού αντίστοιχα.[64]

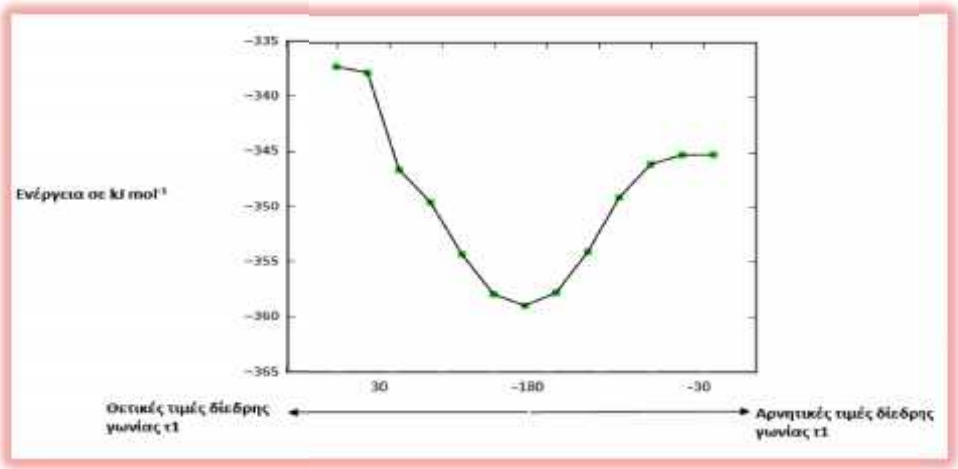
6.5.2.1.2 Υπολογισμός ενέργειας σε συνάρτηση με τη δίεδρη γωνία τ_1

Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της ενέργειας του μορίου σε συνάρτηση με τη δίεδρη γωνία τ_1 που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος του αναστολέα AX074 (Σχήμα 6.8).



Σχήμα 6.8: Δίεδρη γωνία τ_1 που σχηματίζεται από τα άτομα 27, 16, 15, 28. (΄Ατομα άνθρακα = 15, 16, ΄Ατομα οξυγόνου = 27, 28). (Στο Maestro παρουσιάζονται με γκρι χρώμα τα άτομα άνθρακα, με κόκκινο χρώμα τα άτομα οξυγόνου, με μπλε χρώμα τα άτομα αζώτου και με άσπρο χρώμα τα άτομα υδρογόνου).

Παρατηρείται πως σε τιμή δίεδρης γωνίας ίσης με -180° απαντάται η χαμηλότερης ενέργειας διαμόρφωση (-359,00 kJ mol^{-1}) (Σχήμα 6.9).



Σχήμα 6.9: Ενέργεια μορίου AX074 σε συνάρτηση με τη δίεδρη γωνία τ_1 σε διαλύτη H_2O

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ομαδοποίηση των 291 διαμορφώσεων που προέκυψαν από τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης με βάση την τιμή της γωνίας τ_1.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 6.1 :

Πίνακας 6.1: Τιμές δίεδρης γωνίας που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος σε διαλύτη H_2O για τις 291 διαμορφώσεις που προκύπτουν από τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης.

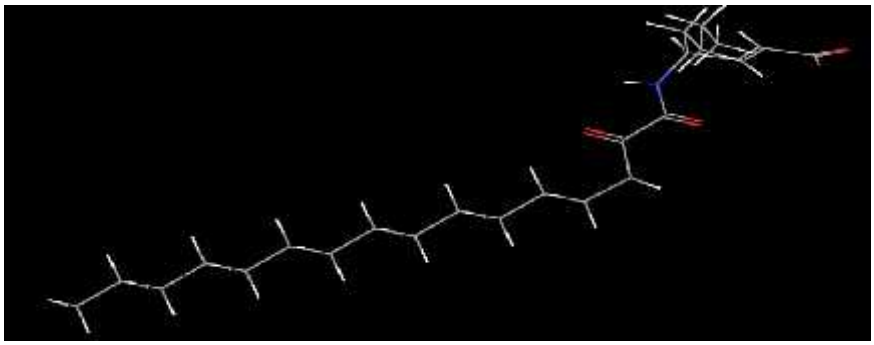
Έυρος τιμών δίεδρης γωνίας τ_1	**Αριθμός διαμορφώσεων**
(180,00) – (170,26)	114
(169,91) – (160,27)	44
(159,49) – (150,89)	22
(149,63) – (140,03)	32
(134,21) – (131,88)	3
(13,74)	1
(-133,67)	1
(-141,96) – (-146,29)	3
(-155,97) – (-159,23)	4
(-161,29) – (-169,97)	3
(-170,02) – (-179,98)	64

Εκτός μίας διαμόρφωσης, τα καρβονύλια της δίεδρης γωνίας τ_1 στις υπόλοιπες διαμορφώσεις βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές (99%).

6.5.2.2 *Cisoid και transoid* διαμορφώσεις του AX074 σε διαλύτη $CHCl_3$

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της ενέργειας της *transoid* δομής που προέκυψε από τη διαδικασία του LigPrep με τη χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS_2005 και σε διαλύτη $CHCl_3$. Αυτή βρέθηκε ίση με -265,54 kJ mol^{-1}. Στη συνέχεια, ελαχιστοποιήθηκε η ενέργεια του μορίου κάνοντας χρήση 2580 σαρώσεων με τον αλγόριθμο PRCG στο ίδιο περιβάλλον θέτοντας ως κριτήριο λήξης των σαρώσεων E_{i+1}-E_i<0,05 kJ·mol^{-1}. Η ελαχιστοποιημένη ενέργεια βρέθηκε ίση με -276,65 kJ mol^{-1}. Τέλος, επιτεύχθηκε διαμορφωτική ανάλυση του μορίου (1000 βήματα). Προέκυψαν 410 διαμορφώσεις με ενέργειες που κυμαίνονταν από -287,87 kJ mol^{-1} έως -266,94 kJ mol^{-1}. Παρατηρείται ότι ο διαλύτης σε αυτή την περίπτωση συνεισφέρει πολύ λιγότερο στην σταθεροποίηση του μορίου σε σχέση με το νερό.

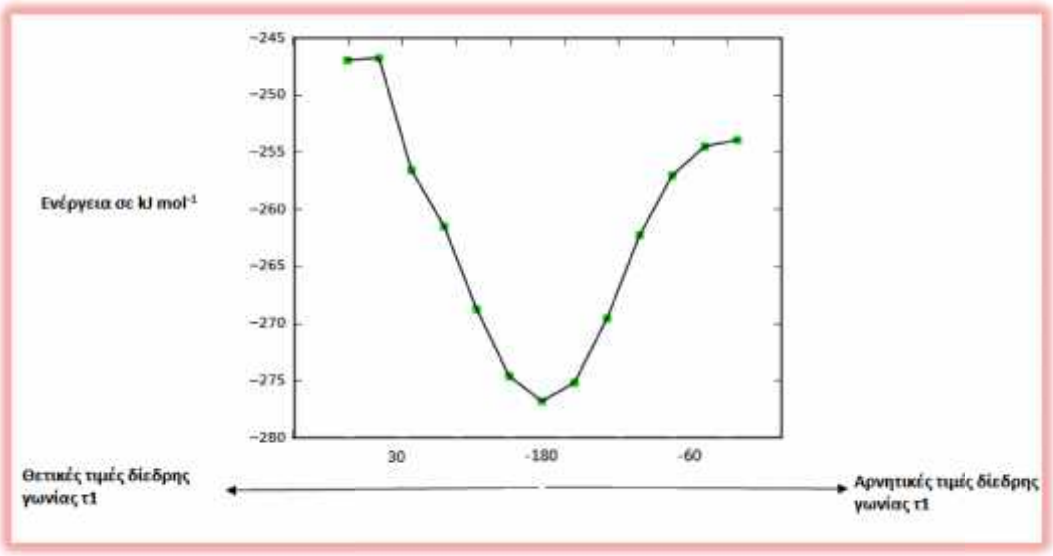
Τα ίδια εφαρμόσθηκαν για τη *cisoid* δομή. Αρχικά υπολογίστηκε η ενέργεια της δομής με τη χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS_2005 και σε διαλύτη $CHCl_3$. Αυτή βρέθηκε ίση με -240,04 kJ mol^{-1}. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μορίου κάνοντας χρήση 2000 σαρώσεων με τον αλγόριθμο PRCG στο ίδιο περιβάλλον θέτοντας ως κριτήριο λήξης των σαρώσεων E_{i+1}-E_i<0,05 kJ mol^{-1}. Η ελαχιστοποιημένη ενέργεια βρέθηκε ίση με -276,32 kJ mol^{-1}. Δεν πραγματοποιήθηκε το τρίτο στάδιο, αυτό της διαμορφωτικής ανάλυσης, γιατί με την ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μορίου, αυτό μετατράπηκε στην *transoid* διαμόρφωση, όπως παριστάνεται στο Σχήμα 6.10.



Σχήμα 6.10: Η δομή που προκύπτει μετά την ελαχιστοποίηση της *cisoid* διαμόρφωσης σε $CHCl_3$.

6.5.2.2.1 Μέτρηση δίεδρης γωνίας

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ενέργειας του μορίου σε συνάρτηση με τη δίεδρη γωνία τ_1 που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος του αναστολέα AX074.



Σχήμα 6.11: Ενέργεια μορίου σε συνάρτηση με την τιμή της δίεδρης γωνίας τ_1 σε διαλύτη $CHCl_3$

Παρατηρείται πως σε τιμή δίεδρης γωνίας ίσης με -180° απαντάται η χαμηλότερης ενέργειας διαμόρφωση (-276,86 kJ mol^{-1}).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της δίεδρης γωνίας τ_1 που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος του αναστολέα AX074 στις διαμορφώσεις που προέκυψαν από τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης σε διαλύτη $CHCl_3$. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον Πίνακα 6.2 :

Πίνακας 6.2: Τιμές δίεδρης γωνίας που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος στις 410 δαμορφώσεις που προκύπτουν από τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης σε διαλύτη $CHCl_3$.

Έυρος τιμών δίεδρης γωνίας τ_1	Αριθμός διαμορφώσεων
(179,96) – (170,05)	62
(169,93) – (161,83)	5
(-160,05) – (-169,00)	5
(-170,05) – (-179,98)	338

Σε όλες τις διαμορφώσεις τα δύο καρβονύλια της δίεδρης βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές (100%).

6.5.2.3 *Cisoid και transoid* διαμορφώσεις του AX074 απουσία διαλύτη

Αρχικά, υπολογίστηκε η ενέργεια της *transoid* τρισδιάστατης δομής που προκύπτει με τη χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS_2005 απουσία διαλύτη. Βρέθηκε ίση με -49,99 kJ mol^{-1}. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μορίου κάνοντας χρήση 3260 σαρώσεων με τον αλγόριθμο PRCG στο ίδιο περιβάλλον θέτοντας ως κριτήριο λήξης των σαρώσεων Ei+1-Ei<0,05 kJ.mol^{-1}. Η ελαχιστοποιημένη ενέργεια βρέθηκε ίση με -61,74 kJ mol^{-1}. Τέλος, επιτεύχθηκε διαμορφωτική ανάλυση του μορίου (1000 βήματα). Προέκυψαν 201 διαμορφώσεις οι οποίες παρουσίαζαν ενέργειες που κυμαίνονταν από -91,61 kJ mol^{-1} έως -70,72 kJ mol^{-1}.

6.5.2.3.1 Μέτρηση δίεδρης γωνίας

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της δίεδρης γωνίας τ_1 που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος του αναστολέα AX074 στις διαμορφώσεις που προέκυψαν από τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης της *transoid* απεικόνισης απουσία διαλύτη. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον Πίνακα 6.3 που ακολουθεί:

Πίνακας 6.3: Τιμές δίεδρης γωνίας που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος στις 201 διαμορφώσεις που προκύπτουν απουσία διαλύτη μετά από διαμορφωτική ανάλυση της *transoid* απεικόνισης.

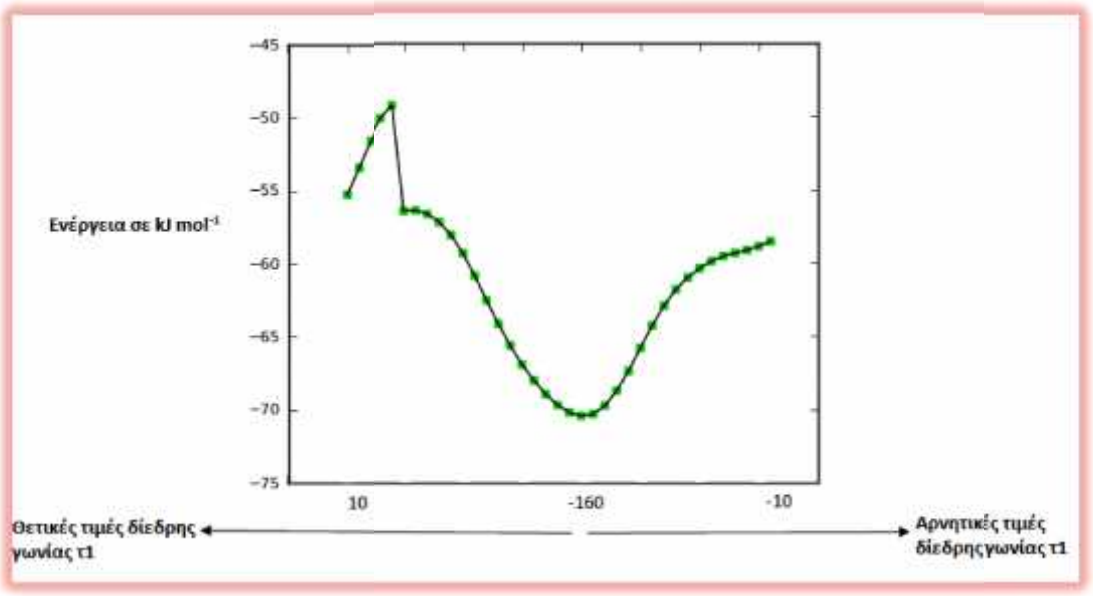
Έυρος τιμών δίεδρης γωνίας τ_1	Αριθμός διαμορφώσεων
(179,18) – (170,03)	12
(169,28) – (161,32)	10
(152,76), (159,80)	2
(137,01)	1
(-52,46), (-53,61)	2
(-63,81), (-66,94)	2
(-70,32)	1
(-107,70) - (-111,22)	3
(-122,28) - (-129,86)	16
(-130,33) - (-139,72)	73
(-140,01) - (-148,94)	40
(-150,73) - (-159,10)	12
(-160,57) - (-169,57)	21
(-173,90) - (-179,88)	6

Στις 193 διαμορφώσεις τα δύο καρβονύλια βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές (96%).

6.5.2.3.2 *Cisoid* διαμόρφωση

Στη συνέχεια μετρήθηκε η ενέργεια της *cisoid* διαμόρφωσης με τη χρήση του πεδίου δυνάμεων OPLS_2005 απουσία διαλύτη και βρέθηκε ίση με -31,85 kJ mol^{-1}. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μορίου κάνοντας χρήση 1240 σαρώσεων με τον αλγόριθμο PRCG στο ίδιο περιβάλλον θέτοντας ως κριτήριο λήξης των σαρώσεων Ei+1-Ei<0,05 kJ.mol^{-1}. Η ελαχιστοποιημένη ενέργεια βρέθηκε ίση με -60,57 kJ mol^{-1}.Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι προκύπτει η διαμόρφωση σχηματίζει δίεδρη γωνία τ_1 ίση με - 44,9°.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα συμπεράσματα της μελέτης συσχέτισης της ενέργειας που αποκτά το ελαχιστοποιημένο μόριο του AX074, απουσία διαλύτη, με μοναδικό κριτήριο την περιστροφή της δίεδρης γωνίας τ_1.



Σχήμα 6.12: Ενέργεια μορίου AX074 σε συνάρτηση με τη δίεδρη γωνία τ_1

Παρατηρείται πως σε τιμή δίεδρης γωνίας ίσης με -160° απαντάται η χαμηλότερης ενέργειας διαμόρφωση (-70,453 kJ mol^{-1}), η οποία προσεγγίζει την *transoid* διαμόρφωση. Παρατηρούνται, όμως, και χαμηλής ενέργειας διαμορφώσεις (π.χ. -64,178 kJ mol^{-1}) ενδιάμεσες της *transoid* και *cisoid* απεικόνισης (τιμή δίεδρης γωνίας τ_1 : 130,5).

Πραγματοποιήθηκε, λοιπόν, το επόμενο βήμα της διαμορφωτικής ανάλυσης, με σκοπό να βρεθούν διαμορφώσεις χαμηλότερης ενέργειας για την ελαχιστοποιημένη *cisoid* απεικόνιση του αναστολέα AX074 απουσία διαλύτη (1000 βήματα). Πράγματι, προέκυψαν 308 διαμορφώσεις χαμηλότερης ενέργειας, με εύρος -87,83 kJ mol^{-1} έως -66,84 kJ mol^{-1}. Παρατηρήθηκαν διαμορφώσεις χαμηλότερης ενέργειας (E < -60,57 kJ mol^{-1}) στις οποίες οι γειτνιάζουσες καρβονυλικές ομάδες σχηματίζουν δίεδρη γωνία τέτοιας τιμής που εξασφαλίζουν στο μόριο απεικόνιση ενδιάμεση της *transoid* και *cisoid*. Αυτό αποδεικνύει ότι η έλλειψη διαλύτη μπορεί να σταθεροποιήσει το μόριο σε διαμόρφωση ενδιάμεση της *transoid* και *cisoid*.

Απουσία πολικού διαλύτη, δε δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι ευνοούν μια διάταξη *trans*. Μια τέτοια διαμόρφωση "αποδίδει" μεγαλύτερο αριθμό δεσμών υδρογόνου λόγω ευνοϊκότερης τοποθέτησης των μορίων στο χώρο π.χ. του νερού, άρα και μεγαλύτερη σταθερότητα της διαμόρφωσης. Επίσης, η διηλεκτρική σταθερά του κενού ευνοεί τη χωρική εγγύτητα των δύο καρβονυλίων λόγω μικρότερων απωστικών δυνάμεων.

6.5.2.3.2.1 Μέτρηση δίεδρης γωνίας

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της δίεδρης γωνίας που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος του αναστολέα AX074 στις διαμορφώσεις που προέκυψαν από τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης της *cisoid* απεικόνισης απουσία διαλύτη. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 6.4 :

Πίνακας 6.4: Τιμές δίεδρης γωνίας που σχηματίζουν τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος απουσία διαλύτη μετά από διαμορφωτική ανάλυση της *cisoid* απεικόνισης.

΄Ευρος τιμών δίεδρης γωνίας τ_1	Αριθμός διαμορφώσεων
(-179,69) – (-170,28)	7
(-170,00) – (-160,43)	24
(-158,78) – (-150,19)	26
(-147,82) – (-140,20)	47
(-139,95) – (-130,26)	127
(-129,99) – (-120,34)	43
(-118,86) – (-106,48)	11
(-97,47)	1
(-54,65)	1
(43,22), (49,34)	2
(116,40)	1
(130,36), (138,10)	2
(140,07) – (146,34)	4
(158,42), (158,66)	2
(162,42), (164,06)	2
(173,29) – (179,61)	8

Στις 295 διαμορφώσεις τα καρβονύλια της δίεδρης γωνίας τ_1 βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές (96%).

Ελέγχθηκε, επίσης, και η σταθερότητα των δομών του AX074 όσο αφορά τον αμιδικό δεσμό. Αυτός βρέθηκε σε όλες τις διαμορφώσεις να είναι *trans*.

6.5.3 Διαμορφώσεις του AX074 σε διάφορα περιβάλλοντα

Παρατίθεται συνοπτικός Πίνακας 6.5 με τις διαμορφώσεις του αναστολέα AX074 σε διάφορα περιβάλλοντα:

Πίνακας 6.5: Συνοπτικός πίνακας των παρατηρήσεων για τις διαμορφώσεις του αναστολέα AX074 σε διάφορα περιβάλλοντα (H_2O, $CHCl_3$, απουσία διαλύτη). Οι ενέργειες εκφράζονται σε kJ mol^{-1}. Η ελαχιστοποιημένη ενέργεια αναλύεται στις επι μέρους ενέργειες που τη συνιστούν.

	H_2O		$CHCl_3$		KENO	
Ενέργεια	***CIS***	***TRANS***	***CIS***	***TRANS***	***CIS***	***TRANS***
Αρχική ενέργεια	**-332,12**	**-349,18**	**-240,04**	**-265,54**	**-31,85**	**-49,99**
Ενέργεια μετά την ελαχιστοποίηση	**-352,12 ⇨*trans* διαμόρφωση**	**-358,98**	**-276,32 ⇨trans διαμόρφωση**	**-276,65**	**-60,57**	**-61,74**
Ενέργεια Τάσης		**3,47**		**2,70**		**2,35**
Ενέργεια Κάμψης		**19,28**		**18,27**		**18,23**
Ενέργεια Δίεδρης γωνίας		**1,00**		**2,13**		**2,92**
Εσφαλμένη δίεδρη γωνία		**0,04**		**0,11**		**0,11**
VDW		**0,69**		**4,22**		**3,15**
Ηλεκτροστατική Ενέργεια		**-83,12**		**-88,53**		**-88,50**
Υδρογονικοί δεσμοί		**0,00**		**0,00**		**0,00**
Διασταυρώμενοι όροι		**0,00**		**0,00**		**0,00**
Επιδιαλύτωση		**-300,35**		**-215,54**		**0,00**

Τα γενικά συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από τη μελέτη αυτή είναι:

1. Το νερό σταθεροποιεί πολύ περισσότερο το μόριο σε σχέση με το $CHCl_3$ και το κενό. Αυτό οφείλεται στην ενέργεια επιδιαλύτωσης που είναι ευνοϊκότερη σε πολικό διαλύτη συγκριτικά με το μη πολικό. Το μόριο AX074, αν και λιπόφιλο μόριο, φέρει στη δομή του πολικές ομάδες που ευνοούν τις πολικές αλληλεπιδράσεις με το νερό. Αυτές οι πολικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται αρκετά ισχυρότερες από τις υδρόφοβες που αναμένεται να έχει το μόριο AX074 μέσα σε ένα περιβάλλον με διηλεκτρική σταθερά ε=1 όπως είναι το χλωροφόρμιο.

2. Σταθερότερη διαμόρφωση είναι αυτή που τα δύο καρβονύλια του οξοαμιδικού τμήματος του αναστολέα AX074 βρίσκονται σε θέση *trans* ή σε δίεδρες γωνίες που προσεγγίζουν την *transoid* διαμόρφωση.

3. Απουσία διαλύτη, εξακολουθούν και παρατηρούνται διαμορφώσεις του μορίου ενδιάμεσες της *transoid* και *cisoid* απεικόνισης.

6.6 Υπέρθεση μορίων

Μετά το τέλος της διαμορφωτικής ανάλυσης είναι απαραίτητη η σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών διαμορφώσεων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη διαδικασία της υπέρθεσης τους στο χώρο (σύγκριση των διαμορφώσεων βάσει κοινών χαρακτηριστικών). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι η υπέρθεση μορίων αποτελεί ένα σημαντικό κεφάλαιο στην Φαρμακευτική Χημεία.

Ποσοτικό κριτήριο της υπέρθεσης αποτελεί η τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής των τετραγώνων RMSD (Root Mean Square Deviation). Θεωρείται ότι επιτυγχάνεται η βέλτιστη υπέρθεση όταν η τιμή της RMSD λάβει τη μικρότερη τιμή.

Παρακάτω αναφέρονται τα αποτελέσματα της υπέρθεσης των *transoid* διαμορφώσεων (σταθερότερων) του AX074 σε διαλύτη νερό, $CHCl_3$ και απουσία διαλύτη. Η υπέρθεση πραγματοποιήθηκε με σημείο αναφοράς τη

χαμηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση του AX074 σε όλα τα περιβάλλοντα μελέτης.

6.6.1 Διαλύτης H_2O

Οι διαμορφώσεις του αναστολέα AX074 που προέκυψαν από την διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης κατηγοριοποιούνται με βάση τις τιμές του RMSD έχοντας σημείο αναφοράς τη χαμηλότερη ενέργειας διαμόρφωση που υπολογίστηκε να είναι -374,85 kJ mol^{-1}.

Ομάδα **1**: **RMSD : 0,00<= KAI =<1,00**. Στην ομάδα αυτή υπάρχει μόνο μια διαμόρφωση, αυτή της χαμηλότερης ενέργειας που αποτελεί και το σημείο αναφοράς της υπέρθεσης.

Ομάδα **2**: **RMSD : 1,00< KAI =<2,00**.*(24) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **3**: **RMSD : 2,00< KAI =<3,00**.*(89) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **4**: **RMSD : 3,00< KAI =<4,00**.*(42) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **5**: **RMSD : 4,00< KAI =<5,00**.*(25) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **6**: **RMSD : 5,00< KAI =<6,00**.*(64) διαμορφώσεις.*

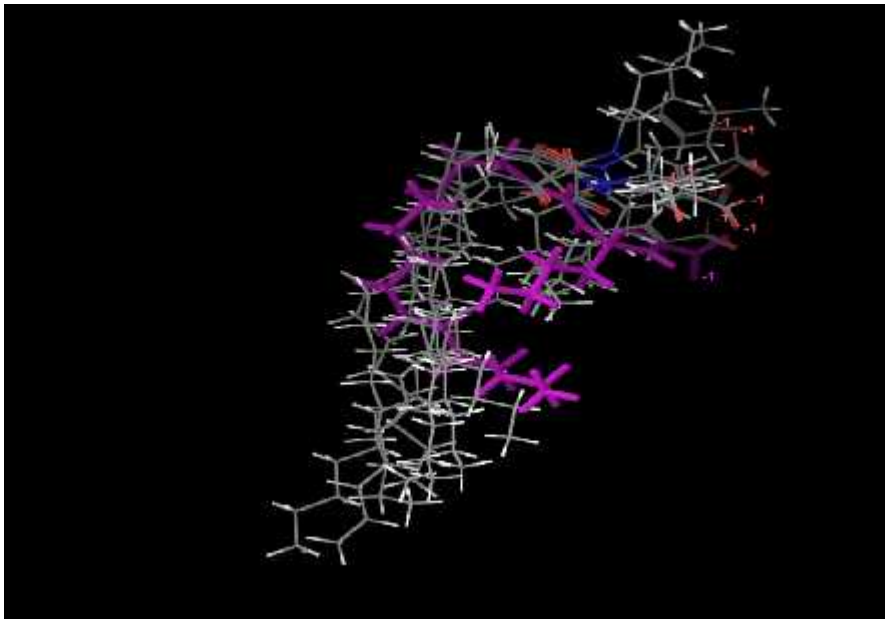
Ομάδα **7**: **RMSD : 6,00< KAI =<7,00**.*(43) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **8**: **RMSD : 7,00< KAI =<8,00**.*(3) διαμορφώσεις*.

Καταρτίζεται ο Πίνακας 6.6 με τις χαμηλότερης ενέργειας διαμορφώσεις από τις παραπάνω ομάδες.

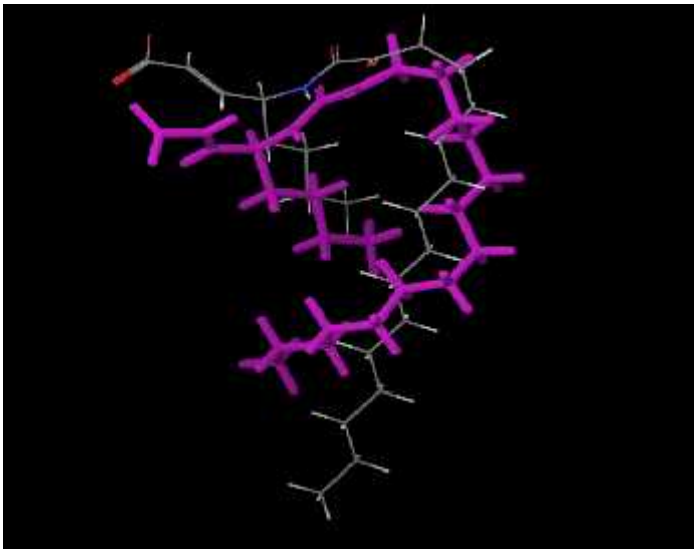
Πίνακας 6.6 (H_2O):$^{\alpha}$ Ομάδες με βάση τις τιμές RMSD, $^{\beta}$ Χαμηλότερης ενέργειας διαμόρφωση από κάθε ομάδα. Οι ενέργειες εκφράζονται σε kJ mol^{-1}.

ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 1	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 2	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 3	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 4	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 5	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 6	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 7	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 8
$^{\beta}$ -374,85	$^{\beta}$ -365,57	$^{\beta}$ -372,02	$^{\beta}$ -373,73	-362,79	$^{\beta}$ -365,65	$^{\beta}$ -372,20	$^{\beta}$ -360,53



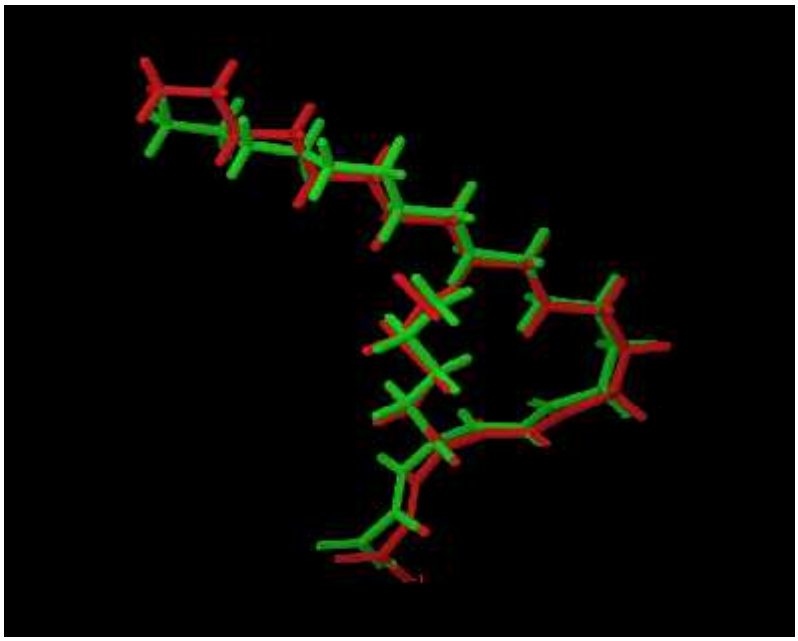
Σχήμα 6.13: Υπέρθεση των διαμορφώσεων του Πίνακα 6.6, διαλύτης H_2O. Με μωβ χρώμα παριστάνεται η διαμόρφωση-σημείο αναφοράς της υπέρθεσης.

Η υπέρθεση της χαμηλότερης ενεργειακά διαμόρφωσης με αυτήν που πιθανά να είναι η βιοδραστική διαμόρφωση ενέργειας -371,79 kJ mol^{-1}, σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσδεσης με βάση τη μέθοδο επαγόμενης προσαρμογής (induced fit) που συζητούνται αναλυτικότερα στο επόμενο κεφάλαιο, φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 6.14:



Σχήμα 6.14: Υπέρθεση της χαμηλότερης ενεργειακά διαμόρφωσης με την πιθανή βιοδραστική (RMSD=2,55). Με μωβ χρώμα παριστάνεται η χαμηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση του AX074.

Βρέθηκε, επίσης, ότι η διαμόρφωση του AX074 που είναι πιθανά η βιοδραστική διαμόρφωση ενέργειας -371,79 kJ mol^{-1} συμπίπτει σε μεγάλο βαθμό με τη διαμόρφωση με ενέργεια ίση με -368,27 kJ mol^{-1} (RMSD=1,14) όπως παριστάνεται και στο Σχήμα 6.15 :



Σχήμα 6.15: Με κόκκινο χρώμα η διαμόρφωση που είναι πιθανά η βιοδραστική. Με πράσινο χρώμα η διαμόρφωση με την οποία συμπίπτουν σε μεγάλο βαθμό (RMSD=1,14). Η τελευταία ανήκει στην ομάδα 3 των διαμορφώσεων που περιγράφονται παραπάνω.

6.6.2 Διαλύτης $CHCl_3$

Οι διαμορφώσεις του αναστολέα AX074 που προέκυψαν από την διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης κατηγοριοποιούνται με βάση τις τιμές του RMSD έχοντας σημείο αναφοράς τη χαμηλότερη ενέργειας διαμόρφωση που η ενέργεια της υπολογίστηκε σε -287,87 kJ mol^{-1}.

Ομάδα **1**: **RMSD : 0,00<= KAI =<1,00**.Στην ομάδα αυτή υπάρχει μόνο μια διαμόρφωση, αυτή της χαμηλότερης ενέργειας που αποτελεί και το σημείο αναφοράς της υπέρθεσης.

Ομάδα **2**: **RMSD : 1,00< KAI =<2,00**.*(59) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **3**: **RMSD : 2,00< KAI =<3,00**.*(207) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **4**: **RMSD : 3,00< ΚΑΙ =<4,00**.*(121) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **5**: **RMSD : 4,00< ΚΑΙ =<5,00**.*(3) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **6**: **RMSD : 5,00< ΚΑΙ =<6,00**.*(17) διαμορφώσεις.*

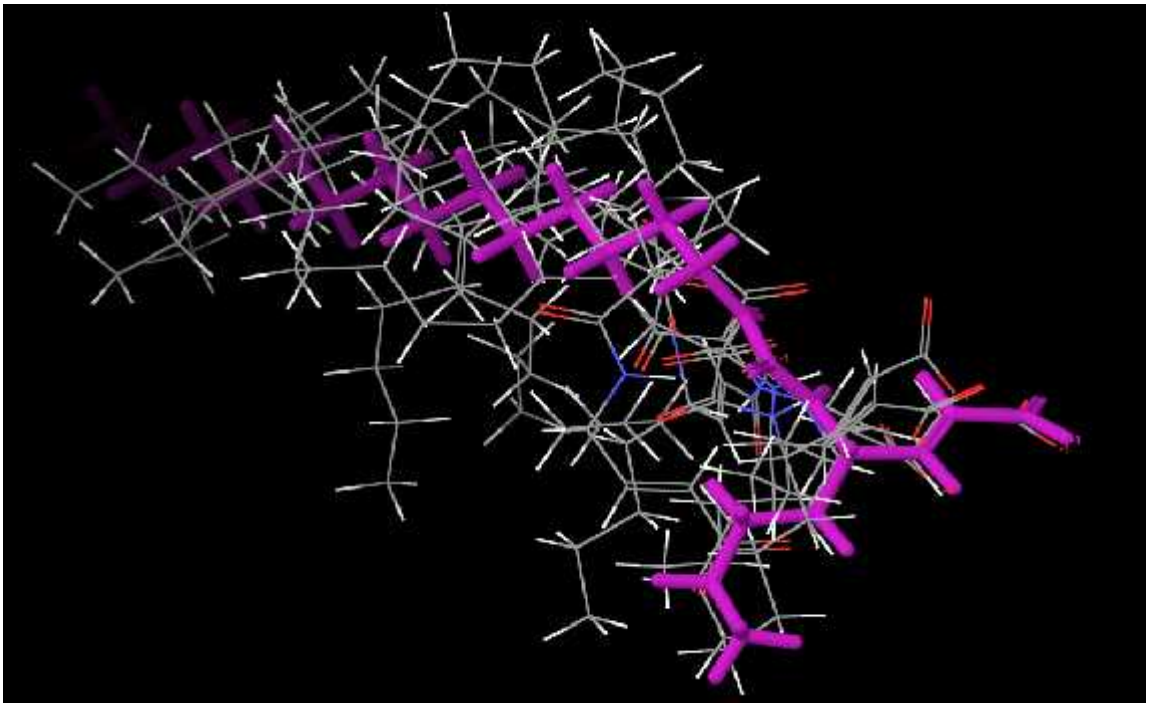
Ομάδα **7**: **RMSD : 6,00< ΚΑΙ =<7,00**.*(2) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **8**: **RMSD : 7,00< ΚΑΙ =<8,00**.*(0) διαμορφώσεις.*

Καταρτίζεται ο Πίνακας 6.7 με τις χαμηλότερης ενέργειας διαμορφώσεις από τις παραπάνω ομάδες.

Πίνακας 6.7 ($CHCl_3$): $^{\alpha}$ Ομάδες με βάση τις τιμές RMSD, $^{\beta}$ Χαμηλότερης ενέργειας διαμόρφωση από κάθε ομάδα. Οι ενέργειες εκφράζονται σε kJ mol^{-1}.

ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 1	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 2	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 3	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 4	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 5	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 6	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 7	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 8
$^{\beta}$-287,87	$^{\beta}$-284,24	$^{\beta}$-286,26	$^{\beta}$-282,97	$^{\beta}$-273,45	$^{\beta}$-274,78	$^{\beta}$-273,55	$^{\beta}$



Σχήμα 6.16: Υπέρθεση των διαμορφώσεων του Πίνακα 6.7, διαλύτης $CHCl_3$. Με μωβ χρώμα παριστάνεται η διαμόρφωση-σημείο αναφοράς της υπέρθεσης.

Από την παραπάνω υπέρθεση παρατηρείται ότι στο χλωροφόρμιο οι διαμορφώσεις δεν ποικίλουν πολύ. Αυτό γιατί σταθεροποιούνται οι διαμορφώσεις της αλκυλικής αλυσίδας. Οι διαφορές στις διαμορφώσεις οφείλονται κύρια στο πολικό τμήμα. Αυτό το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο γιατί όπως παρατηρείται και στην ομαδοποίηση οι περισσότερες δομές ανήκουν στις ομάδες όπου η RMSD απόκλιση είναι μικρή.

6.6.3 Απουσία διαλύτη

Οι διαμορφώσεις του αναστολέα AX074 που προέκυψαν από τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης κατηγοριοποιούνται με βάση τις τιμές του RMSD έχοντας σημείο αναφοράς τη χαμηλότερη ενέργειας διαμόρφωση -91,61 kJ mol^{-1}.

Ομάδα **1**: **RMSD : 0,00<= KAI =<1,00**.*(12) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **2**: **RMSD : 1,00< KAI =<2,00**.*(55) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **3**: **RMSD : 2,00< KAI =<3,00**.*(63) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **4**: **RMSD : 3,00< KAI =<4,00**.*(54) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **5**: **RMSD : 4,00< KAI =<5,00**.*(11) διαμορφώσεις.*

Ομάδα **6**: **RMSD : 5,00< KAI =<6,00**.*(0) διαμορφώσεις*.

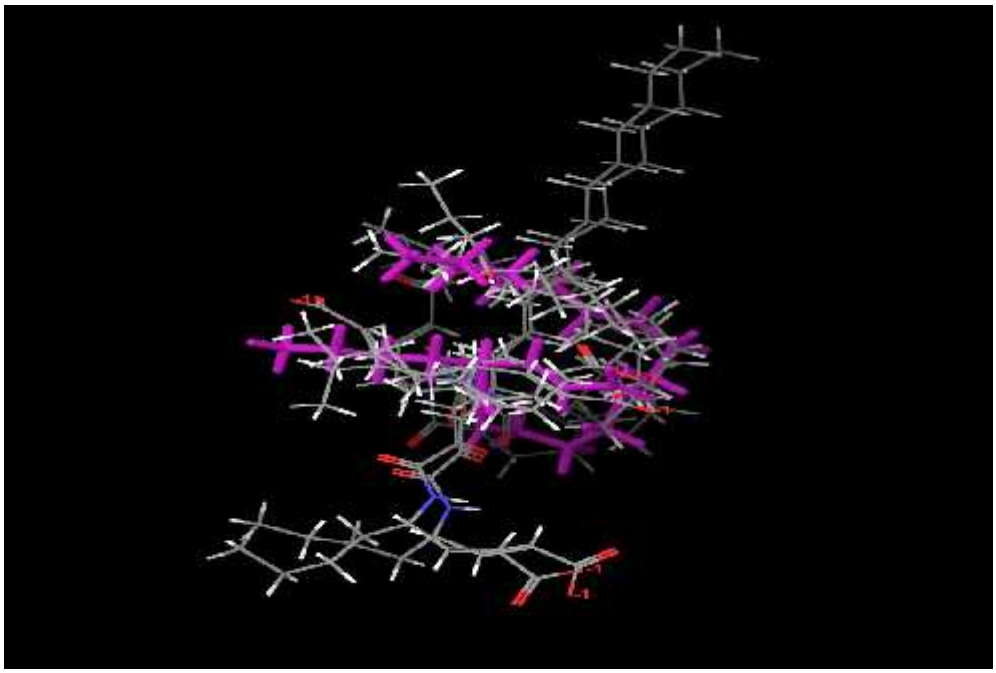
Ομάδα **7**: **RMSD : 6,00< KAI =<7,00**.*(1) διαμορφώσεις*.

Ομάδα **8**: **RMSD : 7,00< KAI =<8,00**.*(5) διαμορφώσεις*.

Καταρτίζεται ο Πίνακας 6.8 με τις χαμηλότερης ενέργειας διαμορφώσεις από τις παραπάνω ομάδες.

Πίνακας 6.8 (Απουσία διαλύτη):$^{\alpha}$ Ομάδες με βάση τις τιμές RMSD, $^{\beta}$ Χαμηλότερης ενέργειας διαμόρφωση από κάθε ομάδα. Οι ενέργειες εκφράζονται σε kJ mol^{-1}.

ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 1	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 2	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 3	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 4	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 5	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 6	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 7	ΟΜΑΔΑ$^{\alpha}$ 8
$^{\beta}$-91,61	$^{\beta}$-89,66	$^{\beta}$-84,40	$^{\beta}$-86,08	$^{\beta}$-80,67	$^{\beta}$	$^{\beta}$-71,10	$^{\beta}$-72,46



Σχήμα 6.17: Υπέρθεση των διαμορφώσεων του Πίνακα 6.8. Με μωβ χρώμα παριστάνεται η διαμόρφωση-σημείο αναφοράς της υπέρθεσης.

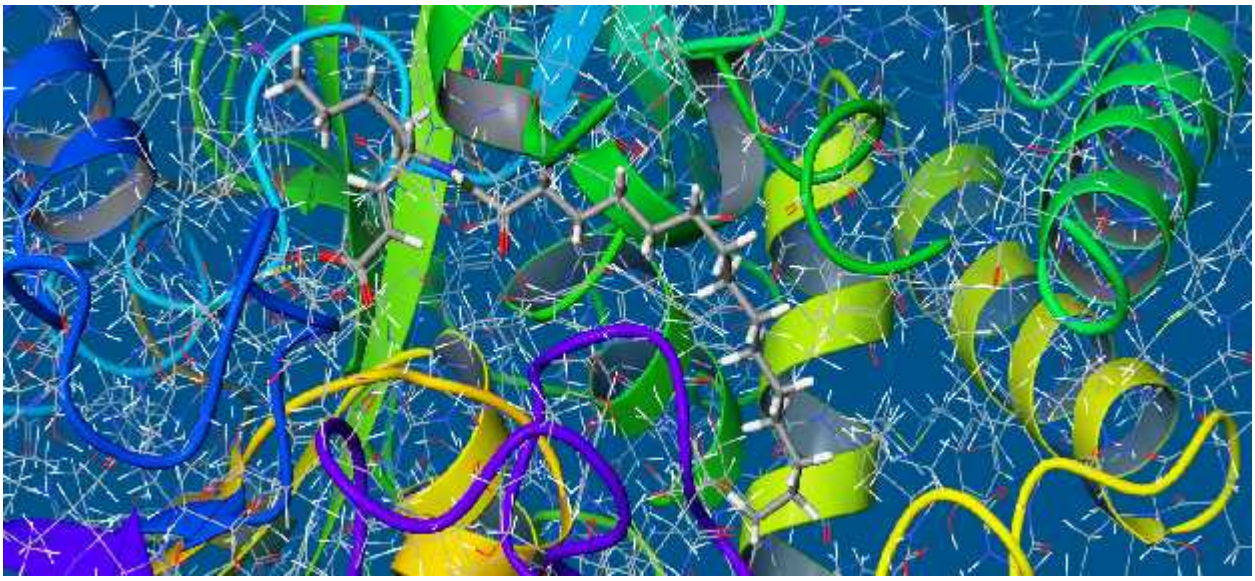
Παρατηρείται ότι οι περισσότερες διαμορφώσεις ταυτίζονται (έχουν μικρό RMSD) και έχουν σχήμα κλειστό (V). Κάποιες όμως είναι ανοικτές με την αλκυλική αλυσίδα να είναι *all trans*. Σε αυτές τις διαμορφώσεις δεν υπάρχει επικοινωνία μεταξύ πολικού και μη πολικού τμήματος.

6.6.4 Γενικά συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από την υπέρθεση των διαμορφώσεων στα τρία περιβάλλοντα μελέτης είναι ότι σε διαλύτη νερό οι διαμορφώσεις διαφέρουν αρκετά μεταξύ τους σε αντίθεση με το διαλύτη $CHCl_3$ και απουσία διαλύτη όπου το RMSD των περισσότερων διαμορφώσεων λαμβάνει μικρές τιμές.[7,61,62,64]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^{ο}

ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ AX074 ΣΤΟ ΕΝΕΡΓΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΥΤΟΣΟΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ A_2



7.1 Προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης αναστολέων της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν ελάχιστα παραδείγματα προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης ενώσεων στο ένζυμο $cPLA_2$. Χαρακτηριστικά, αναφέρονται οι περιπτώσεις των βιβλιογραφικών αναφορών [65] και [66] στις οποίες όμως δεν πραγματοποιείται μια ενδελεχής επισκόπηση των αλληλεπιδράσεων που παρουσιάζονται ανάμεσα στους αναστολείς που μελετώνται και στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.[67]

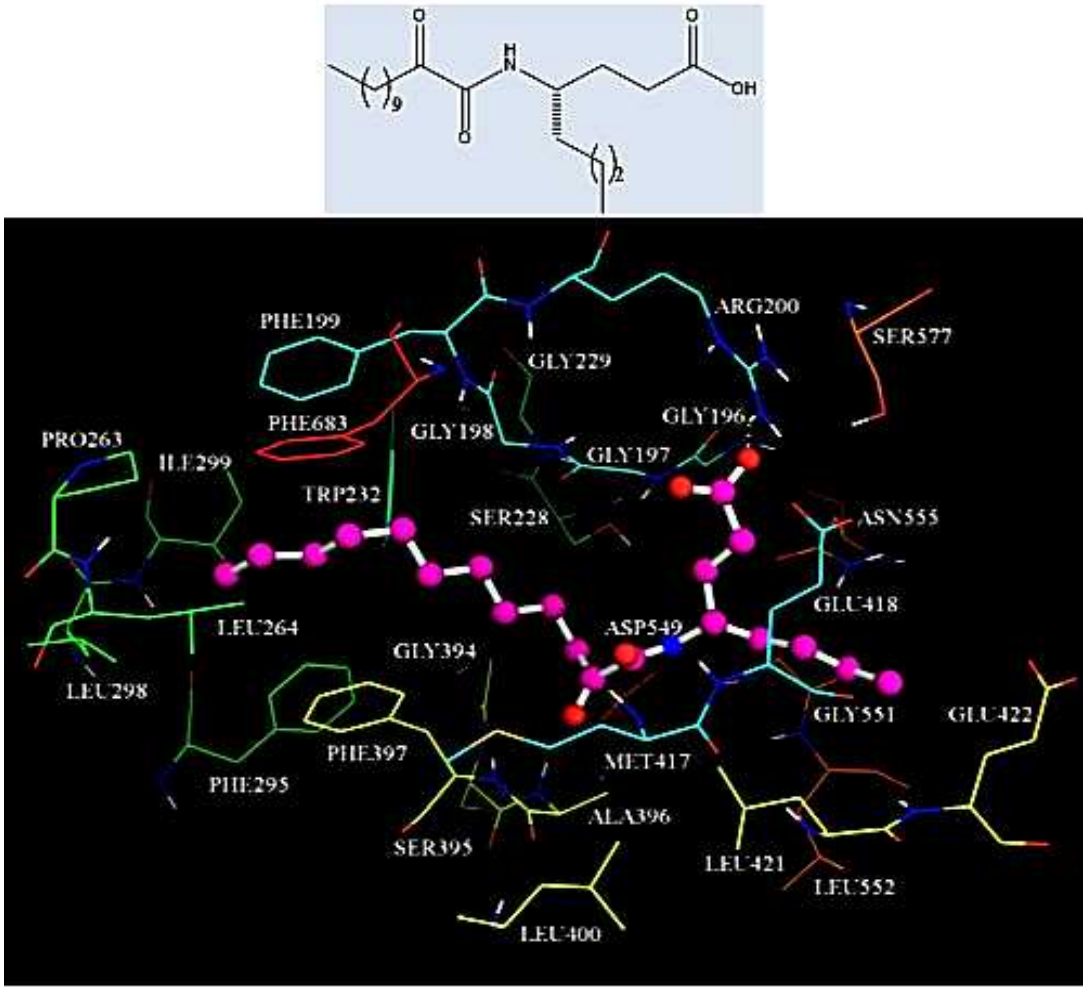
Αναλυτική περιγραφή των αλληλεπιδράσεων, που παρουσιάζονται ανάμεσα σε δύο αναστολείς της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 και το ένζυμο, γίνεται στο άρθρο [68]. Στο άρθρο αυτό μελετάται ο τρόπος πρόσδεσης της πυρροφαινόνης και του οξοαμιδικού αναστολέα AX007. Το σύμπλεγμα του ενζύμου με τον αναστολέα AX007 χρησιμοποιήθηκε για περαιτέρω πειράματα προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης οργανικών ενώσεων βιολογικής σπουδαιότητας στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών οπότε περιγράφεται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

7.2 Περιγραφή συμπλέγματος ενζύμου-αναστολέα AX007 (Μοριακή Δυναμική-Φασματομετρία μάζας ανταλλαγής δευτερίου)

Στο Σχήμα 7.1 απεικονίζεται το σύμπλεγμα GIVA $cPLA_2$-AX007 που προέκυψε από το συνδυασμό πειραμάτων προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής και Φασματομετρίας μάζας ανταλλαγής δευτερίου.[68]

Στο σύμπλεγμα αυτό προτείνεται ο σχηματισμός ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ ενός ατόμου οξυγόνου του καρβοξυλίου του αναστολέα με το αμινοξύ Arg200. Παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις της αλειφατικής 2-οξοάκυλο αλυσίδας με τα αμινοξέα Phe199, Pro263, Leu264 και Phe683 και της μικρής αλειφατικής αλυσίδας με τα αμινοξέα Asn555, Gly551 και Leu552.[8]

Η οξοαμιδική ομάδα δεν αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου με την Ser228, όπως είχε σχεδιαστεί αρχικά, ούτε με κάποιο αμινοξύ που συμμετέχει στην λεγόμενη «κοιλότητα του οξυανιόντος» (Σχήμα 1.8). Οι δύο καρβονυλικές ομάδες του οξοαμιδίου υιοθετούν *S-cis* διαμόρφωση (δίεδρη γωνία: 51,7°) και απέχουν 7,5 Å και 7,0 Å από το άτομο οξυγόνου του υδροξυλίου της Ser228 και το άτομο αζώτου του αμινοξέος Gly197.[69]

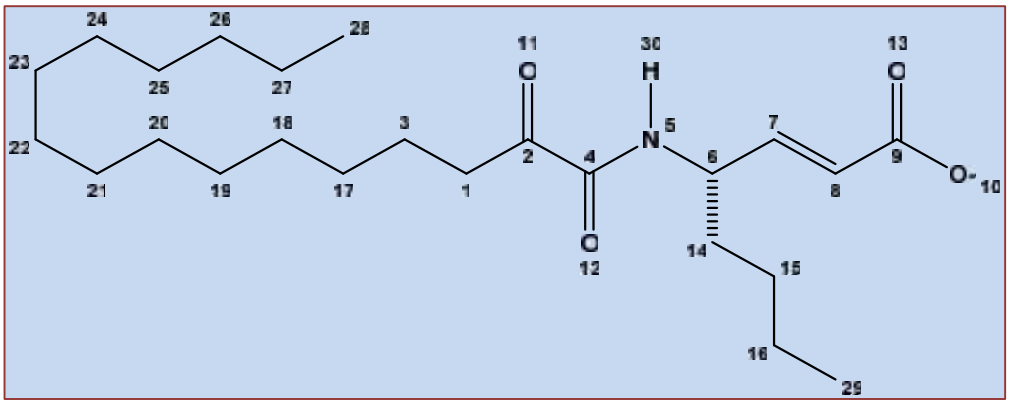


Σχήμα 7.1: Σύμπλεγμα GIVA cPLA$_2$-AX007 που προέκυψε από το συνδυασμό πειραμάτων προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής και φασματομετρίας μάζας ανταλλαγής δευτερίου.[8]

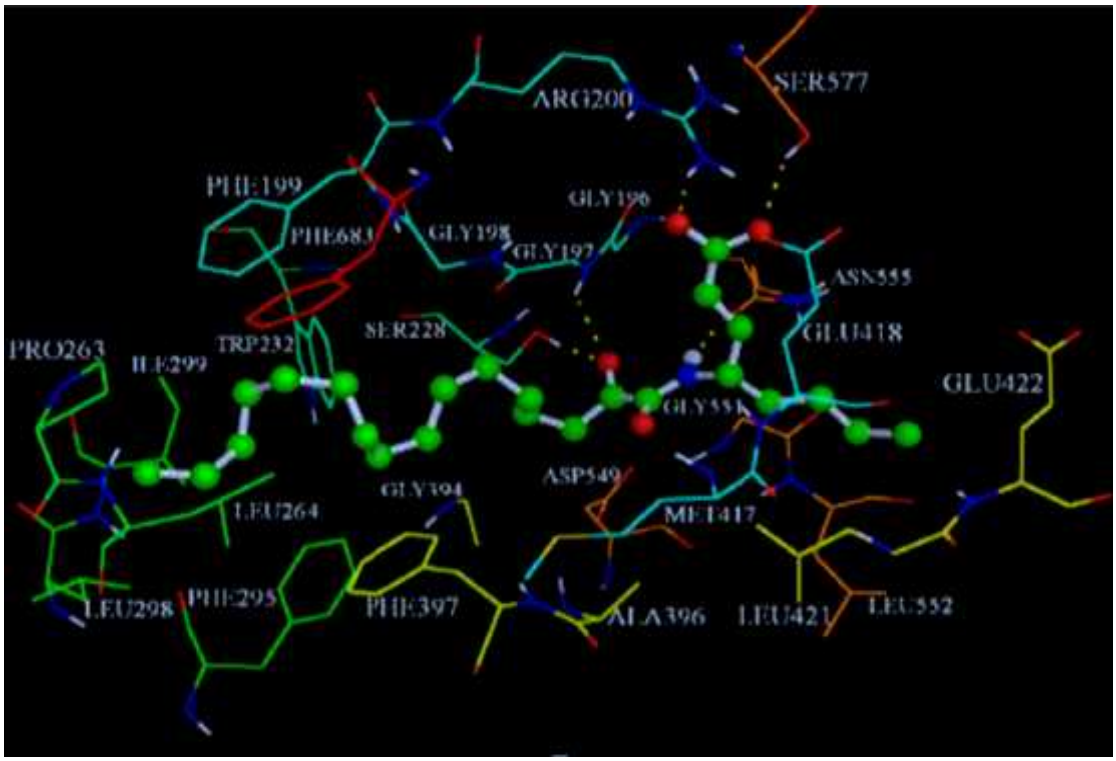
7.3 Περιγραφή συμπλέγματος του αναστολέα AX074 και της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 που προέκυψε με τη μεθοδολογία Surflex-Dock

Το σύμπλεγμα του τμήματος 7.2 χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα μοριακής πρόσδεσης που εκτελέστηκαν με τον αλγόριθμο μοριακής πρόσδεσης Surflex-Dock ο οποίος διατίθεται με το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0 της εταιρίας Tripos.

Μελετήθηκε η μοριακή πρόσδεση του αναστολέα AX074, ο οποίος παρουσιάζει την ισχυρότερη βιολογική δράση από όλους τους αναστολείς που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας από την ομάδα του Καθηγητή κ. Γεώργιου Κόκοτου.



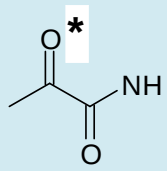
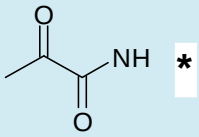
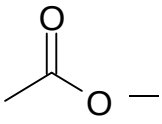
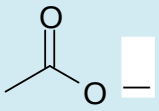
Σχήμα 7.2: Χημική δομή αναστολέα AX074. Η αρίθμηση της ένωσης πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό Chemdraw. (Η αρίθμηση έγινε προς διευκόλυνση του αναγνώστη και δεν σχετίζεται με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας της IUPAC)



Σχήμα 7.3: Σύμπλεγμα AX074-GIVA cPLA$_2$ όπως υπολογίζεται από τον αλγόριθμο Surflex-Dock.[8]

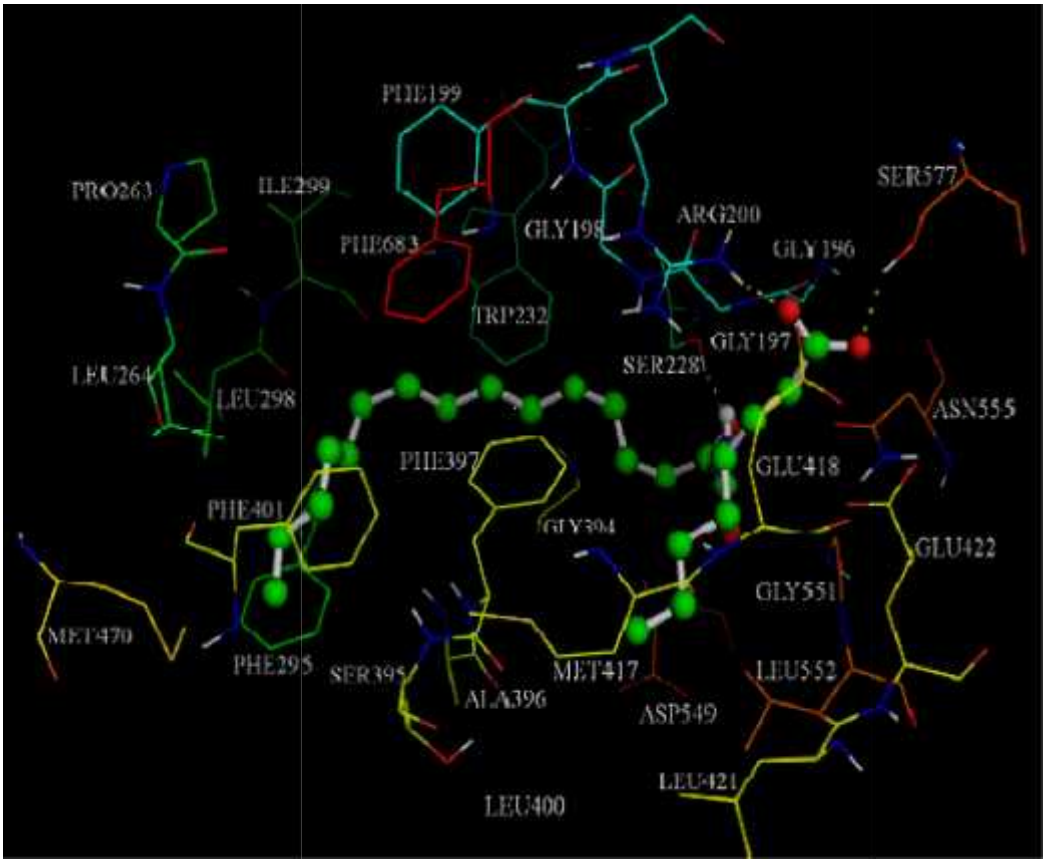
Οι αλληλεπιδράσεις που προτείνονται για τον αναστολέα AX074 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1: Αλληλεπιδράσεις AX074-cPLA$_2$, μέσω δεσμών υδρογόνου, όπως προτείνονται από τον αλγόριθμο Surflex-Dock.

AX074	Αμινοξέα που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου	Απόσταση (A^o)
	• Ser228 (-OH)	O…H 1,80 O…O 2,70
	• Gly197 (-NH_2)	O…H 2,30 O…N 3,00
	• Asn555 (C=O)	H…O 2,10 N…O 3,00
	• Arg200 (-NH_2, γουανιδινικής ομάδας)	O…H 1,90 O…N 2,90
	• Ser577 (-OH)	O…H 2,30 O…O 3,10

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που προτείνονται από τον αλγόριθμο είναι αυτές μεταξύ της αλειφατικής 2-οξοάκυλο αλυσίδας με τα αμινοξέα Phe199, Trp232, Pro263, Leu264, Phe295, Leu298, Ile299, Phe397 και Phe683, και της μικρής αλειφατικής αλυσίδας τεσσάρων ατόμων άνθρακα που αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα Asn555, Gly551 και Leu552.

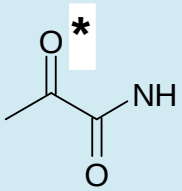
Το σύμπλεγμα AX074-GIVA cPLA$_2$ μελετήθηκε στη συνέχεια με προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής με το Macromodel 9.7 του πακέτου μοριακής μοντελοποίησης Schrödinger 2009.

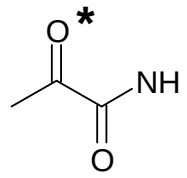
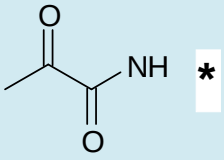
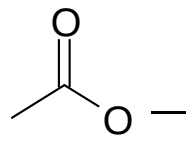
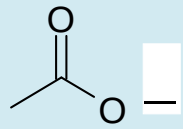


Σχήμα 7.4: Σύμπλεγμα AX074-GIVA cPLA$_2$ που προέκυψε από το πείραμα προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής.[8]

Μελετήθηκαν οι δεσμοί υδρογόνου για να ελεγχθεί η σταθερότητα του συμπλέγματος. Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο υπό μελέτη σύμπλεγμα περιγράφονται στον Πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2: Μελέτη σταθερότητας συμπλέγματος AX074-cPLA$_2$ με πείραμα μοριακής δυναμικής

AX074	**Δεσμοί υδρογόνου**
	• ***Ser228*** •ΑΡΧΙΚΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ O…H 1,80 A^o O…O 2,70 A^o •ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ: O…H ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ: 2,00 A^o ΚΑΙ O…O ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ: 2,80 A^o ⇨***Ο ΔΕΣΜΟΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΔΙΑΤΗΡΕΙΤΑΙ***

	• ***Gly197*** •ΑΡΧΙΚΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ O…H 2,30 A^{o} O…N 3,00 A^{o} •ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ: O…H 2,50 A^{o} O…N 2,90 A^{o} ⇨ ***ΑΣΤΑΘΕΙΑ ΔΕΣΜΟΥ***
	• ***Asn555*** •ΑΡΧΙΚΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ H…O 2,10 A^{o} N…O 3,00 A^{o} •ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ: N…H 2,90 A^{o} N…O 3,65 A^{o} ⇨***ΠΟΛΥ ΑΣΘΕΝΗΣ ΔΕΣΜΟΣ***
	• ***Arg200*** •ΑΡΧΙΚΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ O…H 1,90 A^{o} O…N 2,90 A^{o} •ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ: O…H 2,20 A^{o} O…N 3,15 A^{o} ⇨***ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΣΜΟΥ***
	• ***Ser577*** •ΑΡΧΙΚΟ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ O…H 2,30 A^{o} O…O 3,10 A^{o} •ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ: O…H 2,15 A^{o} O…N 3,05 A^{o} ⇨***ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΔΕΣΜΟΥ***

[8]

7.4 Δημιουργία συμπλέγματος της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης

Προς επίρρωση των ήδη αποκτηθέντων ερευνητικών αποτελεσμάτων μελετήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις του AX074 με τη $cPLA_2$ χρησιμοποιώντας το λογισμικό της εταιρίας Schrodinger με τη μεθοδολογία της επαγόμενης προσαρμογής (IF) ώστε να ληφθεί υπόψη εκτός από την ευελιξία του προσδέματος και αυτή του υποδοχέα.

Ειδικότερα, επιλέχθηκε η μεθοδολογία IF για τους λόγους που αναφέρονται στη συνέχεια:

- Στη βάση δεδομένων πρωτεϊνών υπάρχει μόνο η κρυσταλλογραφημένη δομή της "apo" μορφής της πρωτεΐνης. Για περιπτώσεις, όπως αυτή της $cPLA_2$, οι ερευνητές της εταιρίας Schrödinger συνιστούν την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθοδολογίας,[70]
- Η μεθοδολογία IF εφαρμόζεται, επίσης, στις περιπτώσεις που ο υποδοχέας προσαρμόζει τη διαμόρφωσή του ώστε να επιτευχθεί πρόσδεση ενός μορίου. Η ανθρώπινη κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 είναι ένας τέτοιος υποδοχέας. Στο άρθρο [71] γίνεται αναφορά στην αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης μιας ένωσης στο ενεργό της κέντρο.

Η προετοιμασία της πρωτεΐνης έγινε με την έκδοση Maestro 9.1 με αποτέλεσμα οι περιοχές των αμινοξέων που δεν εμφανίζονται στην κρυσταλλογραφική δομή να μην μπορούν να συμπληρωθούν από το λογισμικό Prime. Για τους θεωρητικούς υπολογισμούς που αναφέρονται στο 8^o κεφάλαιο η εταιρία Schrodinger παρείχε μια νέα βελτιωμένη έκδοση του οδηγού προετοιμασίας πρωτεΐνης και οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με μεγαλύτερης ακρίβειας δομή του ενζύμου. Παρόλα αυτά, οι περιοχές αυτές είναι πολύ μακριά απο το ενεργό κέντρο. Η περιοχή 406-414, που είναι η πλησιέστερη σε αυτό, δε φαίνεται να επηρεάζει το ενεργό κέντρο καθώς η απόσταση από αυτό υπολογίζεται να είναι μεγαλύτερη από 10 Å. Μια μέθοδος που περιγράφεται στο άρθρο [19] αναφέρει πως όταν αποτυγχάνουν τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης με τον υποδοχέα θεωρούμενο ως άκαμπτο τότε μια λύση του προβλήματος είναι η αφαίρεση των πολύ ευκίνητων τμημάτων της πρωτεΐνης. Τα πειράματα με τη μεθοδολογία glide απέτυχαν, και η κρυσταλλογραφημένη δομή μας παρέχει ήδη τη δυνατότητα της αφαίρεσης των ιδιαίτερα ευκίνητων τμημάτων, όπως αυτά που δεν εμφανίζονται στην κρυσταλλογραφική δομή.[4,69] Η ανθρώπινη κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 κρυσταλλώθηκε σε συνθήκες pH 8,5 που είναι και οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του ενζύμου.[4,58]

Στο ενεργό κέντρο επιλέχθηκε να μην υπάρχουν μόρια νερού. Μπορεί η κρυσταλλογραφική δομή να περιέχει μόριο νερού (αριθμός στο αρχείο τύπου pdb: 3021) στο ενεργό κέντρο, αλλά σύμφωνα με τα άρθρα [4,58,68] δε χρειάζεται μόριο νερού αφού το ρόλο του πυρηνόφιλου παίζει η Ser228.

Τέλος, όλα τα βήματα μέχρι και τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης για τον αναστολέα AX074 πραγματοποιήθηκαν σε διαλύτη νερό αφού το ένζυμο $cPLA_2$ είναι υδατοδιαλυτό και προσδένεται στη μεσεπιφάνεια μεμβράνης-νερού.[72]

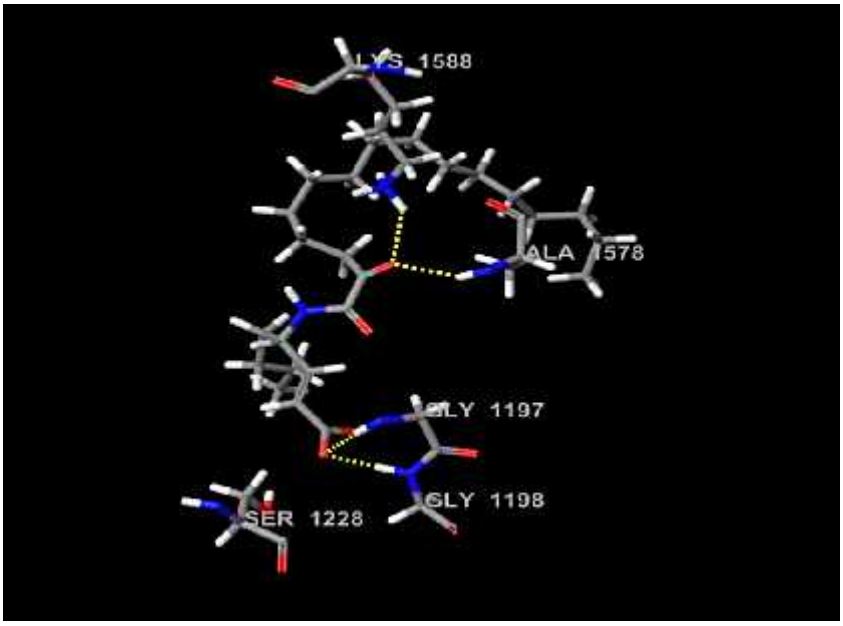
7.5 Σύγκριση μοριακής πρόσδεσης μεταξύ των δύο μονομερών της κρυσταλλογραφικής δομής της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης

Πραγματοποιήθηκαν θεωρητικοί υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης στα μονομερή A και B της $cPLA_2$[1] με σκοπό να μελετηθεί ποιό από τα δύο μονομερή δίνει μεγαλύτερη βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης για τον αναστολέα AX074 και αλληλεπιδράσεις με απαραίτητα αμινοξέα σύμφωνα με τον τρόπο σχεδίασης της ένωσης. Το μονομερές που θα παρουσίαζε μια εικόνα πρόσδεσης πλησιέστερη στην απεικόνιση του συμπλέγματος που περιγράφεται στο τμήμα 7.2, πρέπει να προτιμηθεί για τη μετέπειτα μελέτη του ενζύμου. Στον Πίνακα 7.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών αυτών και στο Σχήμα 7.5 παρουσιάζεται η εικόνα του συμπλέγματος ενζύμου-αναστολέα που προκύπτει από το θεωρητικό υπολογισμό μοριακής πρόσδεσης στο μονομερές B της κρυσταλλογραφικής δομής της $cPLA_2$.

Πίνακας 7.3: Μοριακή πρόσδεση του αναστολέα AX074 στα μονομερή A και B του ενζύμου

Διαδικασία	AX074	Υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης
Induced Fit (1CJYA)	Διαμόρφωση με ενέργεια -371,789 kJ mol^{-1}	-14,575
Induced Fit (1CJYB)	Διαμόρφωση με ενέργεια -371,789 kJ mol^{-1}* *: η διαμόρφωση που έδωσε την υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης στον αντίστοιχο υπολογισμό με το A μονομερές	-9,336

[1]Το αρχείο τύπου pdb περιέχει 2 μονομερή του ενζύμου, τα οποία υπερτιθέμενα διαφέρουν ~4°-5° στον καταλυτικό τομέα.[4]



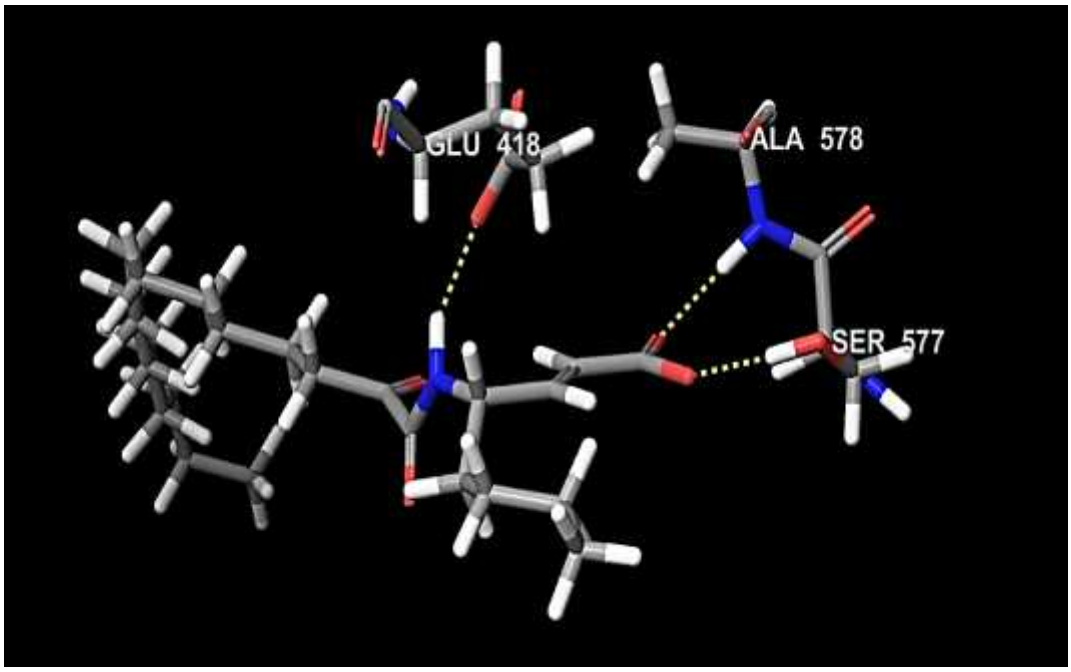
Σχήμα 7.5: Αλληλεπιδράσεις, μέσω δεσμών υδρογόνου, ανάμεσα στον αναστολέα AX074 και το ένζυμο $cPLA_2$ όπως αυτές προκύπτουν από την προσομοίωση μοριακής πρόσδεσης στο μονομερές Β του ενζύμου. Παρατηρούνται δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly1197, Gly1198, Ala1578, Lys1588.

Γίνεται εύκολα κατανοητό πως το μονομερές με ταυτότητα 1CJYA πρέπει να προτιμηθεί σε μετέπειτα υπολογισμούς αφού παρουσίασε υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης και η εικόνα αναστολέα-ενζύμου προσομοιάζει το σύμπλεγμα του τμήματος 7.2. Το σύμπλεγμα αυτό περιγράφεται στο τμήμα 7.6.

7.6 Περιγραφή συμπλέγματος του αναστολέα AX074 και της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης που προέκυψε με τη μεθοδολογία IF

Ο προσδιορισμός του ενεργού κέντρου της ανθρωπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης έγινε με βάση τα αμινοξέα Gly197, Gly198, Arg200, Ser228, Trp232, Thr330, Phe397, Asp549, Asn555, και Thr680, τα οποία περιγράφονται στο άρθρο [4].

Πραγματοποιήθηκε θεωρητικός υπολογισμός μοριακής πρόσδεσης της ένωσης AX074 στο μονομερές Α του ενζύμου. Οι αλληλεπιδράσεις, μέσω δεσμών υδρογόνου, στο σύμπλεγμα που προέκυψε από τον υπολογισμό παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.6 και στον Πίνακα 7.4.

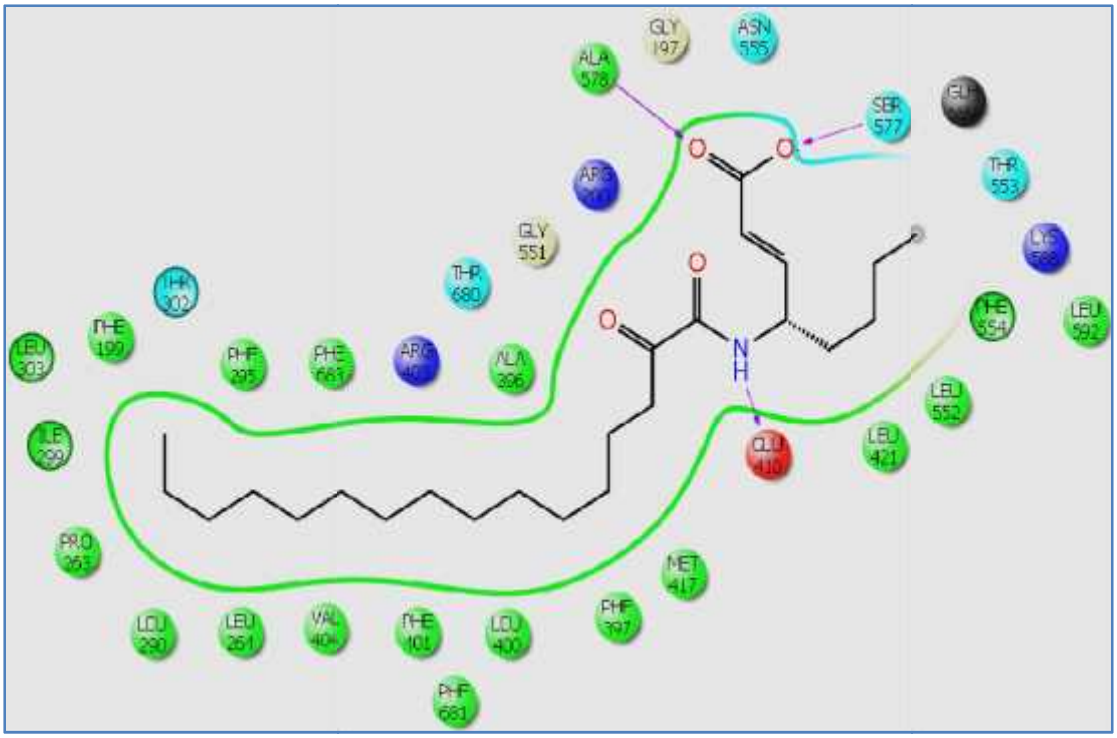


Σχήμα 7.6: Αλληλεπιδράσεις, μέσω δεσμών υδρογόνου, μεταξύ του μορίου AX074 και των αμινοξέων Ala578, Ser577, Glu418 στο ενεργό κέντρο της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης.

Πίνακας 7.4: Αλληλεπιδράσεις μορίου AX074 και ενζύμου μέσω δεσμών υδρογόνου. Η αρίθμηση των ατόμων του μορίου AX074 γίνεται σύμφωνα με το Σχήμα 7.2.

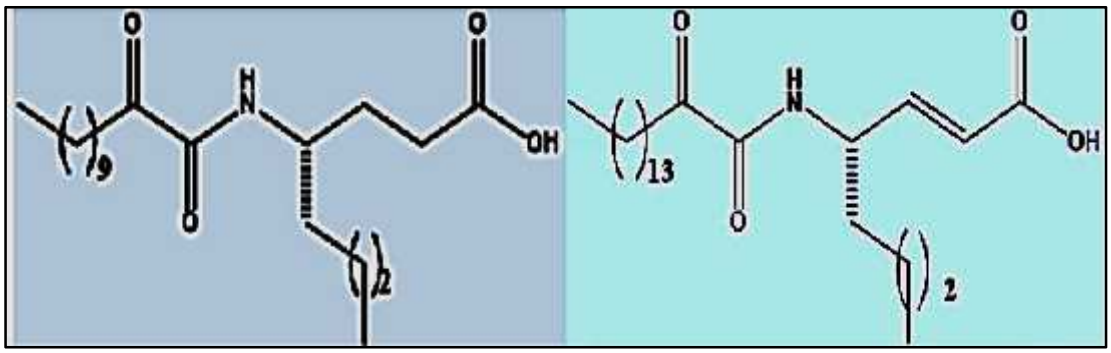
Αλληλεπίδραση	Απόσταση (Å)
Άτομο 13 - Ala578 O…HN	1,854
Άτομο 10 - Ser577 O…HO	1,805
Άτομο 30 - Glu418 NH…O	2,005

Στη συνέχεια στο σχήμα 7.7 παρουσιάζεται δισδιάστατη απεικόνιση του αναστολέα AX074 στο ενεργό κέντρο του μορίου.



Σχήμα 7.7: Μοριακή πρόσδεση AX074 στο ενεργό κέντρο της cPLA$_2$. Κόκκινες σφαίρες: αμινοξέα με αρνητικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, Μπλε σφαίρες: αμινοξέα με θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, Γαλάζιες σφαίρες: αμινοξέα με πολικές πλευρικές αλυσίδες, Πράσινες σφαίρες: αμινοξέα με υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες. Μωβ βέλη: δεσμοί υδρογόνου με βασικό σκελετό πρωτεΐνης, Μωβ διακεκομμένα βέλη: δεσμοί υδρογόνου με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται μεταξύ της μικρής αλειφατικής αλυσίδας του μορίου AX074 με τα υδρόφοβα τμήματα των αμινοξέων Leu421 και Leu592. Μεταξύ της αλειφατικής 2-οξάκυλο αλυσίδας και της πρωτεΐνης παρατηρούνται οι εξής υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις: Phe199, Pro263, Leu264, Phe295, Leu298, Ile299, Ala396, Phe397, Leu400, Phe401, Val404, Met417, Leu421 και Phe683. Το τμήμα του μορίου που περιέχει το διπλό δεσμό (δομή αλκενίου) αλληλεπιδρά υδροφοβικά με το αμινοξύ Ala578. Οι γκρι κύκλοι που διακρίνονται στη μικρή ανθρακική αλυσίδα απεικονίζουν έκθεση του συγκεκριμένου τμήματος του μορίου στο διαλύτη.

7.7 Σύγκριση συμπλέγματος που προέκυψε από τη διαδικασία IF με το σύμπλεγμα που προέκυψε από το συνδυασμό των τεχνικών της Μοριακής Δυναμικής με τη Φασματομετρία μάζας ανταλλαγής δευτερίου και του συμπλέγματος από τον αλγόριθμο Surflex-Dock



Σχήμα 7.8: Χημικές δομές AX007 (αριστερά) και AX074 (δεξιά)

Οι δομικές διαφορές μεταξύ του αναστολέα AX007 και του αναστολέα AX074 εντοπίζονται στα εξής σημεία:

- Ο AX074 έχει 14 άτομα άνθρακα στην αλειφατική 2-οξοάκυλο αλυσίδα και περιέχει ένα διπλό δεσμό ανάμεσα στα α-C και β-C άτομα. Ο AX007 έχει 10 άτομα άνθρακα στην αλειφατική 2-οξοάκυλο αλυσίδα και δεν περιέχει διπλό δεσμό.

Το σύμπλεγμα AX074 και ενζύμου που προέκυψε με τη διαδικασία IF και το σύμπλεγμα AX007-cPLA$_2$ που προέκυψε από το συνδυασμό της μοριακής δυναμικής με τη φασματομετρία μάζας ανταλλαγή δευτερίου παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες αλλά και διαφορές ενώ με το σύμπλεγμα που προτείνεται από τον αλγόριθμο Surflex-Dock υπάρχουν σημαντικές διαφορές. Ολα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.5.

Πίνακας 7.5: Σύγκριση συμπλεγμάτων που προέκυψαν από τη χρήση διαφορετικών αλγόριθμων

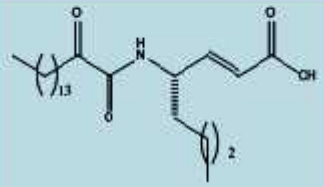
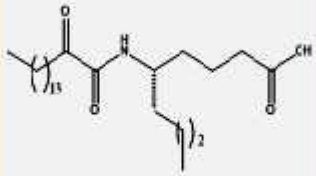
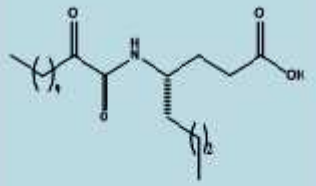
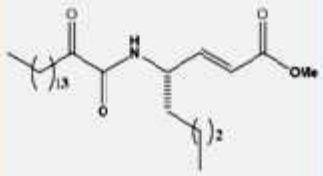
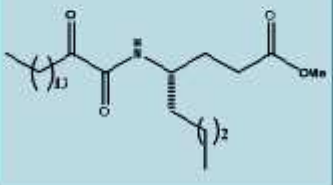
ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ AX007-cPLA$_2$ (Μοριακή Δυναμική και Φασματομετρία Μάζας Ανταλλαγής Δευτερίου)	**ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ AX074-cPLA$_2$ (IF)**	**ΣΥΜΠΛΕΓΜΑ AX074-cPLA$_2$ (Surflex-Dock)**
Αλληλεπίδραση μέσω δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Arg200	Ενεργειακά μη ευνοϊκή (bad) αλληλεπίδραση με το αμινοξύ Arg200. Σύμφωνα με τον αλγόριθμο IF, η αλληλεπίδραση αυτή δεν πληρεί όλες τις προϋποθέσεις για να θεωρηθεί δεσμός υδρογόνου. Οι προϋποθέσεις για να θεωρείται ένας δεσμός δεσμός υδρογόνου είναι οι εξής: 1) μέγιστη απόσταση ατόμου H από άτομο Y: 2,5 Å (Y=δέκτης δεσμού υδρογόνου), 2) ελάχιστη γωνία που σχηματίζεται από τα άτομα X-H...Y: 120° (X=δότης δεσμού υδρογόνου), 3) ελάχιστη γωνία που σχηματίζεται από τα άτομα H...Y-Z: 90° (Z=το άτομο που συνδέεται ομοιοπολικά με το άτομο-δέκτη δεσμού υδρογόνου). Στην περίπτωση του συμπλέγματος από IF, δεν πληρείται το 2ο κριτήριο όπου η γωνία ισούται με 113° ·Ala578 ·Ser577 ·Glu418	Δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα: ·Ser228 ·Gly197 ·Asn555 ·Arg200 ·Ser577

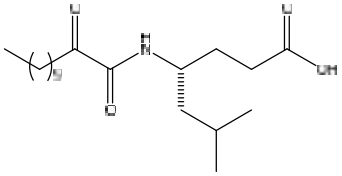
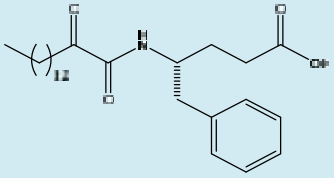
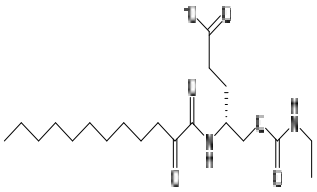
Οι δύο καρβονυλικές ομάδες του οξοαμιδίου υιοθετούν S-cis διαμόρφωση (δίεδρη γωνία: 51,7°) και απέχουν ~ 7,5 Å και 7,0 Å από το άτομο οξυγόνου του υδροξυλίου της Ser228 και το άτομο αζώτου του αμινοξέος Gly197	Οι δύο καρβονυλικές ομάδες του οξοαμιδίου σχηματίζουν δίεδρη γωνία: -89,7° και απέχουν 5,68 Å και 5,66 Å από το άτομο οξυγόνου του υδροξυλίου της Ser228. Από το άτομο αζώτου του αμινοξέος Gly197 απέχουν 4,99 Å και 5,89 Å	Αλληλεπιδρά ο αναστολέας μέσω δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Ser228
Παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις της μικρής αλειφατικής αλυσίδας με τα αμινοξέα Asn555, Gly551 και Leu552	Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται μεταξύ της μικρής αλειφατικής αλυσίδας του μορίου AX074 με τα υδρόφοβα τμήματα των αμινοξέων Leu421 και Leu592	Η μικρή αλειφατική αλυσίδα τεσσάρων ατόμων άνθρακα αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα Asn555, Gly551 και Leu552
Παρατηρούνται αλληλεπιδράσεις της αλειφατικής 2-οξοάκυλο αλυσίδας με τα αμινοξέα Phe199, Pro263, Leu264 και Phe683	Μεταξύ της αλειφατικής 2-οξάκυλο αλυσίδας και της πρωτεΐνης παρατηρούνται οι εξής υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις: Phe199, Pro263, Leu264, Phe295, Leu298, Ile299, Ala396, Phe397, Leu400, Phe401, Val404, Met417, Leu421 και Phe683	Η αλειφατική 2-οξοάκυλο αλυσίδα συμμετέχει σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Phe199, Trp232, Pro263, Leu264, Phe295, Leu298, Ile299, Phe397 και Phe683

[8,68,69]

Τη δημιουργία του συμπλέγματος ακολούθησε η διαδικασία της αξιολόγησής του με σκοπό να μελετηθεί αν δύναται να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω πειράματα προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης οργανικών ενώσεων βιολογικής σπουδαιότητας. Για την αξιολόγηση του συμπλέγματος χρησιμοποιήθηκαν βιολογικά δραστικές ενώσεις που παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή κ. Γεώργιου Κόκοτου. Έγινε χρήση και μίας μη δραστικής ένωσης ώστε να ελεγχθεί εαν είναι εφικτός ο διαχωρισμός των βιολογικά δραστικών ενώσεων από εκείνες που δεν παρουσιάζουν βιολογική δράση. Η αξιολόγηση έγινε με χρήση των δύο αλγορίθμων Glide και IF. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.6.

Πίνακας 7.6: Βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης ενώσεων με σκοπό την αξιολόγηση του συμπλέγματος που προέκυψε με τη διαδικασία IF.

A/A	Χημική δομή	Υψηλότερη βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης Αλγόριθμος Glide	Υψηλότερη βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης Αλγόριθμος IF	X_i(50)	Δεσμοί H (Glide)	Δεσμοί H (IF)
AX074		-12,386	-15,937	0.003	Glu418 Ser577 Ala578	Ala578 Thr630
AX109		-13,286	-15,391	0.005	Arg200 Glu418 Ser577	Arg200 Ala578
AX007		-10,868	-14,664	0.009	Arg200 Glu418 Ser577	Arg200 Thr630
AX073		-12,489	-12,941	0.018	Ala578 Glu418	Arg200 Ala578 Thr630
AX063		-13,045	-12,634	0.019	Arg200 Ser577 Glu418	Arg200 Ala578

AX013		-10,314	-13,229	0.021	Arg200 Glu418 Ser577 Ala578	Glu418
AX016		-12,938	-15,384	0.035	Glu418 Ser577 Ala578	Arg200 Ala578 Glu418
		-11,184	-10,834	-	Glu418 Gly551 Ser577 Ala578	Arg200 Ala578 Lys588 Glu589

Απο τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.4, το σύμπλεγμα που δημιουργήθηκε με τη μεθοδολογία IF φαίνεται περισσότερο αξιόπιστο σε υπολογισμούς στους οποίους εφαρμόζεται η μέθοδος της επαγόμενης προσαρμογής (IF). Αυτό συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία όπου το ένζυμο $cPLA_2$ παρουσιάζεται να αλλάζει τη διαμόρφωσή του ώστε να προσδεθεί το υπόστρωμα ή ένας αναστολέας.[71]

Διεξήχθη πείραμα προσομοίωσης με Μοριακή Δυναμική ώστε να προκύψει σύμπλεγμα το οποίο να θεωρείται ακόμα περισσότερο αξιόπιστο, κάνοντας χρήση του λογισμικού AMBER, χωρίς επιτυχία. Η ερευνητική αυτή εργασία θα συνεχισθεί από πιο έμπειρους ερευνητές στο πεδίο της Μοριακής Δυναμικής. Στόχος της Μοριακής Δυναμικής είναι να εξακριβωθεί εάν μπορούν να εξηγηθούν οι διαφορές που παρατηρήθησαν από τη χρήση των διαφόρων λογισμικών μοριακής πρόσδεσης και περαματικών δεδομένων λόγω ευελιξίας του προσδέματος ή προσδέτη.

7.8 Μοριακή πρόσδεση του αναστολέα AX074 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου παρουσία ενός μορίου νερού

Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός μοριακής πρόσδεσης στο ένζυμο $cPLA_{2,}$ στο ενεργό κέντρο στο οποίο διατηρείται το μόριο νερού (Ταυτότητα στο αρχείο τύπου pdb: 3021) που αναφέρεται στην κρυσταλλογραφική μελέτη.[4]

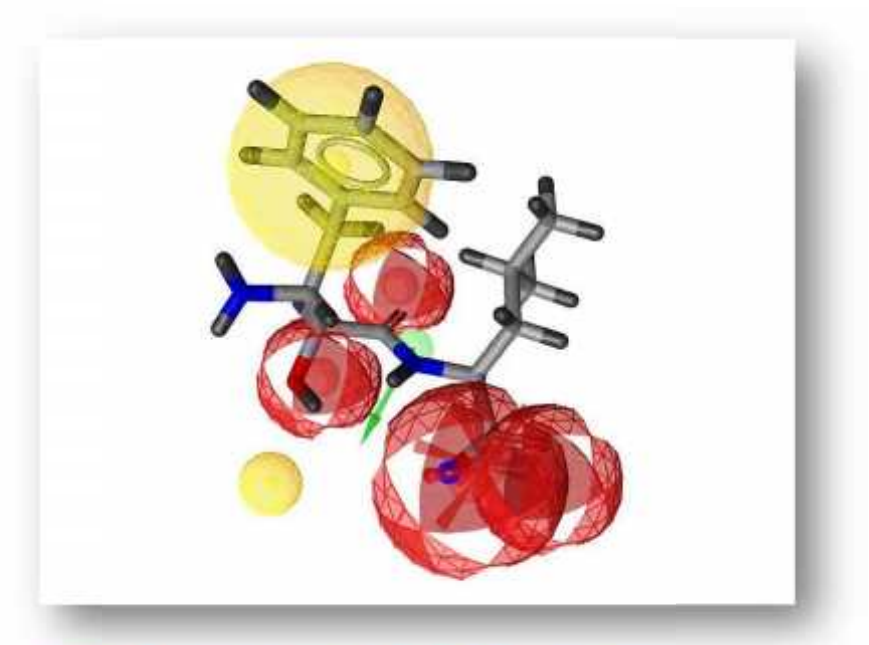
Και στις δύο περιπτώσεις που πραγματοποιείται ο υπολογισμός, δεν παράγεται απεικόνιση της ένωσης AX074 προσδεδεμένη στο ενεργό κέντρο, πράγμα που πιθανότατα συμβαίνει γιατί το μόριο του νερού λειτουργεί σαν εμπόδιο στην τοποθέτηση της ένωσης.

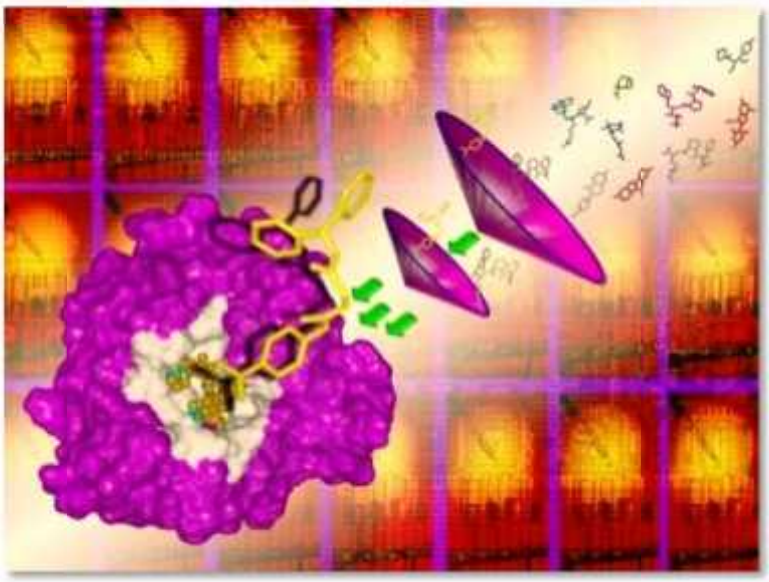
7.9 Μοριακή πρόσδεση ενώσεων εκγύμνασης και αξιολόγησης φαρμακοφόρου μοντέλου

Πριν τη δημιουργία και την αξιολόγηση του φαρμακοφόρου μοντέλου (Κεφάλαιο «Δημιουργία Φαρμακοφόρου Μοντέλου για την Ανθρώπινη Κυτοσολική Φωσφολιπάση»), οι ενώσεις εκγύμνασης (training set) και οι ενώσεις αξιολόγησης (test set) μελετήθηκαν για τον τρόπο πρόσδεσής τους στο ενεργό κέντρο της $cPLA_2$ με τη χρήση του αλγορίθμου Glide και του συμπλέγματος του ενζύμου με τον αναστολέα AX074 που προέκυψε από τη μεθοδολογία IF. Ο σκοπός αυτής της μελέτης έγκειται στο να διαπιστωθεί αν οι ενώσεις προσδένονται ικανοποιητικά στο ενεργό κεντρο του ενζύμου άρα εξασκούν βιολογική δράση με συγκρίσιμο τρόπο.[23] Επιπλέον, μπορεί να διαπιστωθεί αν όλες οι επιλέξιμες ενώσεις αλληλεπιδρούν με κρίσιμα αμινοξέα του ενζύμου. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών έδειξαν πρόσδεση όλων των ενώσεων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, και αλληλεπίδραση με κάποια από τα κρίσιμα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Ειδικά για την περίπτωση των ενώσεων που περιέχουν το στοιχείο του φθορίου στη δομή τους, παρατηρήθηκε πως η ομάδα $RCOCF_3$ βρίσκεται σε χωρική εγγύτητα με τη Ser228, δεδομένο που αναφέρεται στο άρθρο [73] και παρέχει άλλη μια ένδειξη για το βαθμό αξιοπιστίας του συμπλέγματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^{ο}

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΚΥΤΟΣΟΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗΣ (human cPLA$_2$)





8.1 Εισαγωγή

Ο εντοπισμός του φαρμακοφόρου έχει ιδιαίτερη σημασία για τη δημιουργία καινοτόμων φαρμακευτικών ουσιών αφου μπορεί να οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων ενώσεων-οδηγών (lead compounds) και να επιτρέψει τη βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων των ήδη υπαρχόντων διαμέσου δομικών τροποποιήσεων.[6]

Με στόχο, λοιπόν, την ανακάλυψη νέων ενώσεων-οδηγών που θα παρουσιάζουν επιθυμητή δράση έναντι της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης $A_{2,}$ χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό **LigandScout** της εταιρίας **Inte:Ligand** για τη δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου για το ένζυμο αυτό.

8.2 Επιλογή μεθοδολογίας για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου

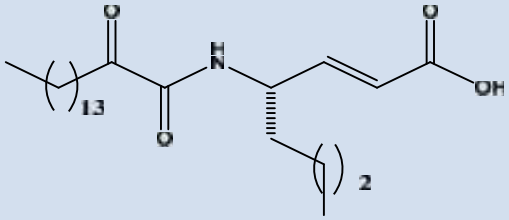
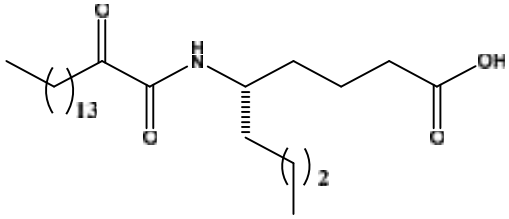
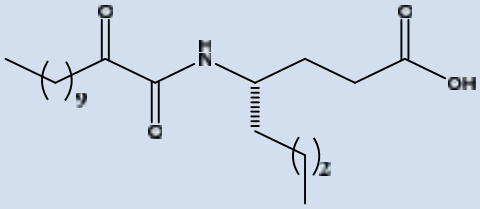
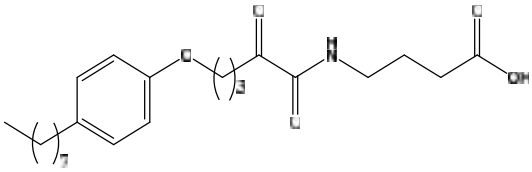
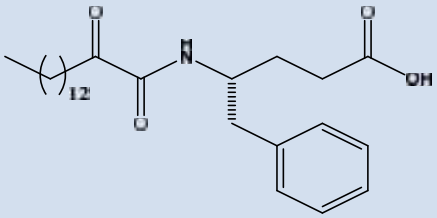
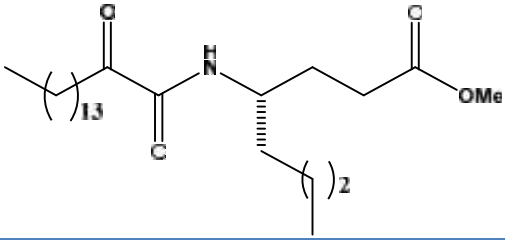
Το λογισμικό LigandScout παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας φαρμακοφόρου μοντέλου χρησιμοποιώντας τις μεθοδολογίες δημιουργίας φαρμακοφόρου που αναπτύχθηκαν στο τμήμα 3.1.[30]

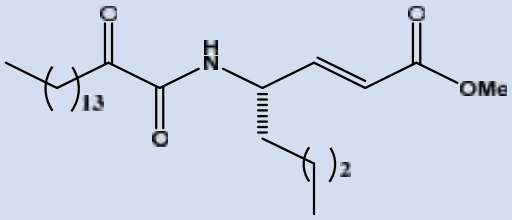
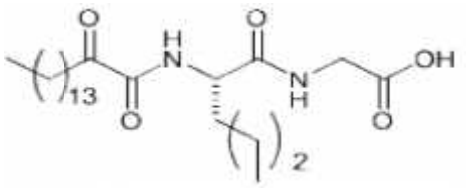
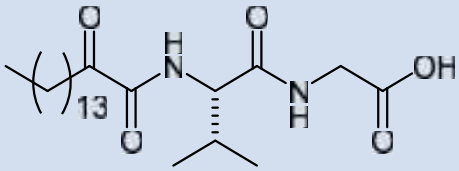
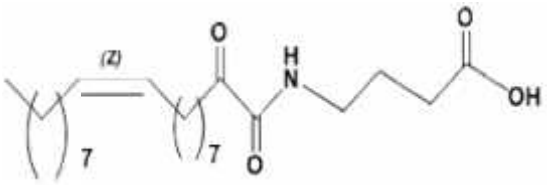
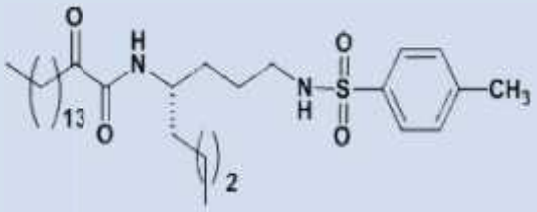
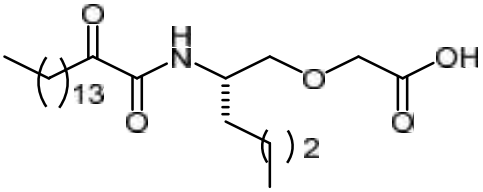
Στην περίπτωση της GIVA $cPLA_{2,}$ το ένζυμο δεν υφίσταται συγκρυσταλλωμένο με κάποιο προσδέτη, αλλά υπάρχει μόνο μία κρυσταλλογραφική δομή της "apo" μορφής του (PDB ID:1cjy).[2] Γι’ αυτό το λόγο εφαρμόσθηκε υπέρθεση του αναστολέα AX074 και άλλων γνωστών αναστολέων από τη βιβλιογραφία προκειμένου να αναπτυχθεί φαρμακοφόρο μοντέλο (ligand based μεθοδολογία).

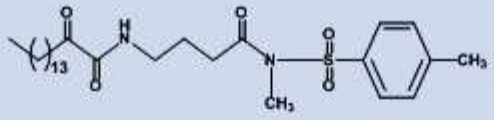
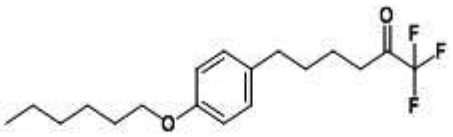
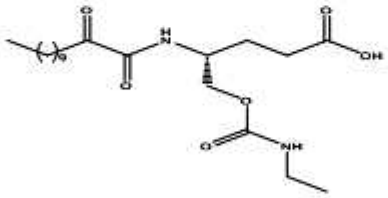
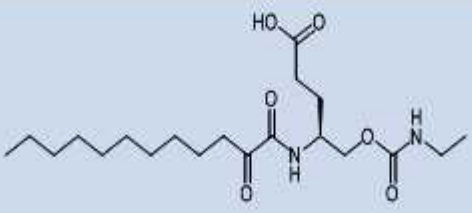
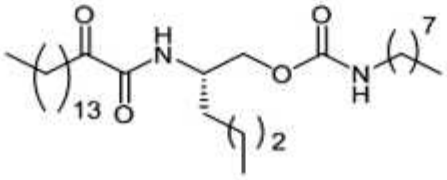
8.3 *Επιλογή αναστολέων για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου και την αξιολόγησή του*

Για την επίτευξη του στόχου μας, επιλέχθηκαν εκλεκτικοί αναστολείς της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης A_2 ποικίλης χημικής δομής πρός κάλυψη όσο το δυνατό μεγαλύτερου διαμορφωτικού χώρου. Οι χημικές δομές των επιλεγέντων αναστολέων, και η *in vitro* βιολογική τους δράση περιγράφονται στον Πίνακα 8.1. Οι χημικές δομές των μορίων αντλήθηκαν από τις βιβλιογραφικές παραπομπές [1,69,74-78].

Πίνακας 8.1: Χημικές δομές αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου και την αξιολόγησή του και η *in vitro* βιολογική τους δράση.

Α/Α	ΟΝΟΜΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ[α]
1	AX074		$X_I(50) = 0.003$
2	AX109		$X_I(50) = 0.005$
3	AX007		$X_I(50) = 0.009$
4	GK165		$X_I(50) = 0.023$
5	AX016		$X_I(50) = 0.035$
6	AX063		$X_I(50) = 0.019$

7	AX073		$X_I(50)$ = 0.018
8			$X_I(50)$ = 0.035+/- 0.014
9			$X_I(50)$ = 0.061+/- 0.017
10			$X_I(50)$ = 0.011+/- 0.003
11			$X_I(50)$ = 0.033+/- 0.018
12			$X_I(50)$ = 0.017+/- 0.002

13			$X_I(50)$ = 0.033+/- 0.018
14			$X_I(50)$ = 0.0098+/- 0.0006
15			$X_I(50)$ = 0.03 (IC_{50} = 0,9µM) [79]
16			-
17			-
18			-

[α] :IC_{50}: Η συγκέντρωση στην οποία ένας αναστολέας προκαλεί το μισό της μέγιστης απόκρισης του ενζύμου-στόχου.[80] X_I(50): Η συγκέντρωση του αναστολέα σε μια δισδιάστατη μικκυλιακή επιφάνεια που παράγει 50% αναστολή. Χρησιμοποιείται, αντί της καθιερωμένης τιμής IC_{50}, σε περιπτώσεις όπως των ενζύμων GIVA και GVIA PLA_2, τα οποία δραστηριοποιούνται σε δισδιάστατη λιπιδική μεσεπιφάνεια η οποία περιέχει τα φωσφολιπιδικά υποστρώματα. Η IC_{50} χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις διαλυμάτων με διαλυτά, μονομερή υποστρώματα.[76]

Οι δομές (1-7) ονομάζονται ενώσεις εκγύμνασης (training set) και χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου. Οι δομές (8-15) αποτελούν τις ενώσεις αξιολόγησης (test set) και οι δομές (16-18) τα παραπλανητικά μόρια (decoys). Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου, χρησιμοποιήθηκαν επίσης και για την αξιολόγησή του, βασιζόμενοι στον τρόπο εργασίας που ακολουθείται στο άρθρο της βιβλιογραφικής παραπομπής [81].

8.4 Δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου

Τα στάδια, πριν τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου, περιλαμβάνουν:

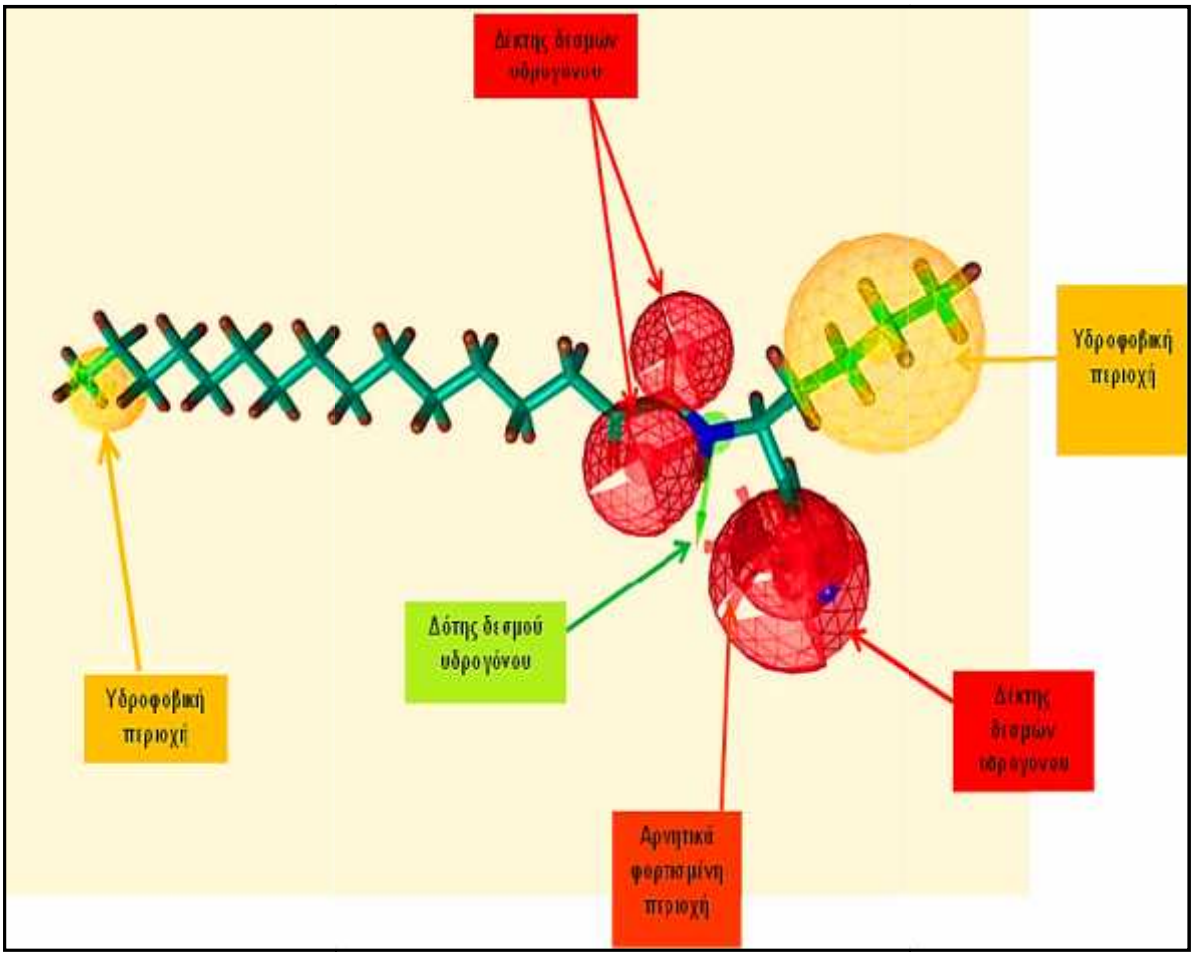
(α) Προετοιμασία του προσδέτη σε pH 8 το οποίο αποτελεί το περιβάλλον βέλτιστης λειτουργίας του ενζύμου $cPLA_2$. (β) Ελαχιστοποίηση της ενέργειας του προσδέτη. Το στάδιο αυτό δεν κρίθηκε απαραίτητο λόγω της μεγάλης ευελιξίας των μορίων.[4,7,58]

Μετά από πολλές δοκιμές επιλέχθηκαν οι ενώσεις (1-7) για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου. Στη συνέχεια, περιγράφεται αναλυτικά ο τρόπος επιλογής των ενώσεων εκγύμνασης.

Αρχικά, επιλέχθηκαν ως ενώσεις εκγύμνασης αυτές που "προτείνει" η χρήση του ίδιου του λογισμικού εφαρμόζοντας τη μέθοδο ομαδοποίησης «LigandScout’s clustering method». Αυτή βασίζεται στην επιλογή εκείνων των ενώσεων που έχουν τη μεγαλύτερη ομοιότητα σε φαρμακοφόρα τμήματα.[30] Τα αποτελέσματα, όμως, αξιολόγησης των διαφόρων φαρμακοφόρων μοντέλων που προέκυψαν με αυτό τον τρόπο δεν κρίθηκαν αξιόλογα αφού κατέληγαν σε μη ικανοποιητικό αριθμό ενεργών αναστολέων (μέχρι 6) που πληρούσαν τα κριτήρια που τίθενται για τα μοντέλα αυτά. Η δημιουργία τους πραγματοποιήθηκε με βάση την επιλογή «merged feature pharmacophore» και με την επιλογή «shared feature pharmacophore».

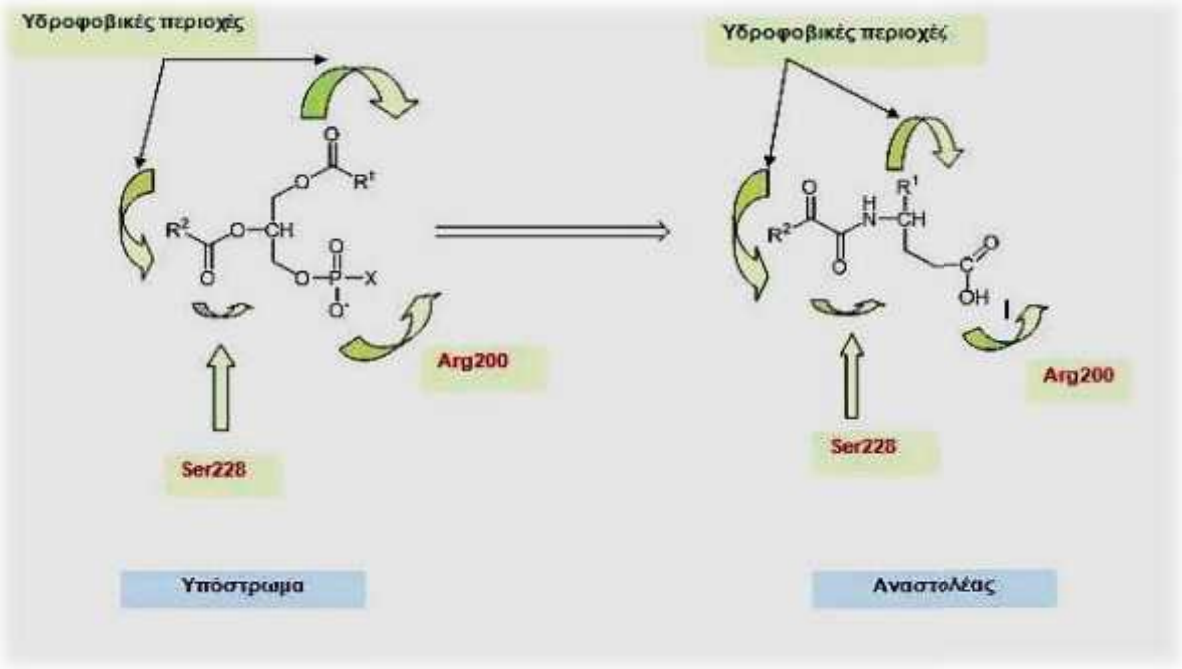
Αποφασίστηκε, στη συνέχεια, να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου αναστολείς που παρουσιάζουν όσο το δυνατό ισχυρότερη βιολογική δράση, δηλαδή αναστολείς με όσο το δυνατό μικρότερη τιμή $X_I(50)$. ΄Εγιναν, λοιπόν, δοκιμές με διάφορους συνδυασμούς ενώσεων. Χαρακτηριστικά, εφαρμόσθηκαν οι ακόλουθοι συνδυασμοί ενώσεων, που ποικίλουν σε αριθμό μορίων, ξεκινώντας από τον ελάχιστο αριθμό δύο (2) που απαιτείται απο τη μεθοδολογία: (*AX074 & AX109*), (*AX074 & AX109 & AX007*), (*AX074 & AX109 & AX007 & GK165 & AX016*) και άμεση αξιολόγηση της κάθε λύσης που προτείνεται μέσω του λογισμικού LigandScout. Και πάλι, η δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου έγινε με βάση την επιλογή «merged feature pharmacophore». Τα αντίστοιχα φαρμακοφόρα μοντέλα που δημιουργήθηκαν με την επιλογή «shared feature pharmacophore» δεν παρείχαν ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Το φαρμακοφόρο μοντέλο που έδωσε τα πιο αξιόπιστα αποτελέσματα στην αξιολόγηση του, δηλαδή στη διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο, θεωρείται αυτό που αναγνωρίζεται ο μεγαλύτερος αριθμός αναστολέων από το σύνολο των ενώσεων εκγύμνασης (training set) και των ενώσεων αξιολόγησης (test set) και δεν αναγνωρίζεται κανένα από τα λεγόμενα παραπλανητικά μόρια.[33] Το φαρμακοφόρο αυτό μοντέλο παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.1 που ακολουθεί:

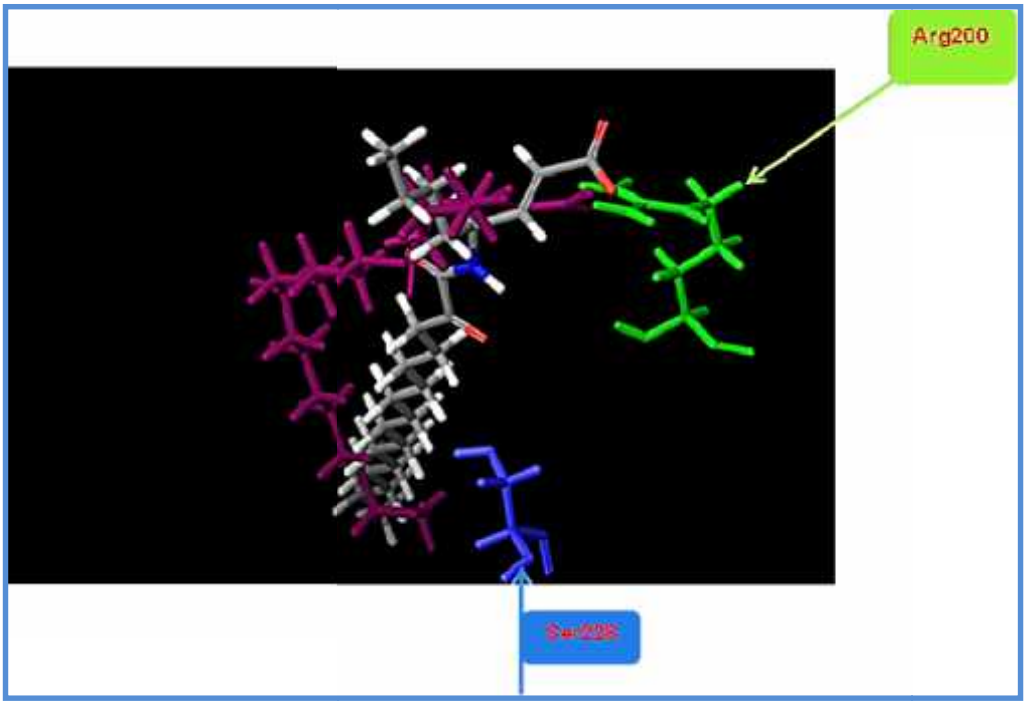


Σχήμα 8.1: Φαρμακοφόρο μοντέλο για την ανθρώπινη κυτοσολική φωσφολιπάση A_2 στο οποίο υπερτίθεται ο αναστολέας AX074, ο οποίος παρουσιάζει την ισχυρότερη βιολογική δράση. Το φαρμακοφόρο μοντέλο αποτελείται από δύο υδροφοβικά χαρακτηριστικά (κίτρινες σφαίρες), από τέσσερις δέκτες δεσμών υδρογόνου (κόκκινες σφαίρες), από ένα δότη δεσμού υδρογόνου (πράσινο βέλος), και μια αρνητικά φορτισμένη περιοχή (κόκκινο "αστέρι"). Οι στερικές παρεμποδίσεις (γκρι σφαίρες) δεν απεικονίζονται προς διευκόλυνση του αναγνώστη.

Το φαρμακοφόρο αυτό μοντέλο συμφωνεί και με το σχεδιασμό των 2-οξοαμιδίων, ο οποίος στηρίχθηκε στο φυσικό υπόστρωμα [69,82]. Στο Σχήμα 8.2 φαίνεται ο τρόπος σχεδίασης των αναστολέων που περιέχουν την οξοαμιδική ομάδα στη δομή τους.

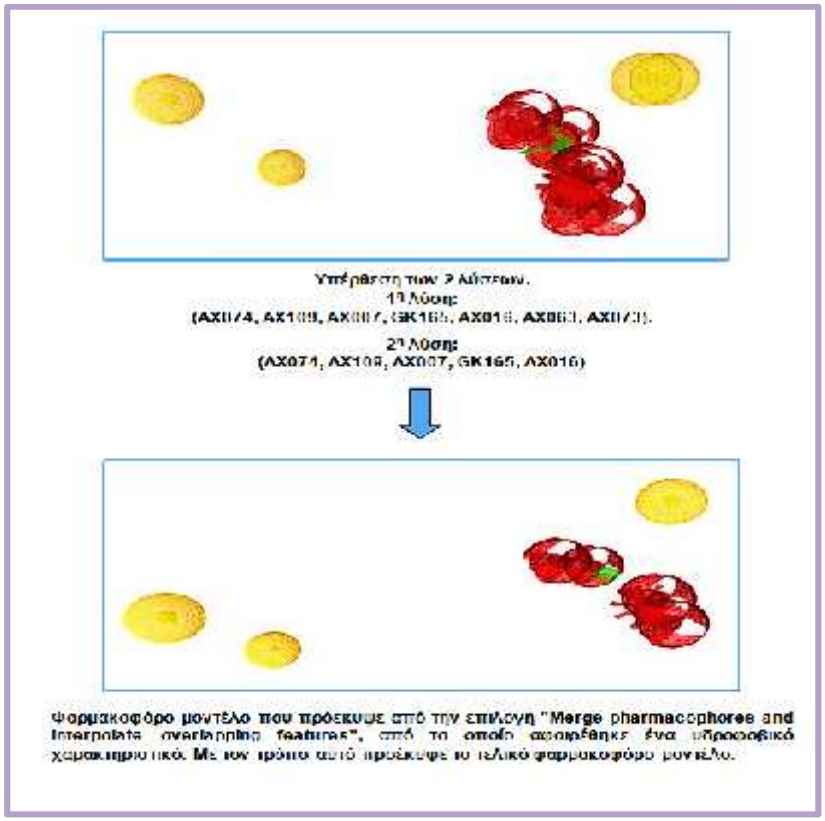


Σχήμα 8.2: Σχεδιασμός των 2-οξοαμιδικών αναστολέων με βάση το φυσικό υπόστρωμα, τα φωσφολιπιδικά υποστρώματα που περιέχουν αραχιδονικό οξύ στην *sn-2* θέση.[69]



Σχήμα 8.3: Υπέρθεση της διαμόρφωσης του αναστολέα AX074 που δίνει τη μεγαλύτερη προσαρμογή στο φαρμακοφόρο μοντέλο (Σχήμα 8.1) με τη διαμόρφωση του ιδίου αναστολέα στο σύμπλεγμα με την cPLA$_2$ που προέκυψε με τη διαδικασία IF (μωβ χρώμα).

Το φαρμακοφόρο αυτό μοντέλο προέκυψε από το συνδυασμό δύο λύσεων με χρήση του λογισμικού LigandScout (Σχήμα 8.4). Αυτές υπερτέθηκαν και με βάση την επιλογή "Merge pharmacophores and interpolate overlapping features" προέκυψε το τελικό φαρμακοφόρο. Παρατηρήθηκε πως ένας συνδυασμός των δύο αυτών λύσεων παρείχε φαρμακοφόρο που λαμβάνεται υπόψη, έστω και σε πολύ μικρό βαθμό, η κινητικότητα που παρουσιάζει η πρωτεΐνη στο περιβάλλον δράσης της, δηλαδή καλύπτει μεγαλύτερο διαμορφωτικό χώρο. Η δημιουργία ενός φαρμακοφόρου μοντέλου, που θα προκύψει μετά την εκτέλεση πειράματος μοριακής δυναμικής (MD) στο σύμπλεγμα του ενζύμου με τον αναστολέα AX074, που προέκυψε από τη διαδικασία του IF, θα ήταν σαφώς μια προσέγγιση που προσομοιώνει περισσότερο το βιολογικό περιβάλλον.[27]



Σχήμα 8.4: Στάδια δημιουργίας του τελικού φαρμακοφόρου. Τα φαρμακοφόρα μοντέλα που δημιουργούνται με ενώσεις εκγύμνασης το (1^{o}): AX074, AX109, AX007, GK165, AX016, AX063, AX073 και το (2^{o}): AX074, AX109, AX007, GK165, AX016 συνδυάζονται και προκύπτει φαρμακοφόρο μοντέλο, από το οποίο αφαιρείται ένα υδροφοβικό χαρακτηριστικό. Με τον τρόπο αυτό, προκύπτει το τελικό φαρμακοφόρο μοντέλο.

Στην αξιολόγηση του τελικού φαρμακοφόρου μοντέλου, όπως προαναφέρθηκε, με τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το

φαρμακοφόρο δεν παρατηρήθηκε η παρουσία παραπλανητικών ενώσεων και η παρουσία των αναστολέων από τα μόρια εκγύμνασης και αξιολόγησης κρίθηκε ικανοποιητική (10/15). Η βαθμολογία προσαρμογής στο φαρμακοφόρο για τους αναστολείς που παρουσιάζουν την ισχυρότερη βιολογική δράση χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο αξιολόγησης των ενώσεων κρούσης (hits) που ενδεχομένως προέκυπταν από το αμέσως επόμενο βήμα της εικονικής σάρωσης μεγάλων βιβλιοθηκών ενώσεων με βάση το φαρμακοφόρο. Η βαθμολογία αυτή παρουσίαζεται στον Πίνακα 8.2:

Πίνακας 8.2: Αναστολείς με την ισχυρότερη βιολογική δράση και η βαθμολογία προσαρμογής τους στο φαρμακοφόρο μοντέλο

΄Ενωση	Βαθμολογία προσαρμογής στο φαρμακοφόρο μοντέλο
AX074	71,71
AX109	69,21
AX007	73,22

8.5 Εικονική σάρωση βιβλιοθηκών ενώσεων

Το επόμενο βήμα είναι αυτό της διαδικασίας εικονικής σάρωσης μεγάλων βιβλιοθηκών ενώσεων με βάση το φαρμακοφόρο, με σκοπό την ανακάλυψη ενώσεων κρούσης (hits), οι οποίες παρουσιάζουν τα τμήματα αλληλεπίδρασης που εμφανίζονται στο φαρμακοφόρο μοντέλο για τη $cPLA_2$. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις βιβλιοθήκες ενώσεων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.3.

Πίνακας 8.3: Βιβλιοθήκες ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο.

Ονομασία βιβλιοθήκης ενώσεων	Σύνολο ενώσεων
ZDD (Zinc Drug Database)	8.198
HitFinder	14.397
NCI	246.354
Τμήμα της PubChem	163

Τα αποτελέσματα της εικονικής σάρωσης της κάθε βιβλιοθήκης ενώσεων συζητούνται παρακάτω:

8.6 Σάρωση βιβλιοθήκης ZDD

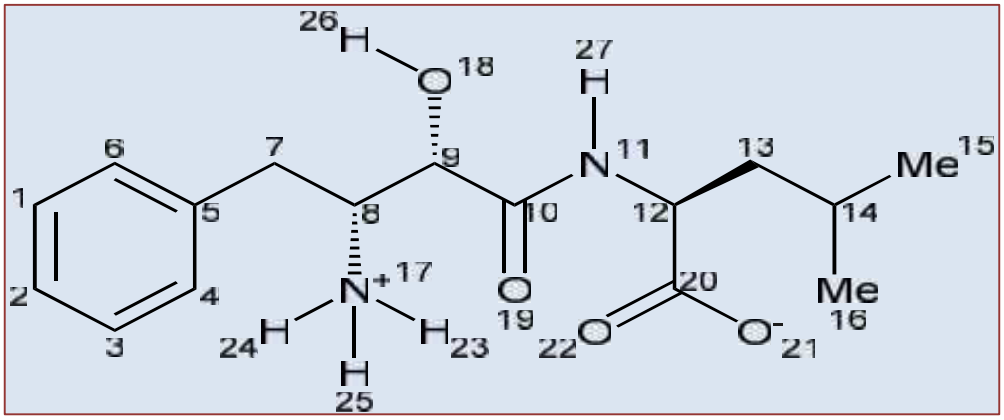
‘Ενας από τους τρόπους έναρξης της προσπάθειας για ανακάλυψη νέων φαρμάκων είναι η τροποποίηση ορισμένων τμημάτων των ήδη υπαρχόντων ώστε να επιτευχθούν καινοτόμες δομές που καταλήγουν σε ενώσεις με βελτιωμένες φαρμακολογικές ιδιότητες [6]. Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε η εικονική σάρωση της συγκεκριμένης βιβλιοθήκης ενώσεων.

Από τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο προέκυψαν έξι ενώσεις κρούσης που παρουσίασαν βαθμολογία προσαρμογής στο φαρμακοφόρο μεγαλύτερη από το (71.71), το οποίο παρουσιάζει ο αναστολέας με την ισχυρότερη βιολογική δράση, ο AX074 (Πίνακας 8.4).

Πίνακας 8.4: Ενώσεις κρούσης που προέκυψαν από τη βιβλιοθήκη ενώσεων ZDD (Zinc).

Ταυτότητα ένωσης στη Zinc	
01542895	01532129
01549362	02033841
01846079	00001625

8.6.1 Αλληλεπιδράσεις 01542895 με το ένζυμο $cPLA_2$



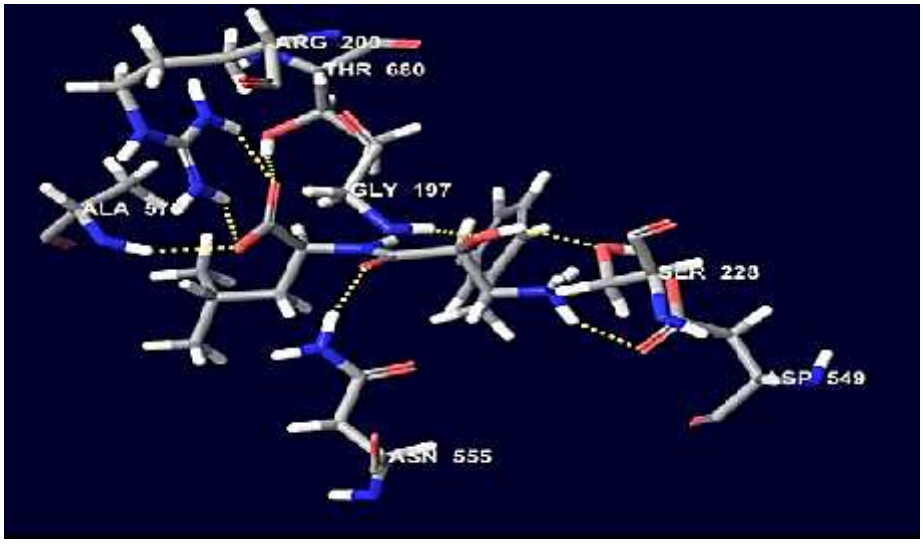
Σχήμα 8.5: Χημική δομή ένωσης που φέρει ταυτότητα στη βάση δεδομένων Zinc τον αριθμό 01542895. Η αρίθμηση έγινε με χρήση του λογισμικού Chemdraw. (Η αρίθμηση έγινε προς διευκόλυνση του αναγνώστη και δεν σχετίζεται με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας της IUPAC)

Με χρήση του αλγόριθμου Glide, βρέθηκε ότι η ένωση δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser577, Ala578 και Glu418 με υψηλότερη βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης (-10,706) και το άτομο υδρογόνου με αρίθμηση 26 να βρίσκεται σε απόσταση 3,80 Å από την υδροξυλομάδα του κρίσιμου αμινοξέος Ser228. Λαμβάνοντας υπόψη το άρθρο [19], και λόγω της ευνοϊκής βαθμολογίας στη μοριακή πρόσδεση, χρησιμοποιήθηκε και ο αλγόριθμος IF για να διαπιστωθεί εάν η ευελιξία και του υποδοχέα θα βοηθούσε στην περαιτέρω ευνοϊκή πρόσδεση.

Τα ενεργειακά αποτελέσματα της διαδικασίας του IF παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.5 και οι αναλυτικότερες αλληλεπιδράσεις στα Σχήματα 8.7-8.8 και Πίνακες 8.6-8.7.

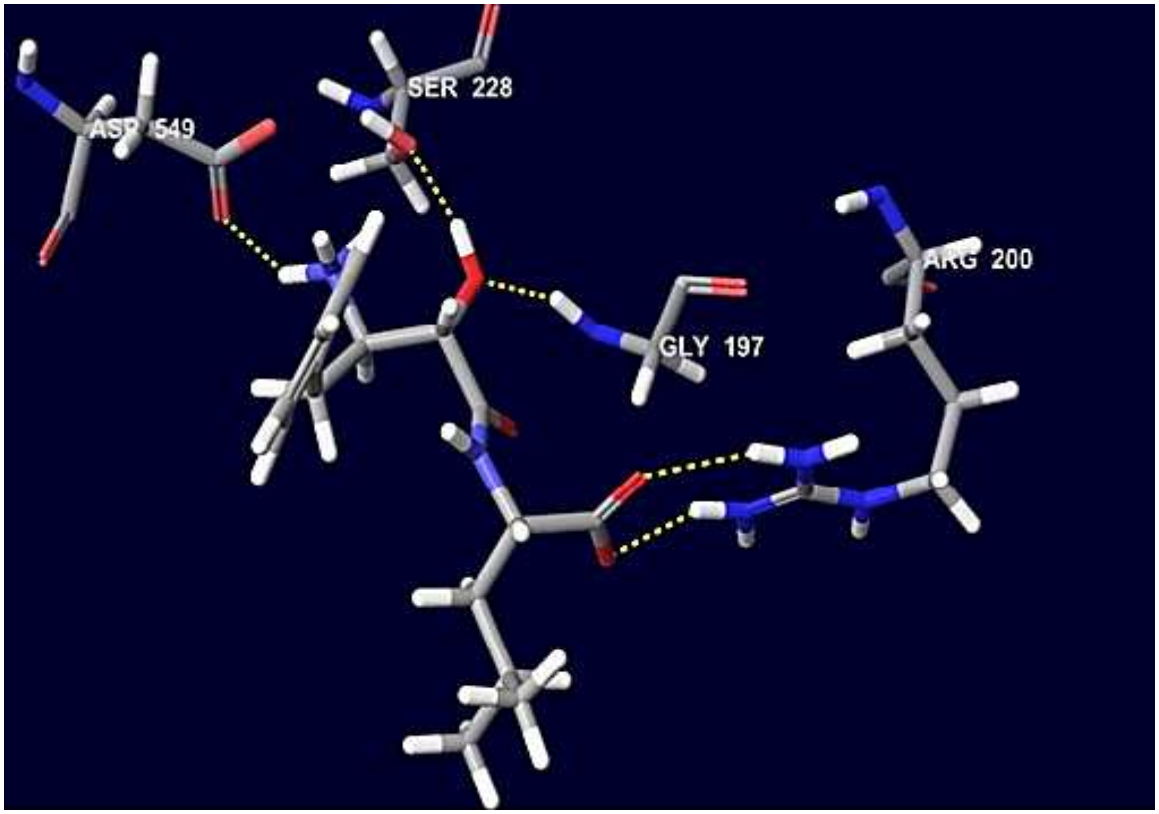
Πίνακας 8.5: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης του μορίου 01542895 στο ένζυμο $cPLA_2$ όπως προέκυψε από τη διαδικασία IF.

Διαδικασία:	**Μόριο: 01542895**	**Υψηλότερη Βαθμολόγηση πρόσδεσης**
Επαγόμενη προσαρμογή	Διαμόρφωση με τη χαμηλότερη ενέργεια: (-704,621 kJ/mol)	-17,137
	Ενέργεια διαμόρφωσης με την υψηλότερη βαθμολόγηση: (-703,562 kJ/mol)	



Σχήμα 8.6: Εικόνα πρόσδεσης του μορίου 01542895 στο ένζυμο cPLA$_2$, όπως προέκυψε από τη διαδικασία IF. Παρουσιάζεται το μόριο και τα αμινοξέα του ενζύμου με τα οποία αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές.

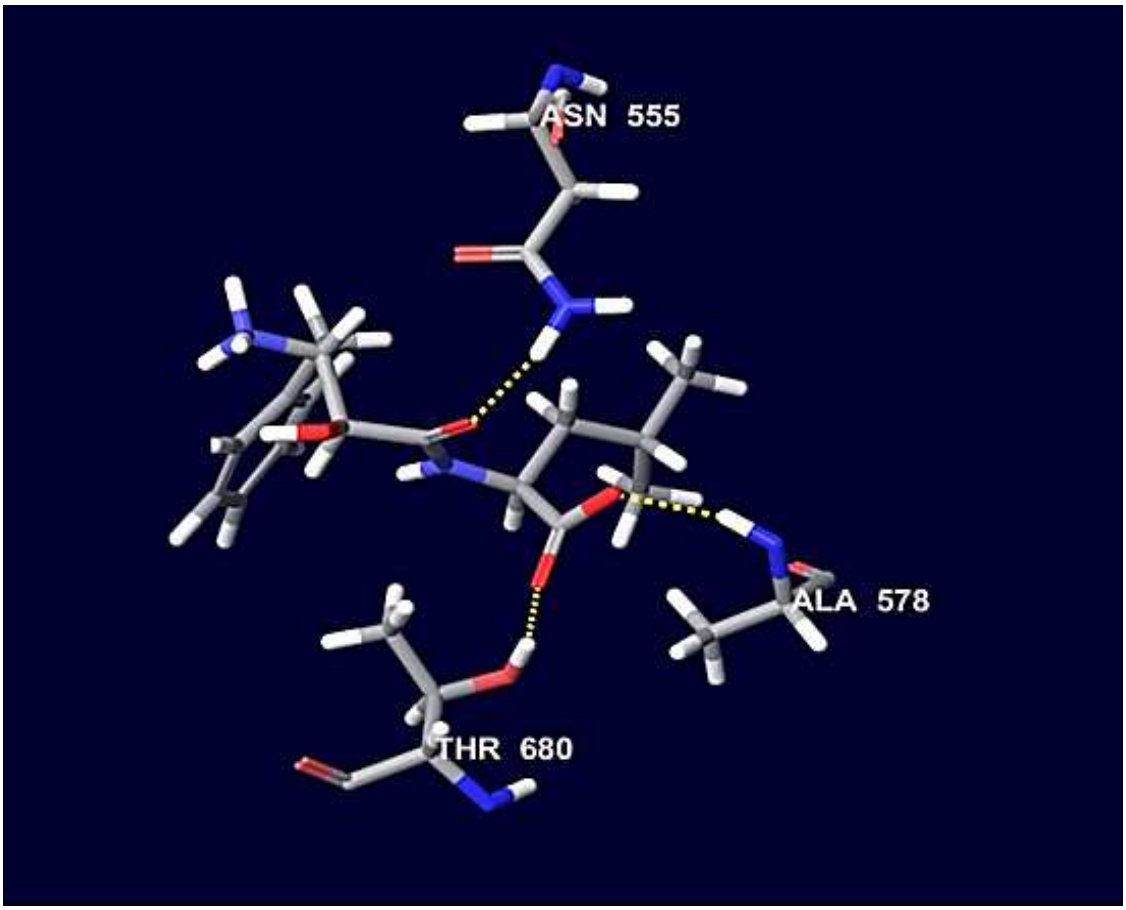
Αναλυτικότερα:



Σχήμα 8.7: Αλληλεπίδραση, μέσω δεσμών υδρογόνου, του μορίου 01542895 με τα αμινοξέα Gly197, Arg200, Ser228, Asp549

Πίνακας 8.6: Αλληλεπιδράσεις που απεικονίζονται στο Σχήμα 8.7. Παρουσιάζονται τα άτομα του μορίου 01542895, αριθμημένα σύμφωνα με το Σχήμα 8.5, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του ενζύμου.

Αλληλεπίδραση: **Άτομο ένωσης–Αμινοξύ ενζύμου**	**Αποστάσεις (Å)**
Άτομο 18 - Gly197: O…HN	1,978
Άτομο 21 - Arg200: O…NH_2^+	1,896
Άτομο 22 - Arg200: O…NH_2	2,178
Άτομο 26 - Ser228: OH…O	2,185
Άτομο 23 ή 24 ή 25 - Asp549: NH_3^+...O	1,896

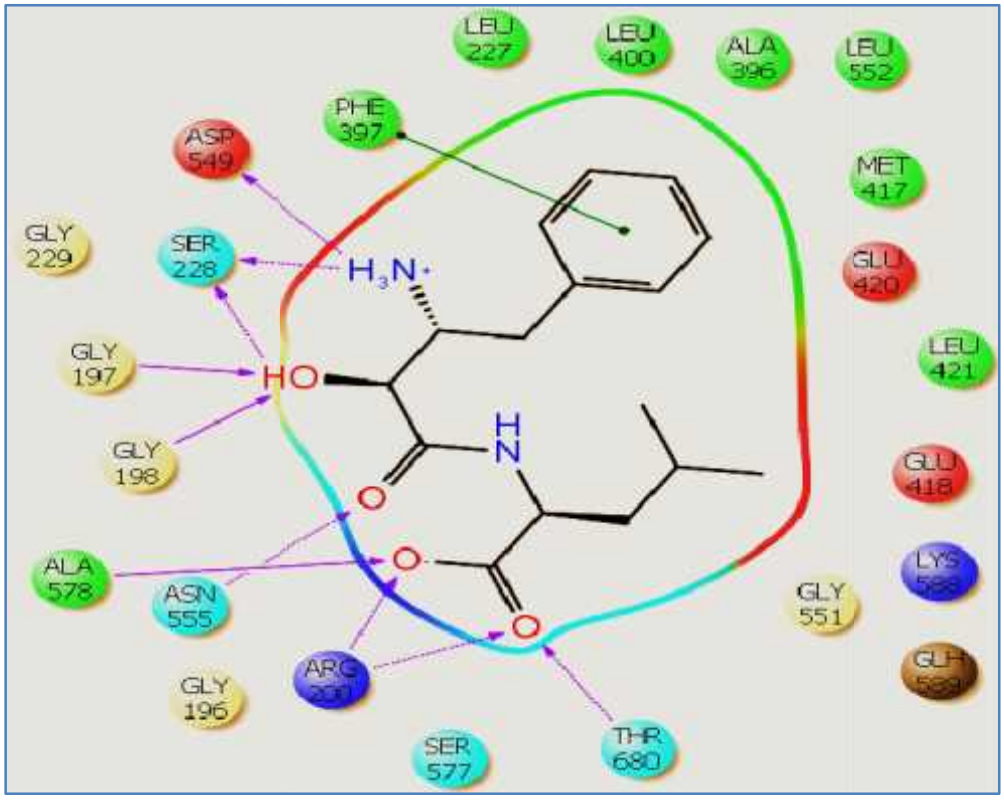


Σχήμα 8.8: Αλληλεπίδραση, μέσω δεσμών υδρογόνου, του μορίου 01542895 με τα αμινοξέα Asn555, Ala578, Thr680

Πίνακας 8.7: Αλληλεπιδράσεις που απεικονίζονται στο Σχήμα 8.8. Παρουσιάζονται τα άτομα του μορίου 01542895, αριθμημένα σύμφωνα με το Σχήμα 8.5, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του ενζύμου.

Αλληλεπίδραση: **Άτομο ένωσης – Αμινοξύ ενζύμου**	**Αποστάσεις (Å)**
Άτομο 21 - Ala578: O…HN	2,093
Άτομο 22 - Thr680: O…HO	1,584
Άτομο 19 - Asn555: O… H_2N	1,875

Στο Σχήμα 8.9 που ακολουθεί παρουσιάζεται σε δισδιάστατη απεικόνιση η πρόσδεση του μορίου 01542895 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου $cPLA_2$.



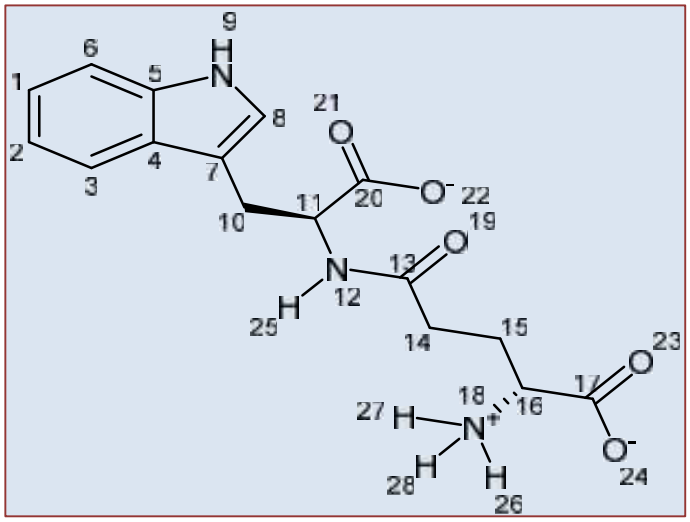
Σχήμα 8.9: Μοριακή πρόσδεση 01542895 στο ενεργό κέντρο της $cPLA_2$. Η εικόνα παρέχει πληροφορίες για την περιοχή τοποθέτησης του μορίου. Κόκκινες σφαίρες: αμινοξέα με αρνητικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, Μπλε σφαίρες: αμινοξέα με θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες, Γαλάζιες σφαίρες: αμινοξέα με πολικές πλευρικές αλυσίδες, Πράσινες σφαίρες: αμινοξέα με υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες. Μωβ βέλη: δεσμοί υδρογόνου με βασικό σκελετό πρωτεΐνης, Μωβ διακεκομμένα βέλη: δεσμοί υδρογόνου με πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων. Περιλαμβάνονται και οι αλληλεπιδράσεις που δεν ικανοποιούν με ακρίβεια τις προυποθέσεις που υπάρχουν για τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου.[69] Ανάμεσα στο βενζολικό δακτύλιο του μορίου και το αμινοξύ Phe397 παρατηρείται π-π στίβαξη. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται μεταξύ τμημάτων του μορίου 01542895 με τα υδρόφοβα τμήματα των αμινοξέων Ala396, Phe397, Leu400, Met417, Leu421, Leu552 και Ala578.

8.6.1.1 Πληροφορίες για το μόριο 01542895

Στη βάση δεδομένων Zinc το μόριο το οποίο φέρει αριθμό 01542895 αναφέρεται ως Bestatin με CAS ταυτότητες 58970-76-6 & 65391-42-6.[83] Στη βάση δεδομένων Drugbank αναφέρεται ως Bestatin με αριθμό ταυτότητας DB03424 και μακρομόρια-στόχοι του οι: υδρολάση Α4 λευκοτριενίων

(Leukotriene A-4 hydrolase) και βακτηριακή αμινοπεπτιδάση της λευκίνης (Bacterial leucyl aminopeptidase).[84]

8.6.2 Αλληλεπιδράσεις 01549362 με το ένζυμο $cPLA_2$



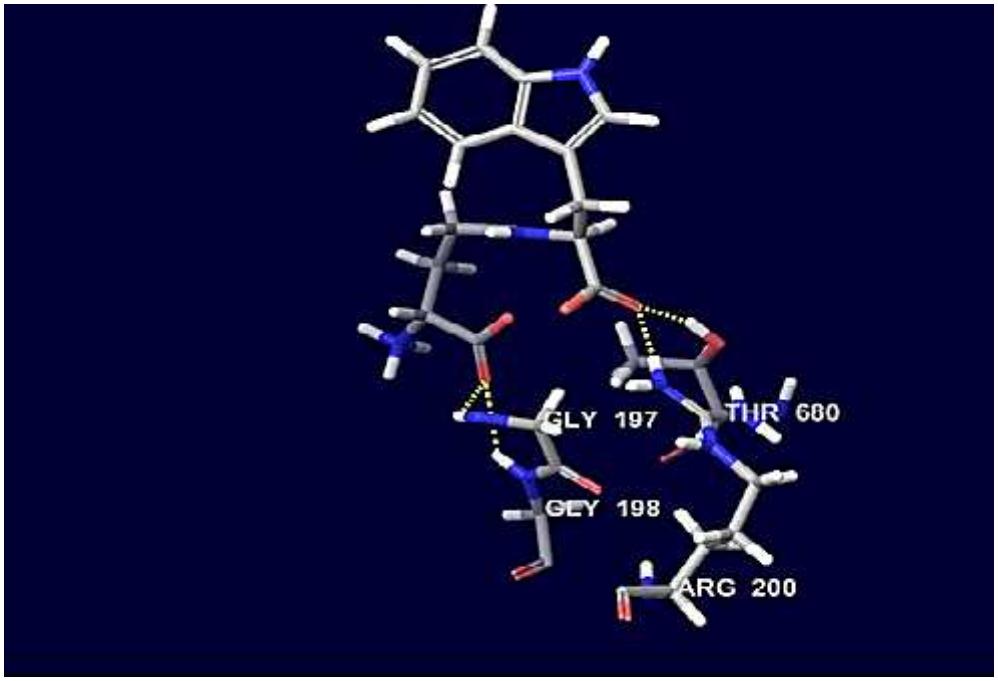
Σχήμα 8.10: Χημική δομή ένωσης που φέρει ταυτότητα στη βάση δεδομένων Zinc τον αριθμό 01549362. Η αρίθμηση έγινε με χρήση του λογισμικού Chemdraw. (Η αρίθμηση έγινε προς διευκόλυνση του αναγνώστη και δεν σχετίζεται με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας της IUPAC)

Με χρήση του αλγόριθμου Glide βρέθηκε ότι η ένωση δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser577, Ala578, Glu418 και Ala396 με υψηλότερο βαθμό πρόσδεσης (-9,082) και το άτομο 21 να βρίσκεται σε απόσταση 3,78 Å από το κρίσιμο αμινοξύ Ser228. Χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος IF για να διαπιστωθεί εάν η ευελιξία και του υποδοχέα θα βοηθούσε στην περαιτέρω ευνοϊκή πρόσδεση.

Τα αποτελέσματα της διαδικασίας του IF παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.8.

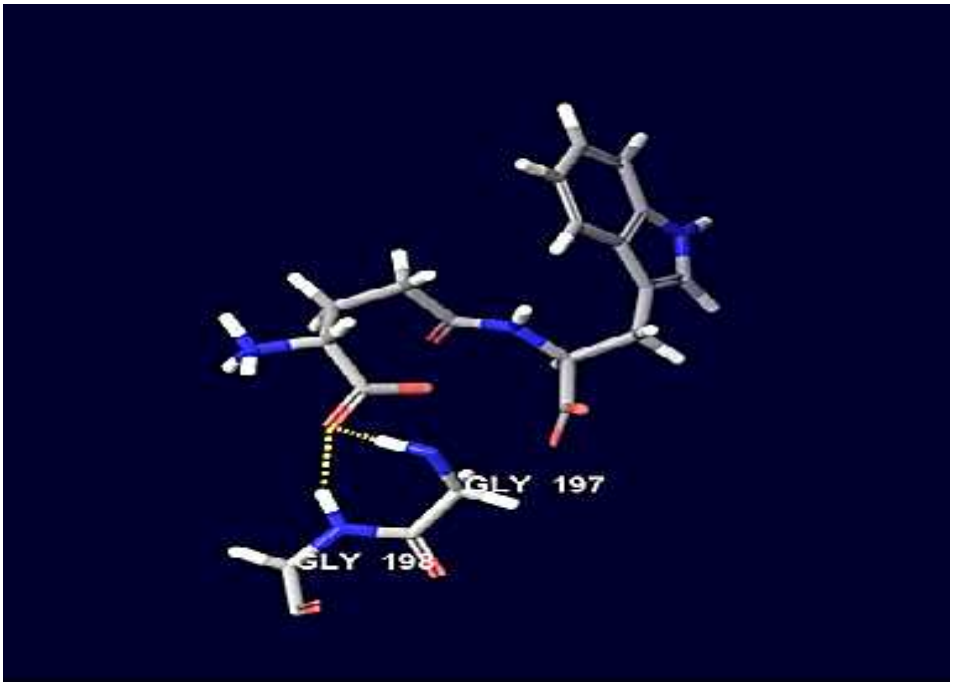
Πίνακας 8.8: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης του μορίου 01549362 στο ένζυμο $cPLA_2$ όπως προέκυψε από τη διαδικασία IF.

Διαδικασία:	**Μόριο: 01549362**	**Υψηλότερη Βαθμολόγηση πρόσδεσης**
Επαγόμενη προσαρμογή	Διαμόρφωση με τη χαμηλότερη ενέργεια: (-1145,913 kJ/mol)	-14,531
	Ενέργεια διαμόρφωσης με την υψηλότερη βαθμολόγηση: (-1140,978 kJ/mol)	



Σχήμα 8.11: Εικόνα πρόσδεσης του μορίου 01549362 στο ένζυμο cPLA$_2$, όπως προέκυψε από τη διαδικασία IF. Παρουσιάζεται το μόριο και τα αμινοξέα του ενζύμου με τα οποία αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές.

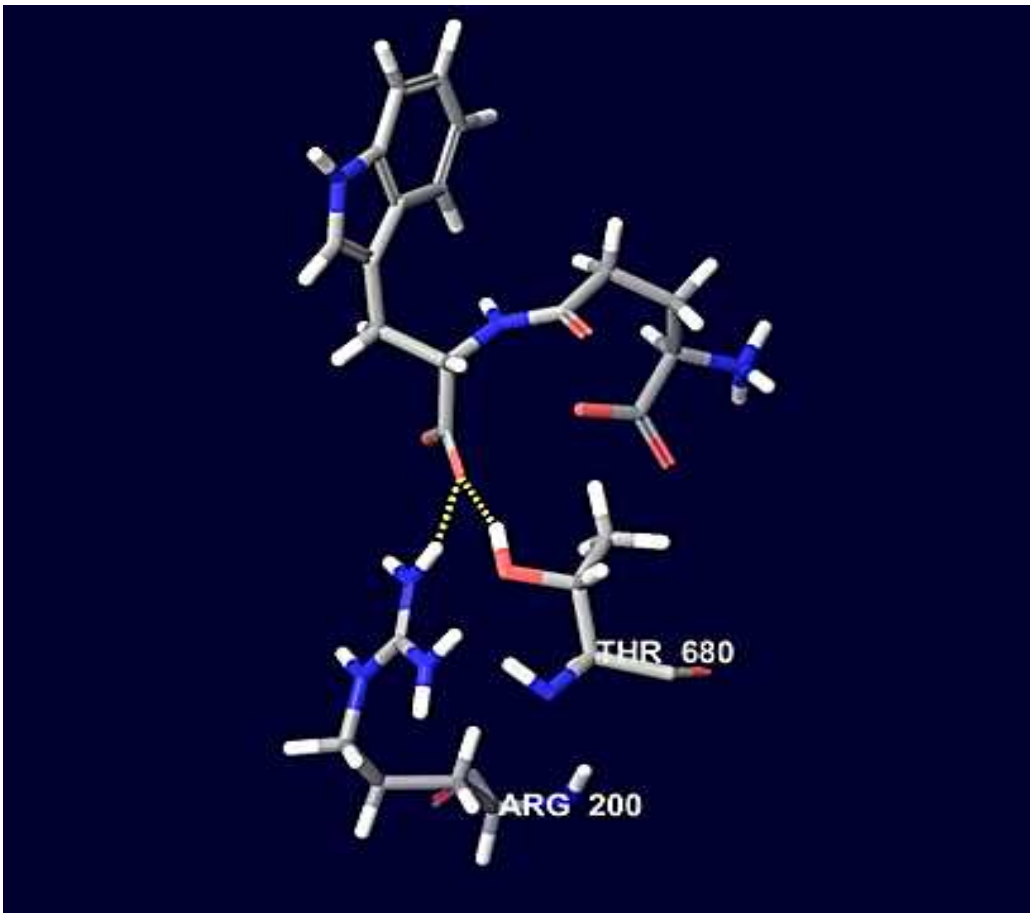
Ακολουθούν τα Σχήματα 8.12 και 8.13 στα οποία παρουσιάζονται αναλυτικότερα οι αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στην ένωση 01549362 και στο ένζυμο cPLA$_2$.



Σχήμα 8.12: Αλληλεπίδραση, μέσω δεσμών υδρογόνου, του μορίου 01549362 με τα αμινοξέα Gly197 και Gly198

Πίνακας 8.9: Αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.12. Παρουσιάζονται τα άτομα του μορίου 01549362, αριθμημένα σύμφωνα με το Σχήμα 8.10, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του ενζύμου.

Αλληλεπίδραση: **Άτομο ένωσης–Αμινοξύ ενζύμου**	**Αποστάσεις (Å)**
Άτομο 23 - Gly197: O…HN	2,178
Άτομο 23 - Gly198: O…HN	2,229

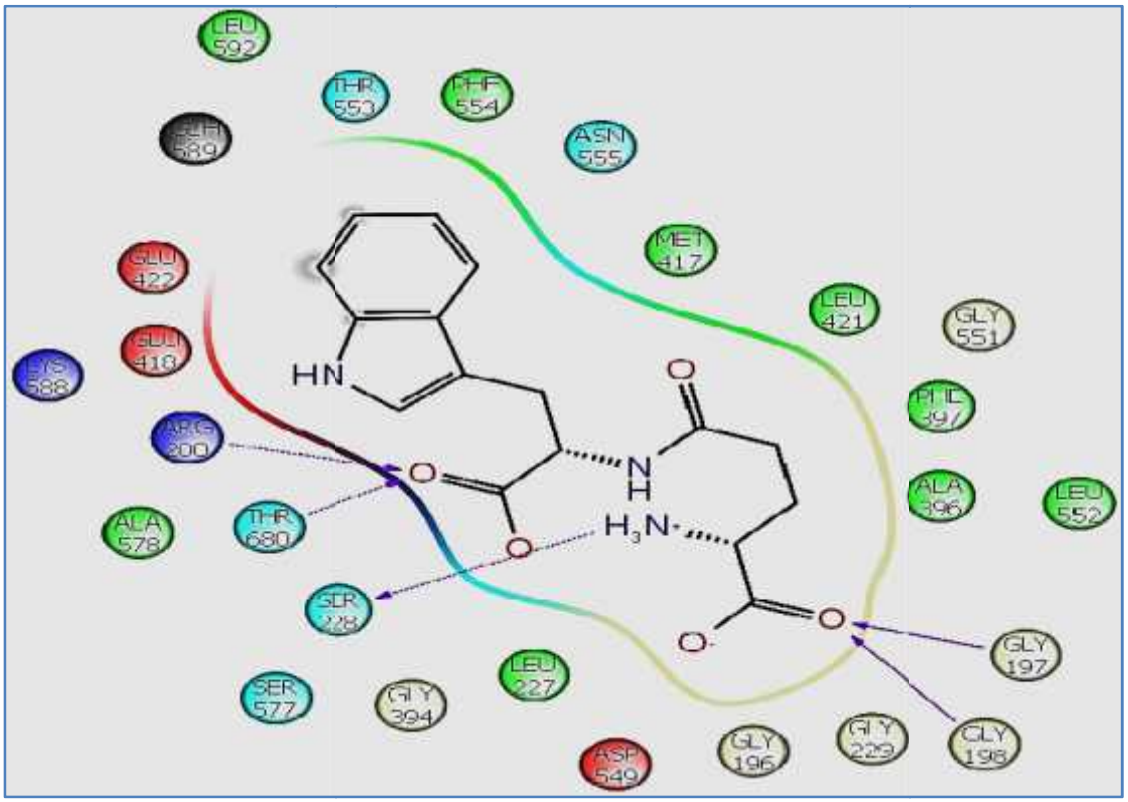


Σχήμα 8.13: Αλληλεπίδραση, μέσω δεσμών υδρογόνου, του μορίου 01549362 με τα αμινοξέα Arg200 και Thr680

Πίνακας 8.10: Αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.13. Παρουσιάζονται τα άτομα του μορίου 01549362, αριθμημένα σύμφωνα με το Σχήμα 8.10, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του ενζύμου.

Αλληλεπίδραση: **Άτομο ένωσης–Αμινοξύ ενζύμου**	**Αποστάσεις (Å)**
Άτομο 21 - Arg200: O…HN	1,823
Άτομο 21 - Thr680: O…HO	1,861

Στο Σχήμα 8.14 που ακολουθεί παρουσιάζεται σε δισδιάστατη απεικόνιση η πρόσδεση του μορίου 01549362 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου $cPLA_2$.

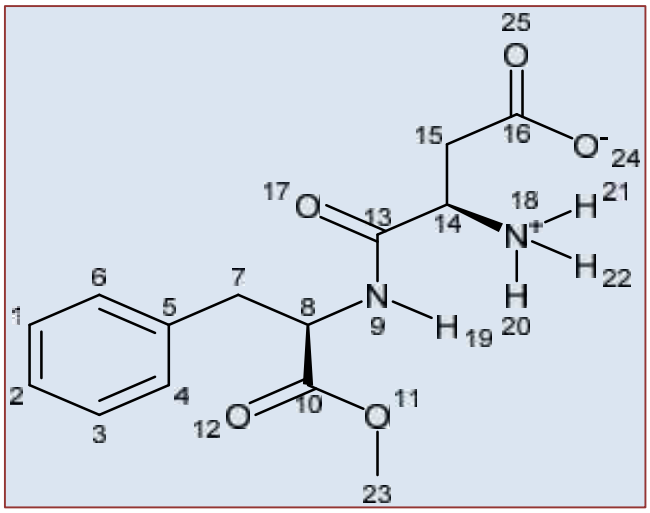


Σχήμα 8.14: Αλληλεπιδράσεις μορίου 01549362 με το ενεργό κέντρο της $cPLA_2$. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται μεταξύ τμημάτων του μορίου 01549362 με τα υδρόφοβα τμήματα των αμινοξέων Ala396, Leu421, Ala578 και Leu592. Οι γκρι κύκλοι που διακρίνονται στο βενζολικό δακτύλιο ισοδυναμούν με έκθεση του μορίου στο διαλύτη (σύμφωνα με την αρίθμηση άτομα: 1, 5, 6).

8.6.2.1 Πληροφορίες για το μόριο 01549362

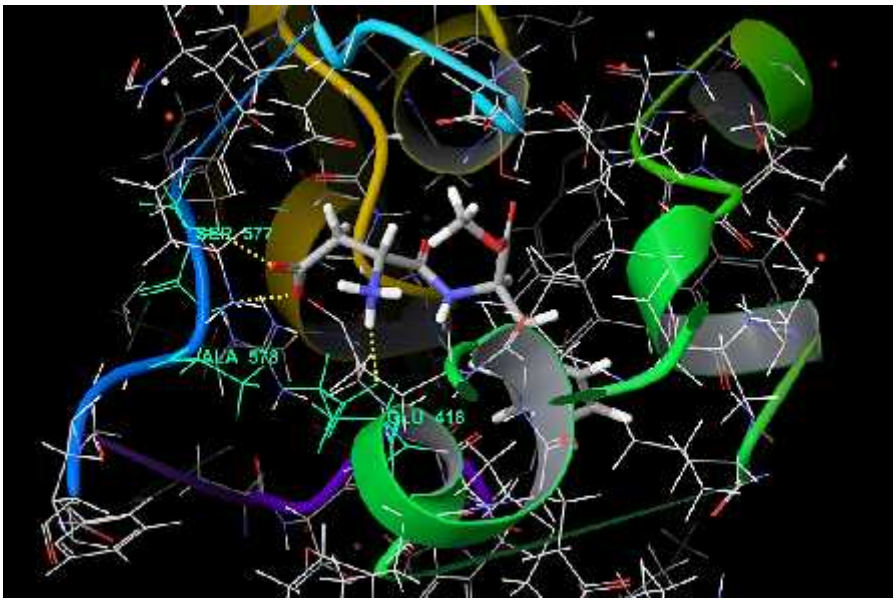
Η βάση δεδομένων Zinc παραπέμπει στη βάση δεδομένων CHEMBL όπου αναφέρεται ως ταυτότητα της ένωσης η 2103812.[83,85] Στη CHEMBL, η ένωση αυτή αναφέρεται ως Golotimod ή SCV-07. Ως Bestim παρουσιάζεται στο διαδικτυακό τόπο http://www.thsci.com/66471-20-3/Golotimod.html. Πληροφορίες μπορούν να αντληθούν και από το διαδικτυακό χώρο [86].

8.6.3 Αλληλεπιδράσεις 01532129 με το ένζυμο $cPLA_2$



Σχήμα 8.15: Χημική δομή ένωσης που φέρει ταυτότητα στη βάση δεδομένων Zinc τον αριθμό 01532129. Η αρίθμηση έγινε με χρήση του λογισμικού Chemdraw. (Η αρίθμηση έγινε προς διευκόλυνση του αναγνώστη και δεν σχετίζεται με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας της IUPAC)

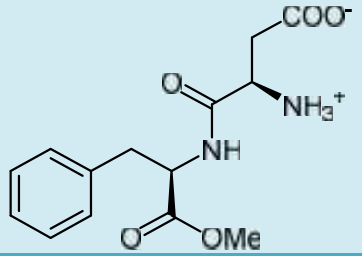
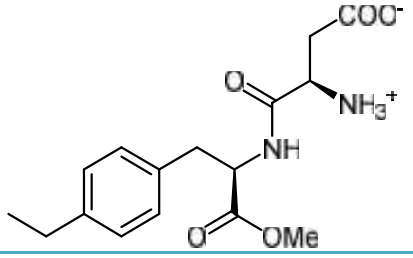
Η ένωση δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser577, Ala578 και Glu418 με υψηλότερη βαθμολόγηση μοριακής πρόσδεσης -7,540 και το άτομο 12 να βρίσκεται σε απόσταση 4,34 Å από το κρίσιμο αμινοξύ Ser228, όπως προκύπτει από υπολογισμό που πραγματοποιήθηκε με χρήση του αλγόριθμου Glide. Παρατηρείται πως δεν παρουσιάζει ικανοποιητική βαθμολογία πρόσδεσης λόγω μικρού αριθμού υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.

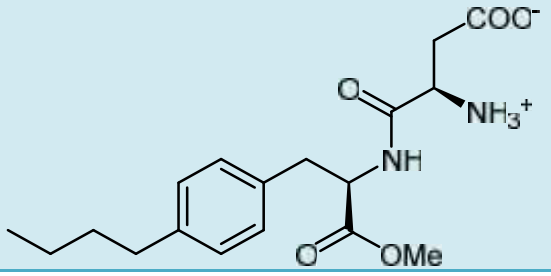
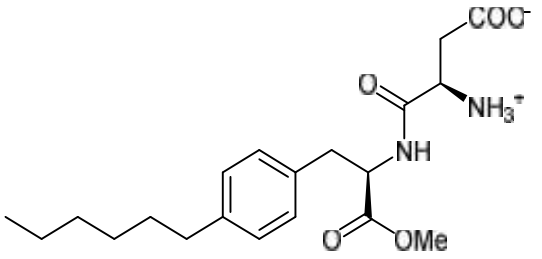
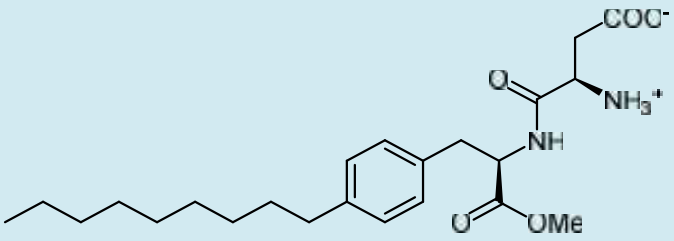


Σχήμα 8.16: Μόριο 01532129 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Διαμόρφωση που προέκυψε με χρήση του αλγόριθμου Glide.

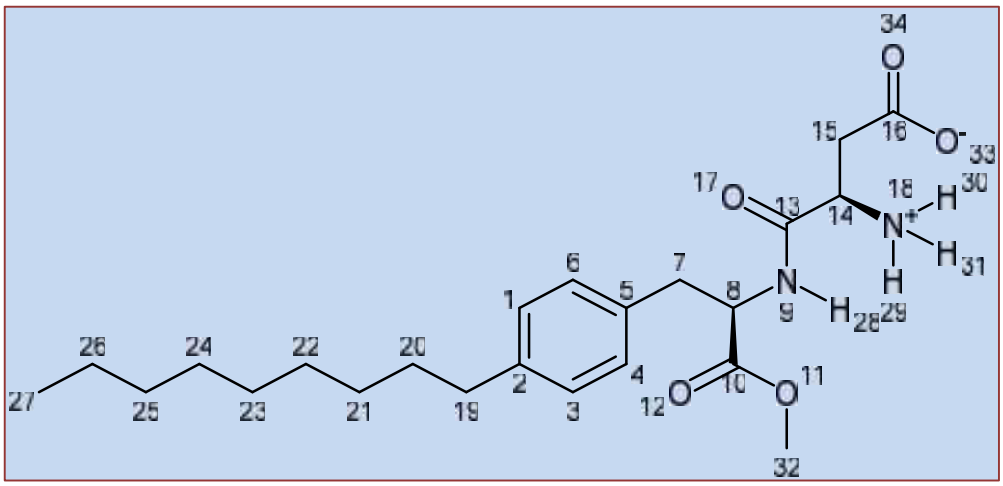
Μελετήθηκε η μοριακή πρόσδεση αναλόγων της ένωσης που προκύπτουν με προσθήκη μεθυλενομάδων (-CH_2), αποσκοπώντας σε ακόμα μεγαλύτερη βαθμολογία πρόσδεσης λόγω αύξησης των ευνοϊκών υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Πίνακας 8.11).

Πίνακας 8.11: Προσθήκη μεθυλενομάδων στο μόριο 01532129–Βαθμολογία πρόσδεσης

A/A	**Χημικός τύπος**	**Υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης**
I		-7,540
II		-9,088

III		-8,911
IV		-12,023
V		-13,677

8.6.3.1 Αλληλεπιδράσεις ένωσης V με το ένζυμο cPLA$_2$

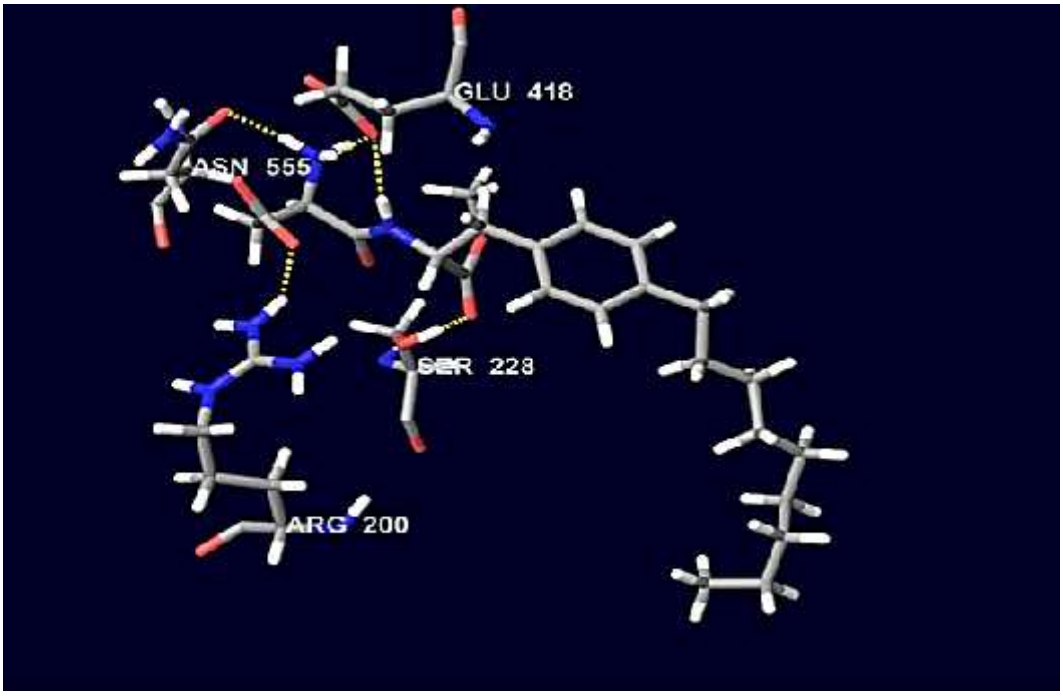


Σχήμα 8.17: Χημική δομή ένωσης V. Η αρίθμηση έγινε με χρήση του λογισμικού Chemdraw. (Η αρίθμηση έγινε προς διευκόλυνση του αναγνώστη και δεν σχετίζεται με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας της IUPAC)

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη χρήση του αλγόριθμου Glide, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.11, κρίθηκε απαραίτητη η μελέτη της μοριακής πρόσδεσης της ένωσης V με τη χρήση της διαδικασίας του IF. Τα αποτελέσματα του υπολογισμού αναλύονται παρακάτω (Πίνακες 8.12-8.14 και Σχήματα 8.18-8.20):

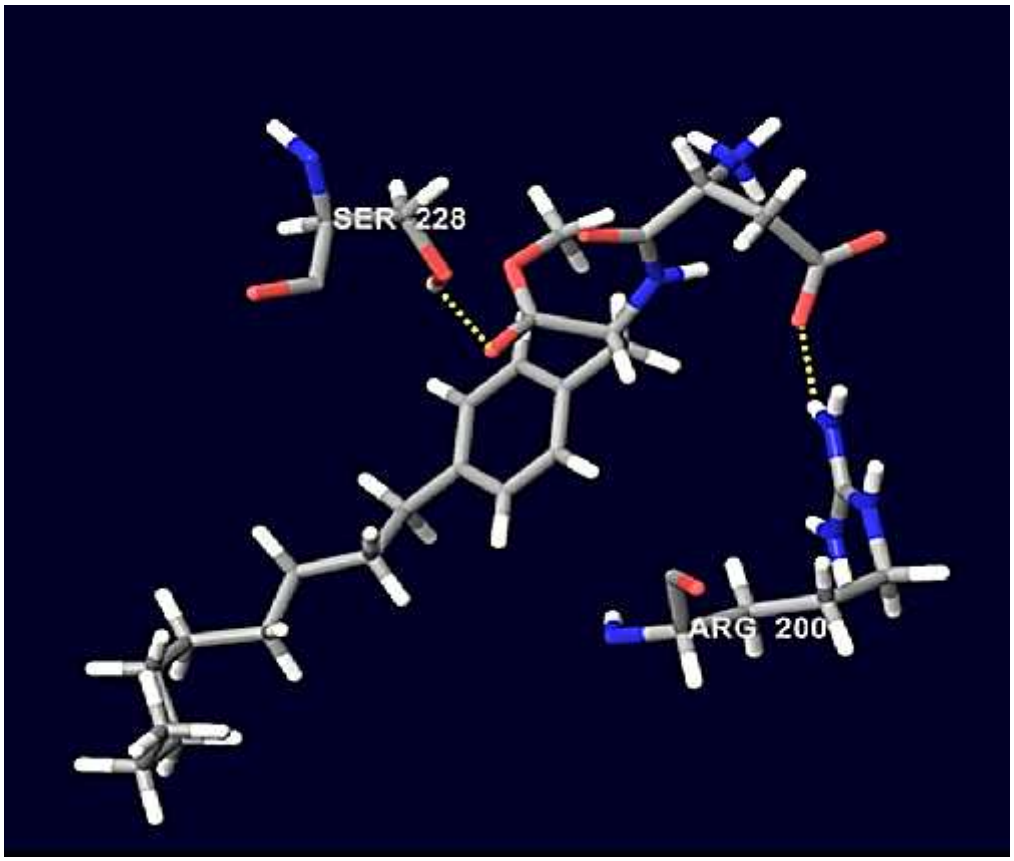
Πίνακας 8.12: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης μορίου V στο ενεργό κέντρο του ενζύμου $cPLA_2$ με τη μέθοδο IF

Διαδικασία:	Μόριο V	Υψηλότερη Βαθμολόγηση πρόσδεσης
Επαγόμενη προσαρμογή	Διαμόρφωση με τη χαμηλότερη ενέργεια: (-880,103 kJ/mol)	-15,873
	Ενέργεια διαμόρφωσης με την υψηλότερη βαθμολόγηση: (-877,256 kJ/mol)	



Σχήμα 8.18: Εικόνα πρόσδεσης του μορίου V στο ένζυμο $cPLA_2$, όπως προέκυψε από τη διαδικασία IF. Παρουσιάζεται το μόριο και τα αμινοξέα του ενζύμου με τα οποία αλληλεπιδρά μέσω δεσμών υδρογόνου.

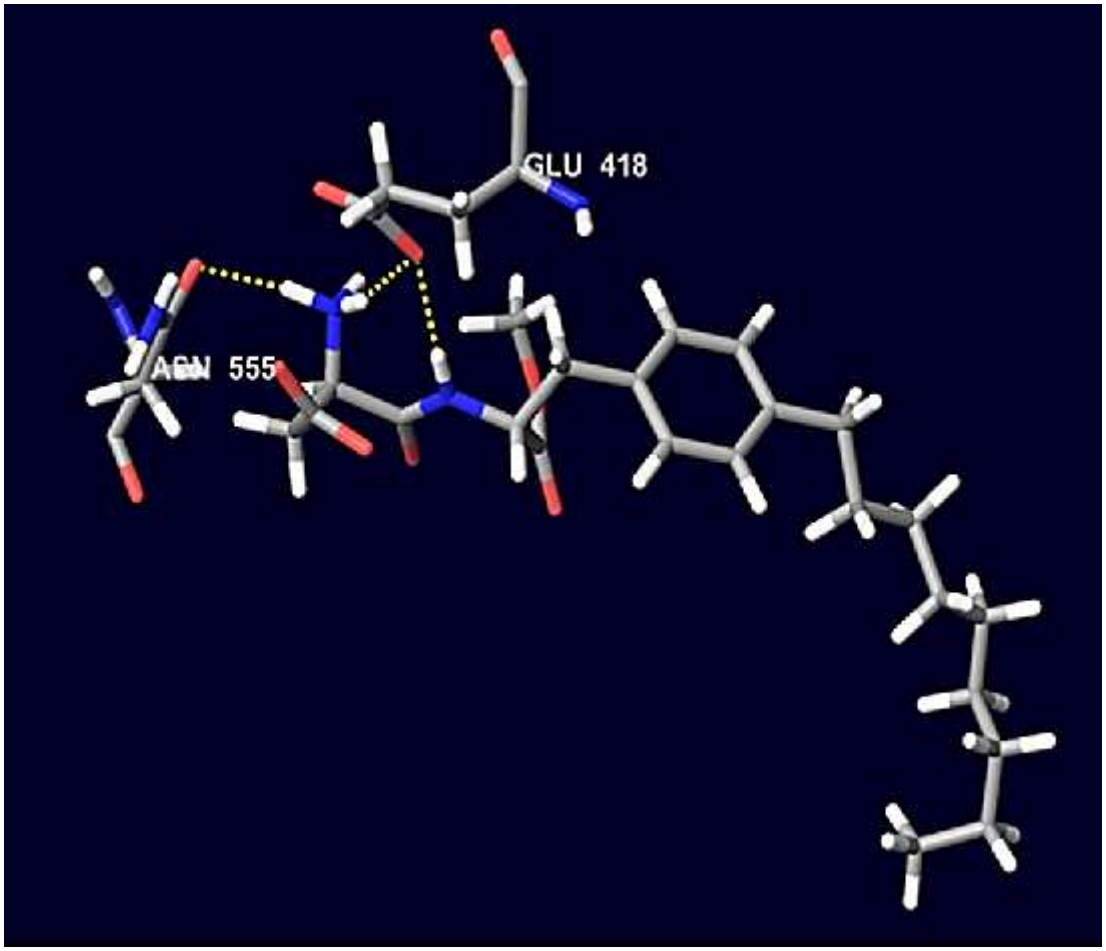
Αναλυτικότερα:



Σχήμα 8.19: Αλληλεπίδραση, μέσω δεσμών υδρογόνου, του μορίου V με τα αμινοξέα Arg200 και Ser228

Πίνακας 8.13: Αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.19. Παρουσιάζονται τα άτομα του μορίου V, αριθμημένα σύμφωνα με το Σχήμα 8.17, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του ενζύμου.

Αλληλεπίδραση	**Αποστάσεις (Å)**
Άτομο 24 - Arg200: O…HN	1,974
Άτομο 12 - Ser228: O…HO	2,291

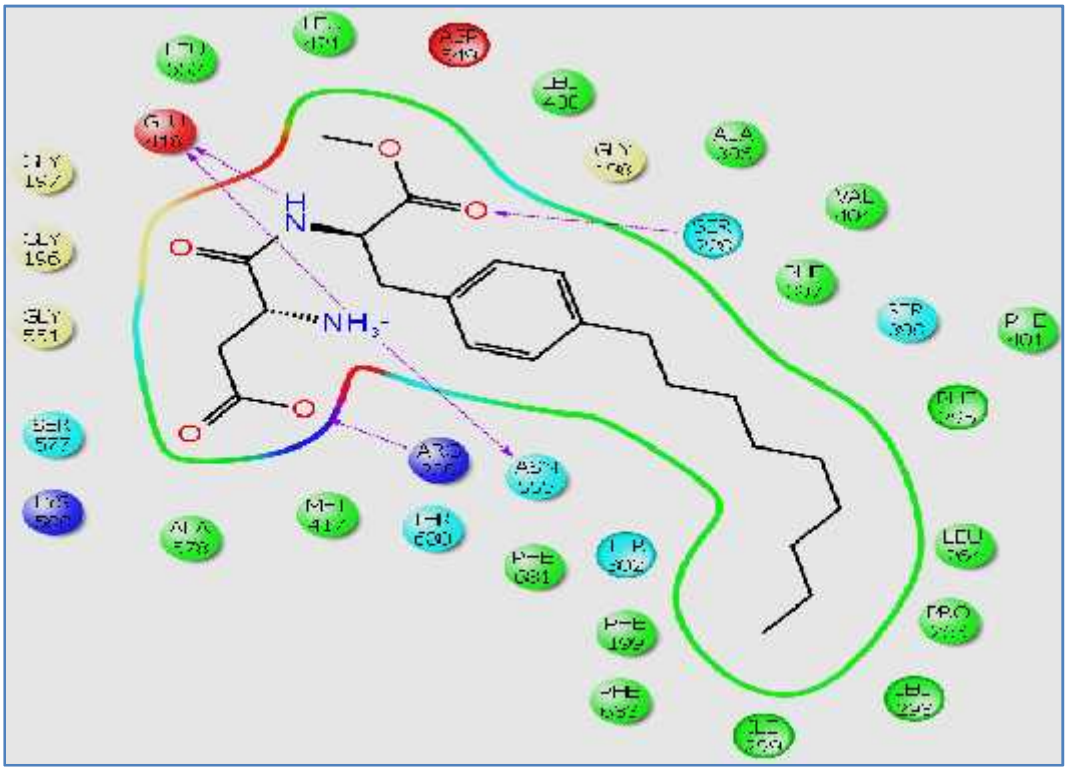


Σχήμα 8.20: Αλληλεπίδραση, μέσω δεσμών υδρογόνου, του μορίου V με τα αμινοξέα Glu418 και Asn555

Πίνακας 8.14: Αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.20. Παρουσιάζονται τα άτομα του μορίου V, αριθμημένα σύμφωνα με το Σχήμα 8.17, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του ενζύμου.

Αλληλεπίδραση	Αποστάσεις (Å)
Άτομο 19 - Glu418: NH…O	2,119
Άτομο 20 ή 21 ή 22 - Glu418: NH…O	1,723
Άτομο 20 ή 21 ή 22 - Asn555: NH… O	2,259

Στο Σχήμα 8.21 που ακολουθεί παρουσιάζεται σε δισδιάστατη απεικόνιση η πρόσδεση του μορίου V στο ενεργό κέντρο του ενζύμου $cPLA_2$.



Σχήμα 8.21: Αλληλεπιδράσεις μορίου V με το ενεργό κέντρο της $cPLA_2$. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται μεταξύ τμημάτων του μορίου με τα υδρόφοβα τμήματα των αμινοξέων Phe199, Pro263, Phe295, Leu298, Ile299, Ala396, Phe397, Leu400, Phe401, Val404, Met417, Leu421 και Phe683.

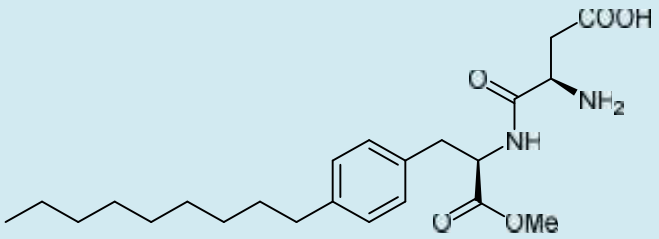
8.6.3.2 Πληροφορίες για την ένωση 01532129

Στη βάση δεδομένων Zinc αναφέρεται ως Aspartame με CAS ταυτότητες 22839-47-0 & 25548-16-7.[83] Στη βάση δεδομένων Drugbank αναφέρεται με αριθμό ταυτότητας DB00168 και μακρομόρια-στόχοι της τα: Πρωτεΐνη TRPA1 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1-induder) και υποδοχέας γεύσης τύπου 1 (Taste receptor type 1 member 2-agonist).[87]

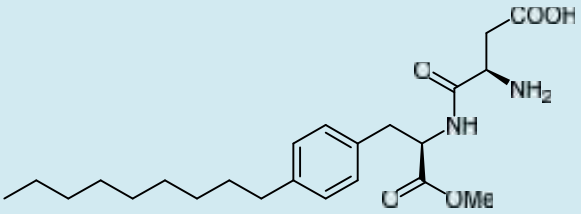
Αποτελεί ενδιαφέρον εύρημα το γεγονός ότι στη βιβλιογραφία η ασπαρτάμη αναφέρεται και ως αντιφλεγμονώδες [88].

Στους Πίνακες 8.15 και 8.16 παρουσιάζονται οι μοριακές ιδιότητες και η πρόβλεψη της πιθανότητας βιοδραστικότητας για την ένωση V (ανάλογο ένωσης για το οποίο δεν έχει πραγματοποιηθεί υπολογισμός ιδιοτήτων), όπως αυτά υπολογίζονται από την εφαρμογή που διατίθεται στο διαδικτυακό χώρο [89].

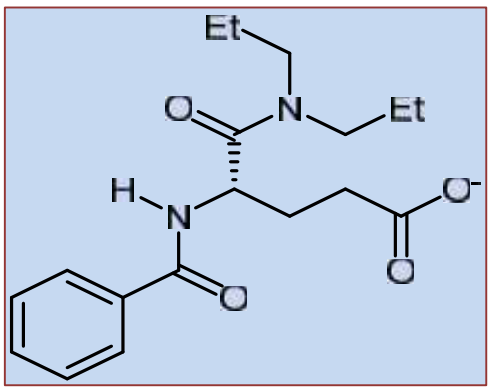
Πίνακας 8.15: Μοριακές ιδιοτήτες της ένωσης V [89]

Χημική δομή	
	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	3,842
TPSA	118,725
natoms	30,0
MW	420,55
nON	7
nOHNH	4
nviolations	0
nrotb	16
Molecular volume	416,483

Πίνακας 8.16: Πιθανότητα βιοδραστικότητας της ένωσης V [89]

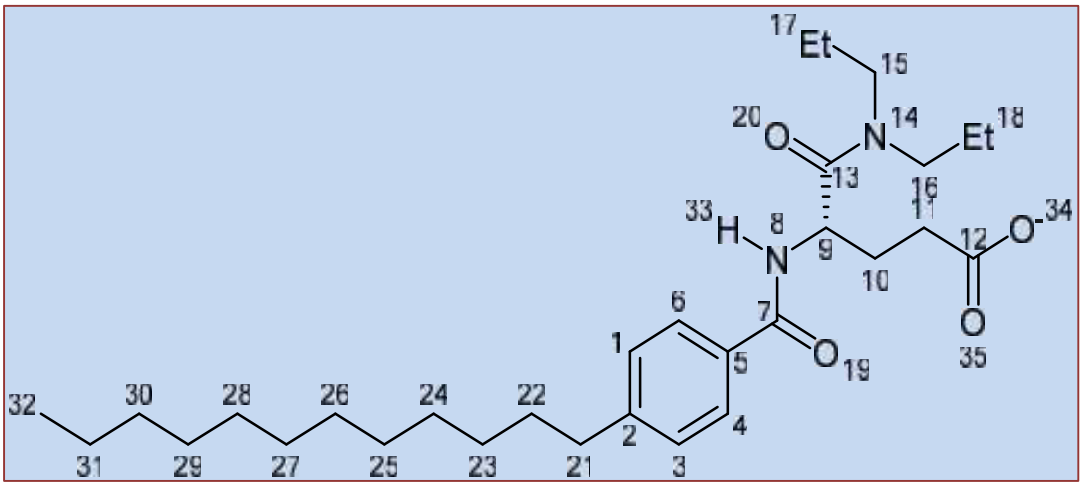
Χημική δομή	
	
Στόχοι φαρμάκων	**Βαθμολόγηση βιοδραστικότητας**
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,42
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	0,21
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,09
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,08
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,65
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,30

8.6.4 Αλληλεπιδράσεις 02033841 με το ένζυμο $cPLA_2$



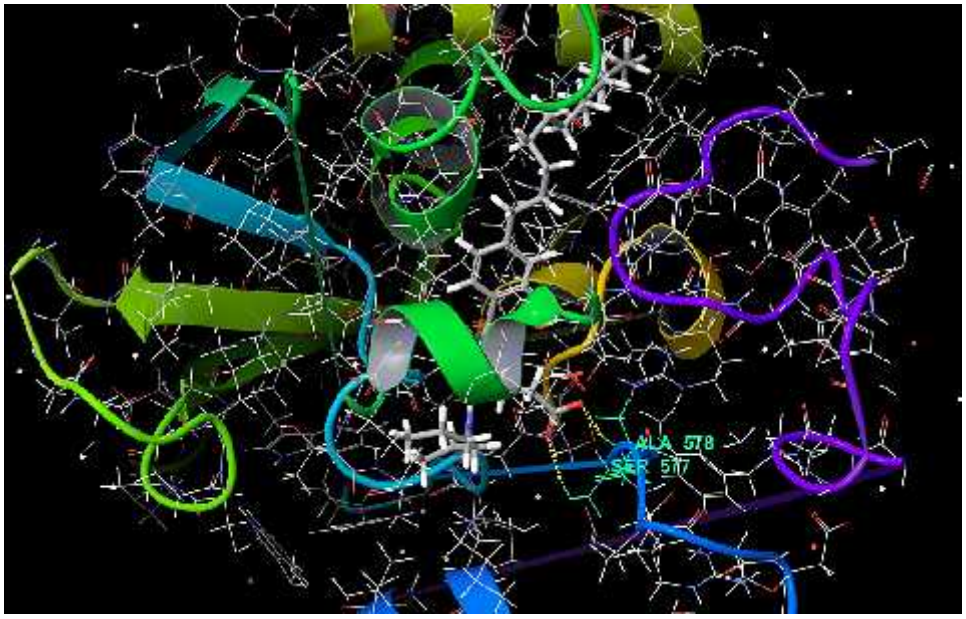
Σχήμα 8.22: Χημική δομή μορίου με ταυτότητα στη βιβλιοθήκη Zinc τον αριθμό 02033841

Η ένωση δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser577 και Ala578 με υψηλότερη βαθμό πρόσδεσης -7,294 όπως προέκυψε με χρήση του αλγόριθμου Glide. Παρατηρείται πως τοποθετείται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου χωρίς να παρουσιάζει ικανοποιητική βαθμολογία πρόσδεσης λόγω μικρού αριθμού υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.



Σχήμα 8.23: Χημική δομή μορίου 02033841[a]. Η αρίθμηση έγινε με χρήση του λογισμικού Chemdraw. (Η αρίθμηση έγινε προς διευκόλυνση του αναγνώστη και δεν σχετίζεται με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας της IUPAC)

Πραγματοποιείται δεύτερος υπολογισμός, με χρήση του ιδίου αλγόριθμου, με προσθήκη στη δομή του μορίου 12 μεθυλενομάδων (-CH_2-) με στόχο να διαπιστωθεί αν υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός ευνοϊκών υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και η ένωση που προκύπτει καλείται 02033841[a] (Σχήμα 8.23). Η υψηλότερη βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης που παρουσιάζει η τελευταία είναι -13,643 και δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser577 και Ala578 (άτομα 34 και 35). Το άτομο 19 βρίσκεται σε απόσταση 4,21 Å απο το υδροξύλιο της Ser228.

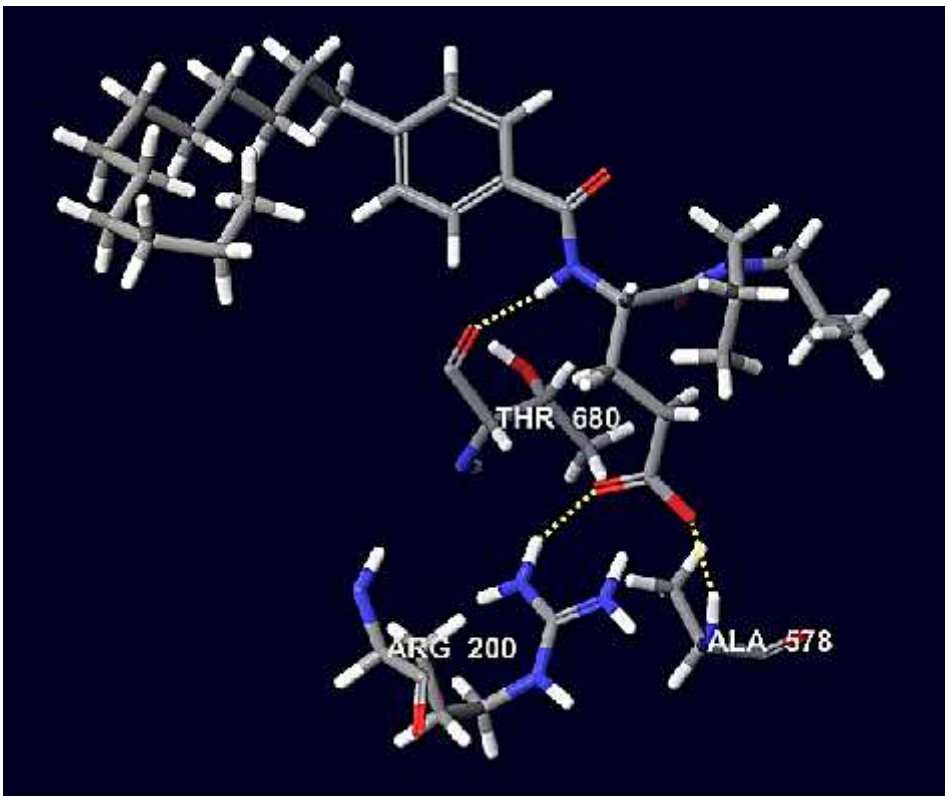


Σχήμα 8.24: Μόριο 02033841[a] στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Διαμόρφωση που προέκυψε με χρήση του αλγόριθμου Glide.

Εξαιτίας της ευνοϊκής βαθμολογίας πρόσδεσης πραγματοποιείται υπολογισμός με τη διαδικασία του IF. Στον Πίνακα 8.17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του υπολογισμού IF:

Πίνακας 8.17: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης IF του μορίου 02033841[a]

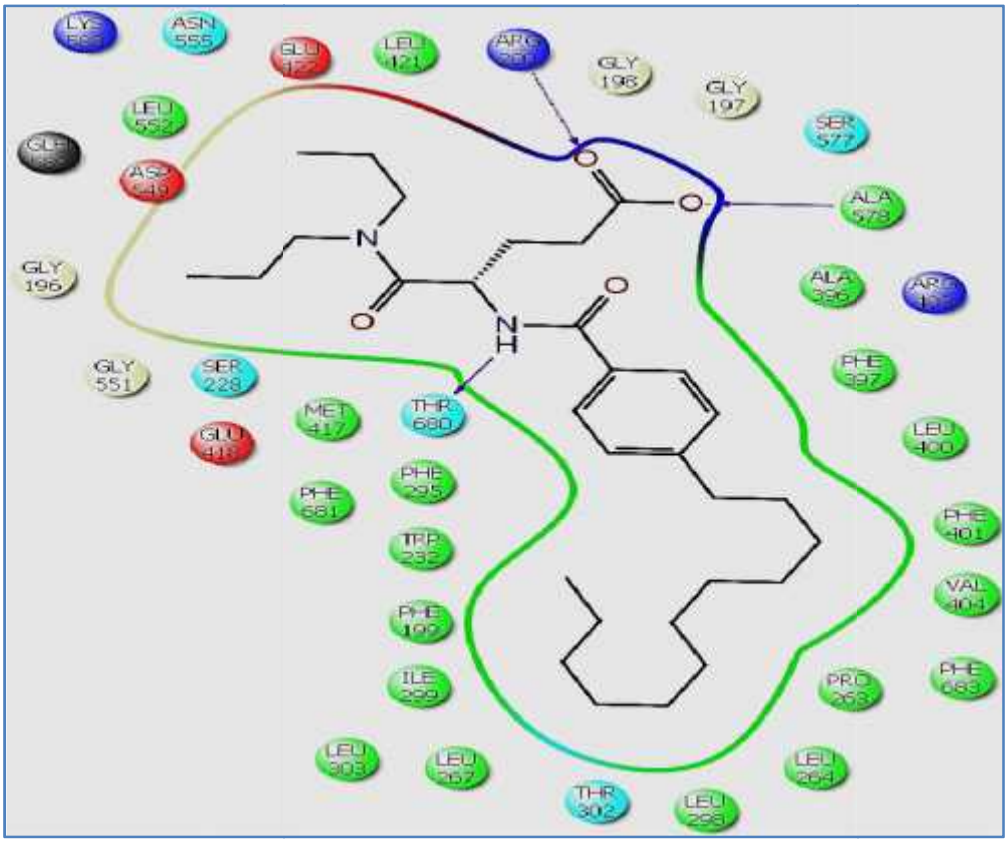
Διαδικασία:	**Μόριο: 02033841[a]**	**Υψηλότερη Βαθμολόγηση πρόσδεσης**
Μοριακή πρόσδεση IF	Διαμόρφωση με τη χαμηλότερη ενέργεια: (-395,793 kJ/mol)	-16,823
	Ενέργεια διαμόρφωσης με την υψηλότερη βαθμολόγηση: (- 394,948 kJ/mol)	



Σχήμα 8.25: Μοριακή πρόσδεση του μορίου 02033841[a] στο ενεργό κέντρο της $cPLA_2$. Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούντα μέσω δεσμών υδρογόνου είναι αυτές με τα αμινοξέα Arg200, Ala578, και Thr680 του ενζύμου.

Πίνακας 8.18: Αλληλεπιδράσεις που παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.25. Παρουσιάζονται τα άτομα του μορίου 02033841[a], αριθμημένα σύμφωνα με το Σχήμα 8.23, που συμμετέχουν στους δεσμούς υδρογόνου με αμινοξέα του ενζύμου.

Αλληλεπίδραση	Αποστάσεις (Å)
Άτομο 35 - Arg200: O…HN	1,846
Άτομο 34 - Ala578: O…HN	1,992
Άτομο 33 - Thr680: NH… O	2,069



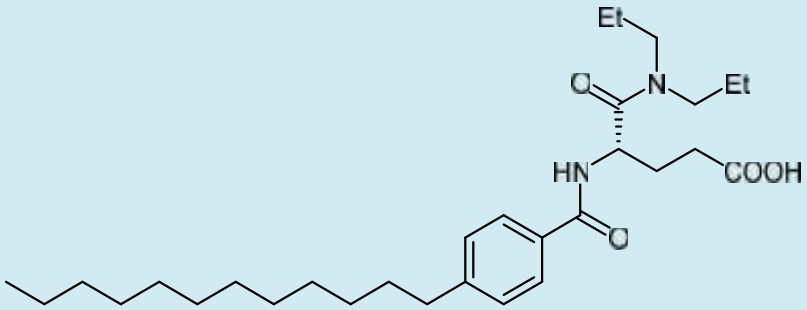
Σχήμα 8.26: Αλληλεπιδράσεις του μορίου 02033841[a] με το ενεργό κέντρο της $cPLA_2$. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις του μορίου παρατηρούνται με τα υδροφοβικά τμήματα των αμινοξέων Phe199, Trp232, Pro263, Leu264, Phe295, Leu298, IIE299, Leu303, Ala396, Phe397, Leu400, Pe401, Val404, Met417, Leu421, Leu552, Phe681 και Phe 683.

8.6.4.1 Πληροφορίες για την ένωση 02033841

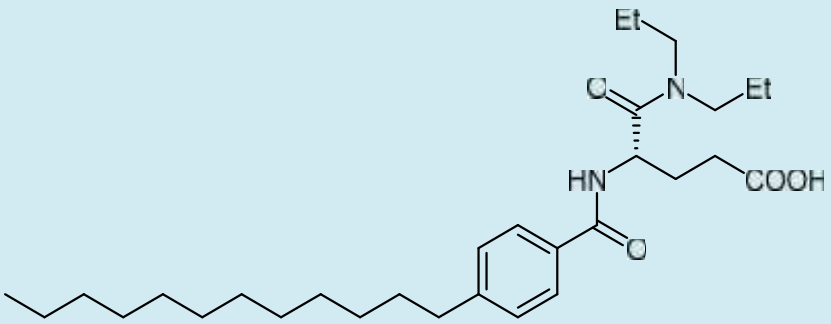
Στη βάση δεδομένων Zinc αναφέρεται ως Proglumide με CAS ταυτότητες 6620-60-6, 99247-33-3. Στο διαδικτυακό χώρο [90] αναφέρονται ως μακρομόρια-στόχοι του τα: υποδοχέας της χοληκυστοκινίνης-1 (Cholecystokinin-1 Receptor), υποδοχέας χοληκυστοκινίνης-2 (Cholecystokinin-2 Receptor) και Ισταμίνης H2 υποδοχέας (Histamine H2 receptor). Ενδιαφέρον προκαλεί άρθρο στη βιβλιογραφία που αναφέρεται στα θετικά αποτελέσματα της χορήγησης συνδυασμού ανταγωνιστών του υποδοχέα χολοκυστοκινίνης και αναστολέων της κυκλοοξυγονάσης [91]. Επίσης, στη βιβλιογραφία υπάρχουν άρθρα που τονίζουν τη σπουδαιότητα του ρόλου της ένωσης στην διαχείριση του πόνου.[92,93] Στους Πίνακες 8.19 και 8.20 δίνονται οι μοριακές ιδιότητες και η πιθανότητα βιοδραστικότητας της

ένωσης 02033841[a] (ανάλογο ένωσης για το οποίο δεν έχει πραγματοποιηθεί υπολογισμός ιδιοτήτων).

Πίνακας 8.19: Μοριακές ιδιότητες της ένωσης 02033841[a] [89]

Χημική δομή	
	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	7,919
TPSA	86,706
natoms	36,0
MW	502,74
nON	6
nOHNH	2
nviolations	2
nrotb	21
Molecular volume	526,339

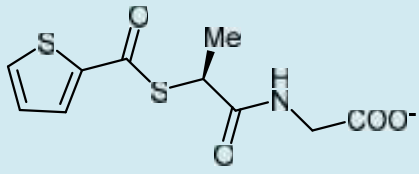
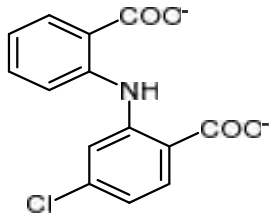
Πίνακας 8.20: Πιθανότητα βιοδραστικότητας της ένωση 02033841[a] [89]

Χημική δομή	
	
Στόχοι φαρμάκων	Βαθμολόγηση βιοδραστικότητας
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,31
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	0,04
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,07
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,07
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,39
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,16

8.6.5 Ενώσεις 01846079 και 00001625

Οσο αφορά τις ενώσεις 01846079 και 00001625 της βιβλιοθήκης ενώσεων Zinc, τα αποτελέσματα που παρουσίασαν με τη χρήση του λογαρίθμου Glide XP δεν κρίνονται ενθαρρυντικά για περαιτέρω μελέτη. Πληροφορίες παρέχονται για αυτές τις δύο ενώσεις στον Πίνακα 8.21:

Πίνακας 8.21: Zinc 01846079 και 00001625

Χημική δομή	Υψηλότερη Βαθμολόγηση Πρόσδεσης
 01846079	-6,665
 00001625	-6,116

8.7 Ενώσεις από τη βιβλιοθήκη ενώσεων PubChem

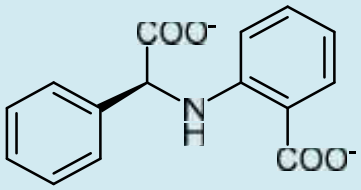
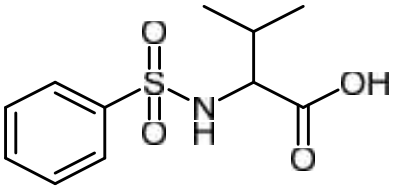
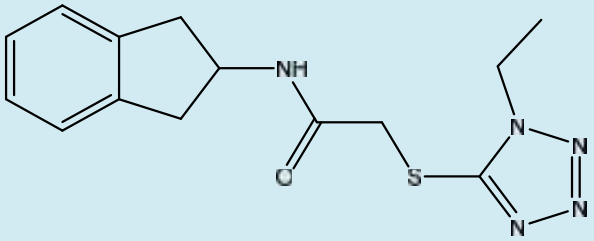
Η μοναδική ένωση που προκύπτει δυνάμει προσδέτης της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης από τη βιβλιοθήκη ενώσεων Pubchem είναι αυτή που φέρει αριθμό ταυτότητας 72172. Πρόκειται για την ένωση με αριθμό ταυτότητας στη βιβλιοθήκη ενώσεων Zinc 01542895, που περιγράφηκε στο τμήμα 8.6.1.

8.8 Βιβλιοθήκη ενώσεων Hitfinder

Από τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο προέκυψαν τρείς ενώσεις κρούσης που παρουσιάζουν βαθμολογία προσαρμογής στο φαρμακοφόρο μεγαλύτερη από (71,71), βαθμολογία που παρουσιάζει ο αναστολέας με την ισχυρότερη βιολογική δράση AX074 (Πίνακας 8.22).

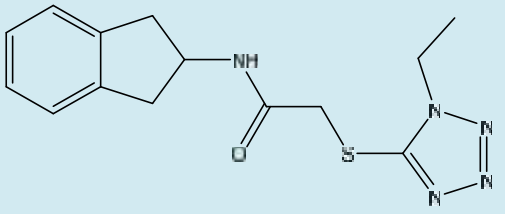
Στη συνέχεια, με τη χρήση του λογαρίθμου Glide έγινε έλεγχος της μοριακής πρόσδεσης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ίδιο πίνακα.

Πίνακας 8.22: Αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης ενώσεων κρούσης από τη βιβλιοθήκη Hitfinder με χρήση του αλγόριθμου Glide

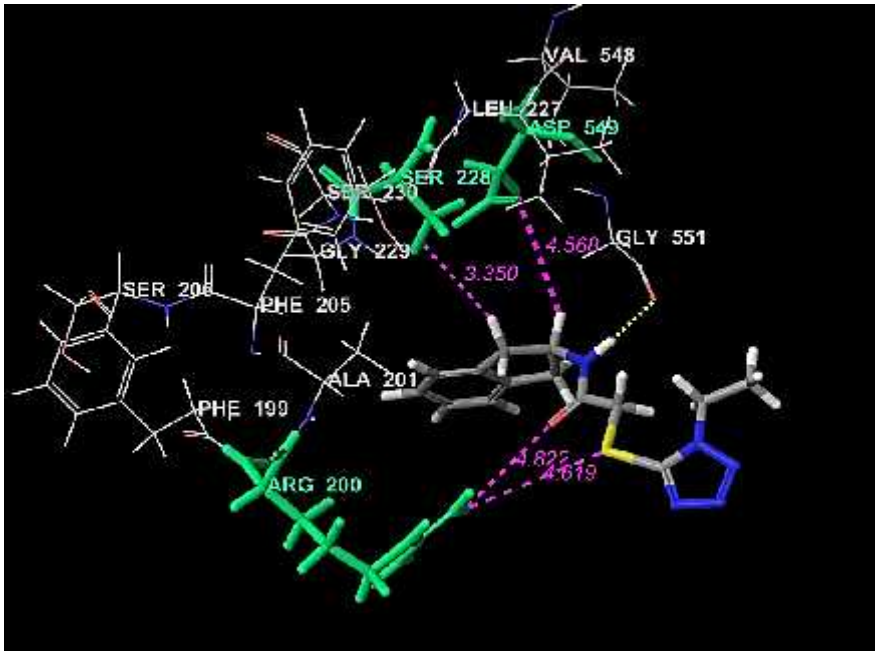
Χημική δομή	Υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης
 013763	-5,245
 003684	-6,735
 006714	-6,560

Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η βαθμολογία μοριακής πρόσδεσης για την ένωση 006714 είναι αποτέλεσμα κυρίως υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και όχι παρουσίας δεσμών υδρογόνου. Πραγματοποιήθηκε υπολογισμός μοριακής πρόσδεσης με το πρωτόκολλο IF και τα αποτελέσματα του υπολογισμού αυτού παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.23:

Πίνακας 8.23: Μοριακή πρόσδεση της ένωσης 006714 με βάση το πρωτόκολλο IF

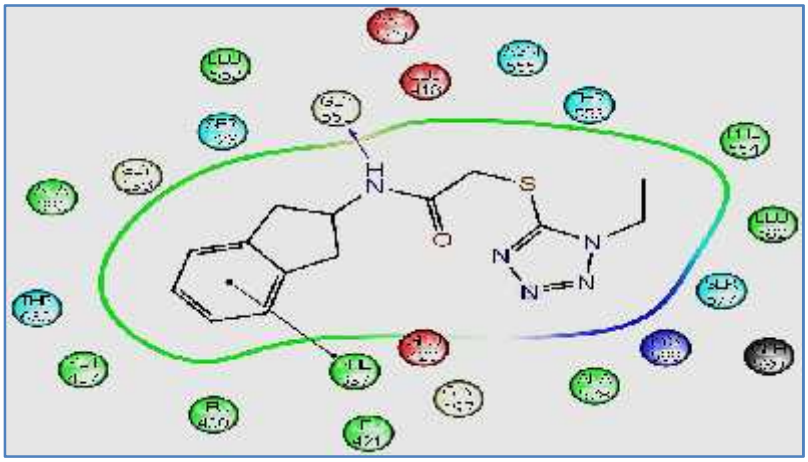
Χημική δομή	Υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης	Δεσμοί υδρογόνου
	-7,205	NH & -CO- (Gly551): 1,870 Å

Παρατηρείται ότι οι δεσμοί υδρογόνου δε συνεισφέρουν ιδιαίτερα στην αύξηση της βαθμολογίας μοριακής πρόσδεσης (Σχήμα 8.27).



Σχήμα 8.27: Εικόνα της ένωσης 006714 στην περιοχή του ενεργού κέντρου. Με φούξια χρώμα παρουσιάζονται οι αποστάσεις τμημάτων του μορίου από τα κρίσιμα αμινοξέα Arg200, Ser228 και Asp549 (4,82 & 4,62 Å, 3,35 Å και 4,57 Å αντίστοιχα).

Ακολουθεί δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του μορίου στην περιοχή του ενεργού κέντρου.



Σχήμα 8.28: Αλληλεπιδράσεις ένωσης 006714 με το ενεργό κέντρο της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης cPLA$_2$. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται ανάμεσα σε τμήματα του μορίου και των υδροφοβικών τμημάτων των αμινοξέων Ala396, Phe397, Leu400, Met417, Leu421, Leu552 και Leu592.

Στη βιβλιοθήκη ενώσεων Zinc η ένωση αυτή φέρει αριθμό ταυτότητας 00171451.

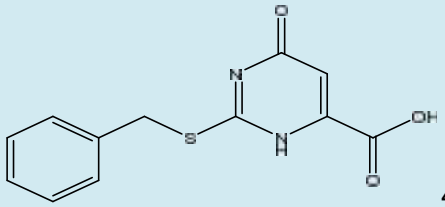
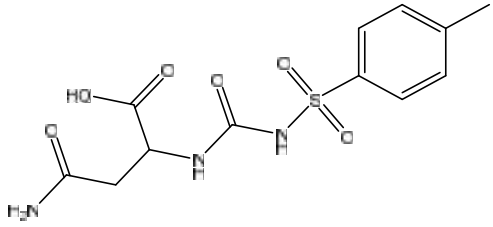
8.9 Βιβλιοθήκη ενώσεων NCI

Από τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο προέκυψαν ογδόντα επτά (87) ενώσεις κρούσης που παρουσιάζουν βαθμολογία προσαρμογής στο φαρμακοφόρο μοντέλο μεγαλύτερη από την βαθμολογία του αναστολέα με την ισχυρότερη βιολογική δράση. Λόγω του μεγάλου αριθμού των ενώσεων κρούσης, ακολουθήθηκε η πορεία εικονικής σάρωσης (Virtual Screening Workflow) που παρέχεται από το λογισμικό της εταιρίας Schrodinger. Η πορεία αυτή αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Προετοιμασία των μορίων (ligands) που πρόκειται να μελετηθούν,
2. Χρησιμοποίηση της εφαρμογής QikProp. Με τη βοήθεια της εφαρμογής αυτής ελέγχεται εάν τα υπό μελέτη μόρια ακολουθούν τον κανόνα του Lipinski,
3. Μοριακή πρόσδεση με τη χρησιμοποίηση του αλγόριθμου Glide σε τρία επίπεδα ακρίβειας, HTVS, SP, XP.[16,94,95]

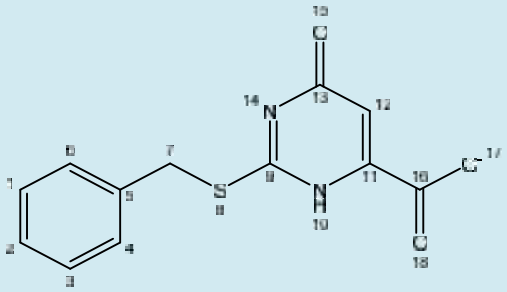
Ακολουθώντας αυτή την πορεία, προέκυψαν δύο μόρια για τα οποία οι πληροφορίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.24:

Πίνακας 8.24: Ενώσεις κρούσης που προέκυψαν από τη βιβλιοθήκη ενώσεων NCI.

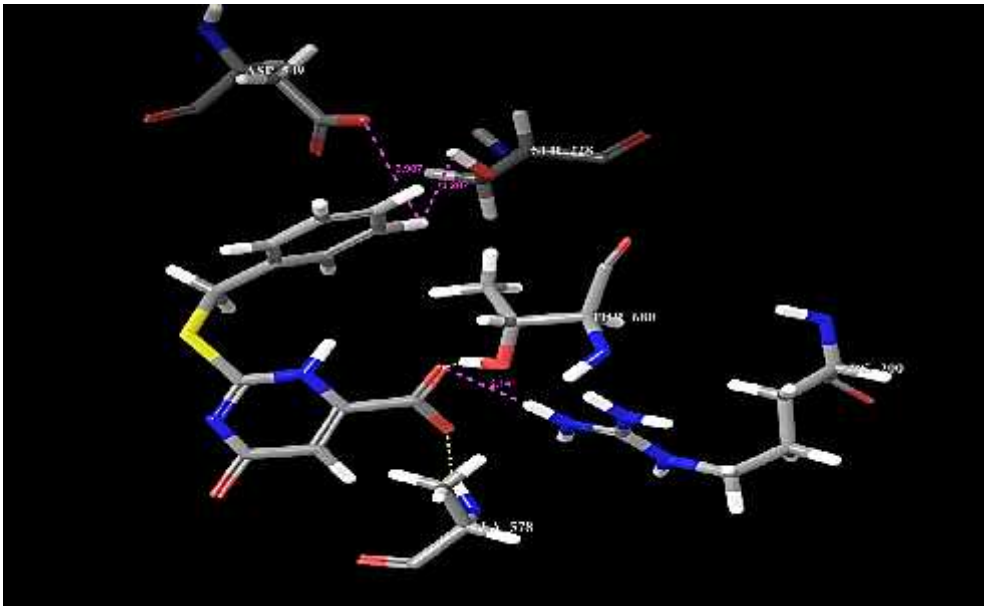
Χημική δομή	Υψηλότερη βαθμολογία πρσδεσης (XP Glide)
 42010	-8,255
 702672	-0,454

Η βαθμολογία πρόσδεσης του μορίου 42010 οδηγεί στην πραγματοποίηση ενός ακριβέστερου υπολογισμού με τη διαδικασία IF. Τα αποτελέσματα αυτού του υπολογισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.25 που ακολουθεί.

Πίνακας 8.25: Αποτελέσματα IF για το μόριο 42010

Χημική δομή	Υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης (IF)
 (Η αρίθμηση έγινε προς διευκόλυνση του αναγνώστη και δεν σχετίζεται με το διεθνές σύστημα ονοματολογίας της IUPAC)	-9,354

Παρακάτω παρουσιάζεται εικόνα του μορίου 42010 στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο πιθανότατα με μια κατάλληλη τροποποίηση της δομής του να αποδιδει ευνοϊκότερη βαθμολογία πρόσδεσης, εκμεταλλευόμενο την υδροφοβικότητα της περιοχής πρόσδεσης.



Σχήμα 8.29: Μόριο 42010. Διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου και με μωβ διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι αποστάσεις τμημάτων του μορίου από τα βασικά αμινοξέα Ser228 (3,21 Å), Asp549 (3,91 Å) και Arg200 (2,14 Å).

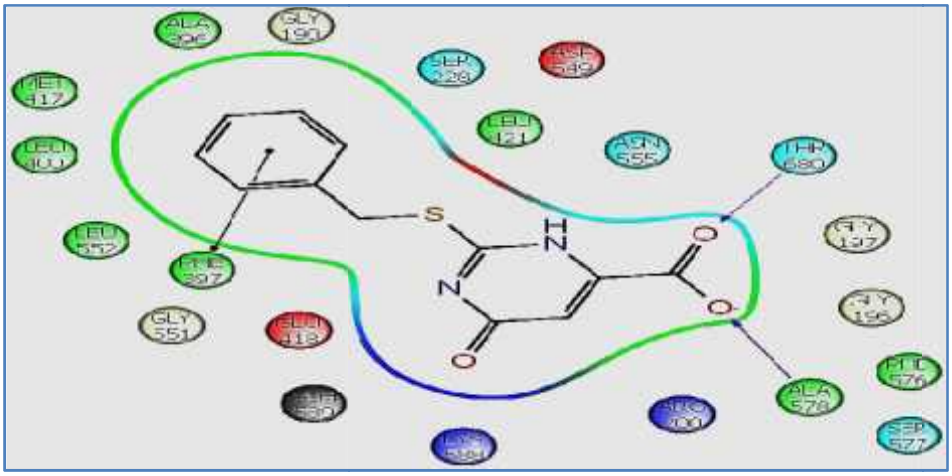
Στις αλληλεπιδράσεις, παρατηρείται δυνάμει δεσμός υδρογόνου του μορίου 42010 με το αμινοξύ Arg200 και Asn555 (εκφράζεται ως δυνάμει δεσμός

υδρογόνου γιατί δεν καλύπτει και τις τρεις προυποθέσεις που απαιτούνται για τη δημιουργία δεσμού υδρογόνου [69]).

Πίνακας 8.26: Αλληλεπιδράσεις Σχήματος 8.29. Η αρίθμηση των ατόμων του μορίου με αριθμό ταυτότητας 42010 στη βάση δεδομένων NCI παρουσιάζεται στον Πίνακα 8.26 και πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού Chemdraw.

Αλληλεπίδραση	Αποστάσεις (Å)
Άτομο 17 - Ala578: O…HN	1,746
Άτομο 18 - Thr680: O…HO	1,935

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται δισδιάστατη εικόνα της τοποθέτησης του μορίου 42010 στην περιοχή του ενεργού κέντρου (Σχήμα 8.30).

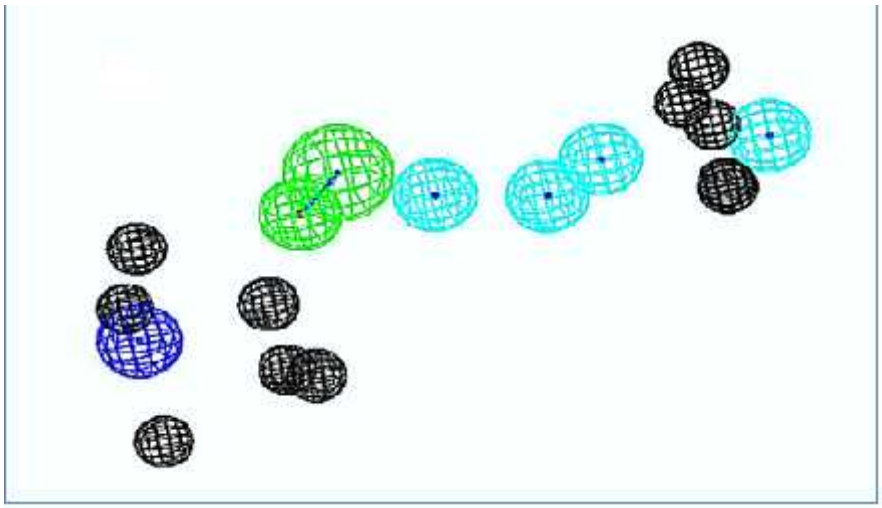


Σχήμα 8.30: Αλληλεπιδράσεις μορίου 42010 με το ενεργό κέντρο ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης. Υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται ανάμεσα σε τμήματα του μορίου και τις υδροφοβικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Ala396, Phe397, Leu400, Met417, Leu421 και Ala578.

Η ένωση ταυτοποιείται στη βιβλιοθήκη ενώσεων Pubchem: 237919.

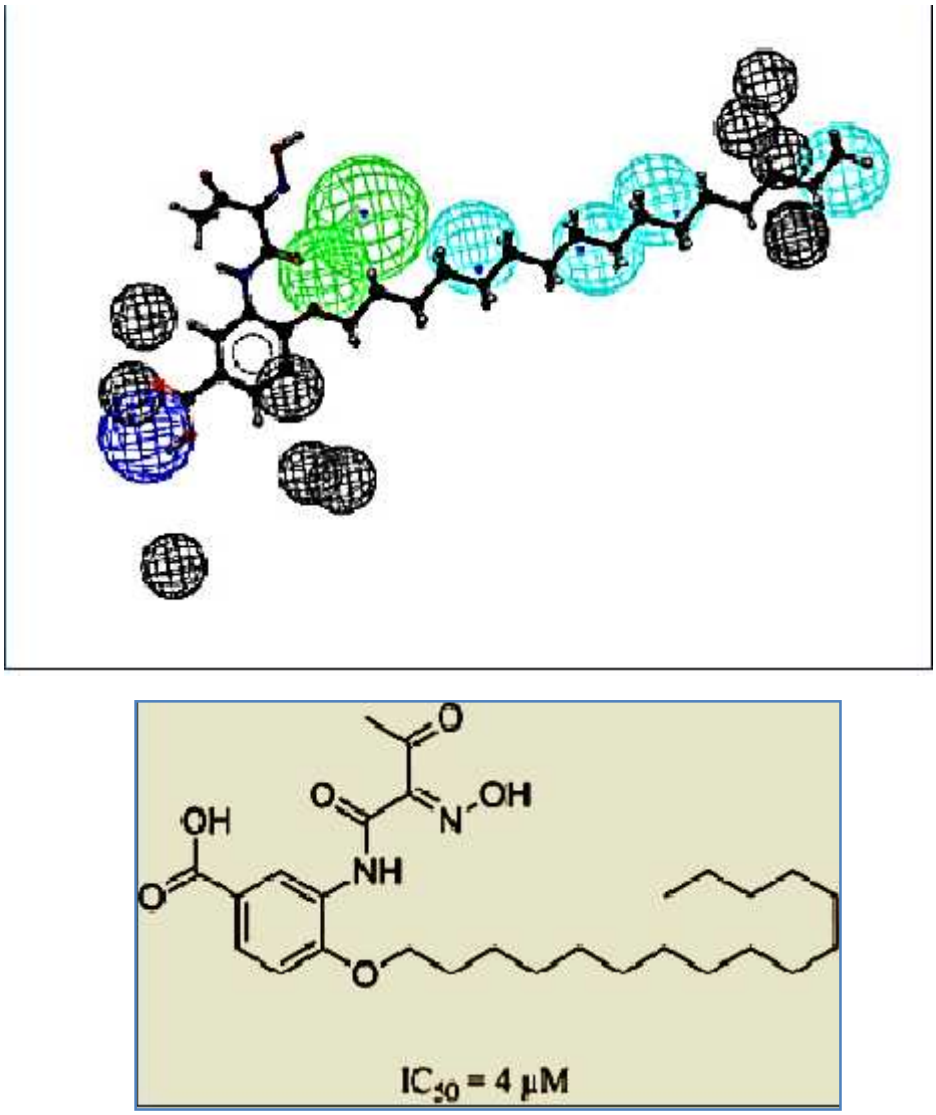
8.10 Σύγκριση φαρμακοφόρου μοντέλου για την ανθρώπινη κυτοσολική φωσφολιπάση που παρουσιάστηκε στη βιβλιογραφία με το φαρμακοφόρο μοντέλο της παρούσας ερευνητικής εργασίας

Στο άρθρο [96] παρουσιάζεται φαρμακοφόρο μοντέλο για την ανθρώπινη κυτοσολική φωσφολιπάση $cPLA_2$. Στα Σχήματα 8.31 και 8.32 που ακολουθούν, παρουσιάζεται το φαρμακοφόρο αυτό μοντέλο και δίνονται σχετικές πληροφορίες.



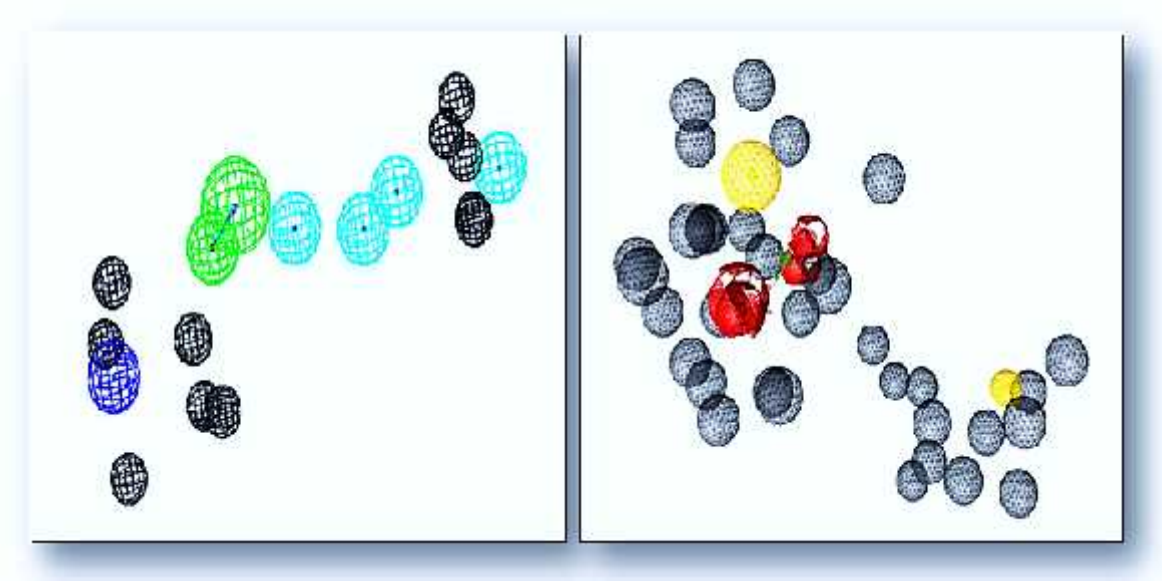
Σχήμα 8.31: Φαρμακοφόρο μοντέλο που παρουσιάζεται στο άρθρο [96]. Με μπλέ χρώμα σφαίρες αντιπροσωπεύεται η αρνητικά φορτισμένη περιοχή, με κυανό χρώμα σφαίρες, οι υδροφοβικές περιοχές, και με πράσινο χρώμα σφαίρες, οι δέκτες δεσμών υδρογόνου.

Στο Σχήμα 8.32 παρουσιάζεται το φαρμακοφόρο μοντέλο στο οποίο έχει υπερτεθεί ένωση που προέκυψε από τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης με βάση το φαρμακοφόρο και η οποία, μετά από *in vitro* δοκιμές, εμφανίζει βιολογική δράση.



Σχήμα 8.32: Υπέρθεση του μορίου που προέκυψε ως ένωση κρούσης από τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης [96] με το αντίστοιχο φαρμακοφόρο μοντέλο του άρθρου. Παρουσιάζεται, επίσης, η χημική δομή του μορίου.

Στο Σχήμα 8.33 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα: α) φαρμακοφόρο μοντέλο άρθρου [96] και β) φαρμακοφόρο μοντέλο που δημιουργήθηκε στη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας και πραγματοποιείται σύγκριση αυτών.

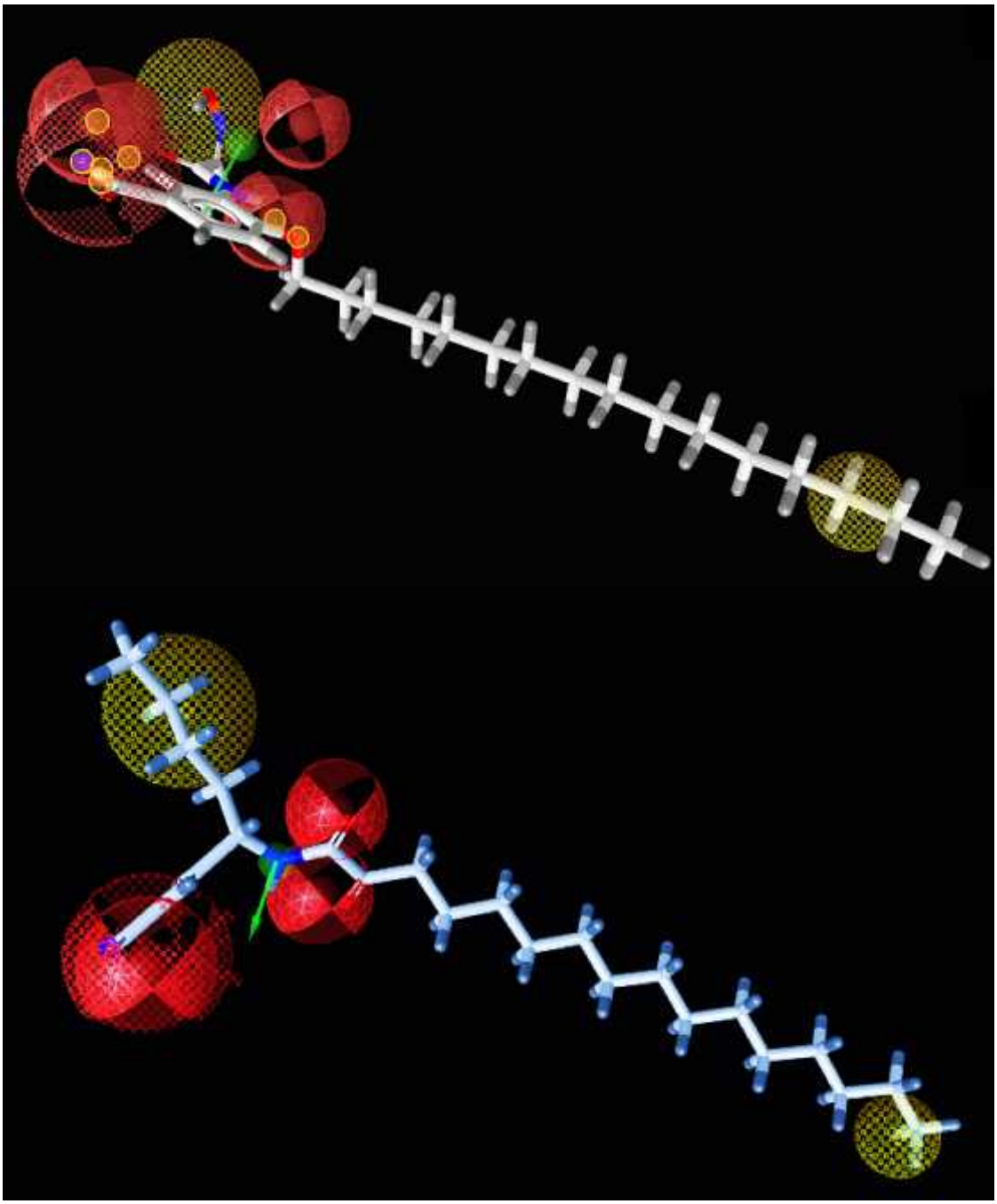


Σχήμα 8.33: Φαρμακοφόρο μοντέλο άρθρου [96] αριστερά και φαρμακοφόρο μοντέλο της παρούσας ερευνητικής εργασίας δεξιά.

Τα δύο φαρμακοφόρα παρουσιάζουν ομοιότητες ως προς την κοινή παρουσία μιας αρνητικά φορτισμένης περιοχής, μιας υδροφοβικής περιοχής και δύο δεκτών υδρογόνου. Το φαρμακοφόρο, όμως, της παρούσας ερευνητικής εργασίας περικλείει στην αρνητικά φορτισμένη περιοχή και χαρακτηριστικά δεκτών υδρογόνου, περιέχει μια επιπλέον υδροφοβική περιοχή κοντά στην αρνητικά φορτισμένη περιοχή καθώς και ένα χαρακτηριστικό που αντιπροσωπεύει δότη δεσμού υδρογόνου.

Στο Σχήμα 8.34 παρουσιάζεται εικόνα της ένωσης που βρέθηκε βιολογικά δραστική στο άρθρο [96] σε υπέρθεση με το φαρμακοφόρο της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Πραγματοποιήθηκε υπέρθεση πεντακοσίων (500) διαμορφώσεων της ένωσης με το φαρμακοφόρο μοντέλο (alignment perspective) και βρέθηκε η διαμόρφωση, η οποία ικανοποιεί περισσότερο τα κριτήρια που θέτει το φαρμακοφόρο μοντέλο. Όπως φαίνεται, η ένωση-αναστολέας της ανθρώπινης κυτοσολικής φωσφολιπάσης που προέκυψε από την ερευνητική εργασία του άρθρου [96] ικανοποιεί τρία μόνο κριτήρια που θέτει το φαρμακοφόρο μοντέλο της παρούσας ερευνητική εργασίας (Σχήμα 8.34).



Σχήμα 8.34: Πάνω: Υπέρθεση μορίου άρθρου [96] με το φαρμακοφόρο που δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα η ένωση προσαρμόζεται μόνο στη μικρή υδροφοβική περιοχή (κίτρινη σφαίρα) και σε δύο δότες δεσμών υδρογόνου. Κάτω: Υπέρθεση του αναστολέα AX074 (ισχυρότερη βιολογική δράση) στο ίδιο φαρμακοφόρο μοντέλο.

‘Οπως προκύπτει και έχει τονισθεί πιο πάνω το προτεινόμενο μοντέλο μας έχει μερική μόνο ταύτιση με αυτό που έχει δημοσιευτεί. Το αποτέλεσμα αυτό δεν εκπλήσσει. Για την κατασκευή του μοντέλου ελήφθησαν υπόψη τα

πειραματικά δεδομένα φασματομετρίας μάζας δευτερίου και μοριακής δυναμικής, ενώ αυτό της βιβλιογραφίας μόνο σε in silico αποτελέσματα.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι για ευέλικτα μόρια τα πειραματικά αποτελέσματα οδηγούν σε περισσότερο αξιόπιστα αποτελέσματα.[97] Επομένως πιστεύουμε ότι το φαρμακοφόρο μοντέλο που προτείνουμε αποτελεί βελτιωμένο συγκριτικά με αυτό που προτείνεται στη βιβλιογραφία.

Στο παράρτημα της εργασίας παρουσιάζονται Σχήματα με την προσαρμογή ορισμένων ενώσεων κρούσης στο φαρμακοφόρο μοντέλο που δημιουργήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικης Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	**Ελληνικός Όρος**
Protein Data Base	Βάση Δεδομένων Πρωτεϊνών
Human Cytosolic Phospholipase A_2	Ανθρώπινη Κυτοσολική Φωσφολιπάση A_2
Knock-out	Απενεργοποιημένο γονίδιο μέσω γενετικού σχεδιασμού
Platelet Aggregating Factor	Παράγοντας Συσσώρευσης Αιμοπεταλίων
Cap Region	Περιοχή Καλύμματος
Ca^{2+} Binding Loop	Θηλιά Δέσμευσης Ιόντων Ασβεστίου
Ceramide 1-Phosphate	Κεραμιδική 1 Κινάση
Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate	Διφωσφορική Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
Closed Lid	Κλειστή Μορφή
Open Lid	Ανοιχτή μορφή
Interfacial Activation	Μεσοεπιφανειακή Ενεργοποίηση
Molecular Docking	Μοριακή Πρόσδεση
Ligand Pose	Απεικόνιση του Προσδέτη
Core	Πυρήνας
Rotamer Groups	Στροφομερείς Ομάδες
Grid	Ενεργό Κέντρο
Gscore-Docking Score	Βαθμολογία Μοριακής Πρόσδεσης
Desolvation Effects	Φαινόμενα Αποδιαλύτωσης
Virtual Screening Workflow	Ροή Εργασίας της Διαδικασίας Εικονικής Σάρωσης
Ligand Preparation	Προετοιμασία Προσδέτη

Skin Permeability	Διαπερατότητα Δέρματος
Aqueous Solubility	Διαλυτότητα σε ύδωρ
Induced Fit	Επαγόμενη Προσαρμογή
Root Mean Square Deviation	Τετραγωνική Ρίζα της Μέσης Τιμής των Τετραγώνων
Loops	Βρόγχοι
International Union of Applied Chemistry	Διεθνής Ένωση Εφαρμοσμένης Χημείας
Ligand-based	Δημιουργία Φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος αναφοράς
Structure-based	Δημιουργία Φαρμακοφόρου με βάση την πιθανή βιοδραστική διαμόρφωση του προσδέματος στο σύμπλεγμα προσδέματος-βιολογικού στόχου
Macromolecule (without ligand) based	Μακρομόριο στόχος χωρίς την παρουσία κάποιου προσδέματος
Complex	Σύμπλεγμα
Macromolecule-ligand-complex based	Σύμπλεγμα Βιολογικού Στόχου και Προσδέματος/Προσδεμάτων
Virtual Screening	Εικονική Σάρωση
Multitarget Drug Design	Σχεδιασμός Φαρμάκων με Στόχευση Πολλαπλών Στόχων
Computational Chemistry	Υπολογιστική Χημεία
Lead Compounds	Ενώσεις Οδηγοί
Conformational Space	Διαμορφωτικός Χώρος
Training Set	Μόρια Εκγύμνασης
Decoys	Παραπλανητικά Μόρια
Compounds Databases	Βάσεις Δεδομένων
Pharmacophore-Based Virtual Screening	Εικονική Σάρωση με βάση το φαρμακοφόρο

Hits	Ενώσεις Κρούσης
Pharmacophore pattern	Φαρμακευτικό Πρότυπο
National Cancer Institute	Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου
Perspectives	Τμήματα
Regiochemical	Ισομερή θέσης
Standard	Πρότυπες
Clean	Επιθυμητά
Benign	Πρόσφορες Λειτουργικές Ομάδες
Trial	Δοκιμαστική
Desolvation	Αποδιαλύτωση
Ready-to-download Compressed Files	Συμπιεσμένοι φακέλοι που παραλαμβάνονται μέσω του διαδικτύου
Lead-like	Ενώσεις που προσομοιάζουν τις οδηγούς
Fragment-like	Δομικά τμήματα που προσομοιάζουν αυτά που μπορούν να προσδώσουν βιολογικές ιδιότητες
Text	Κείμενο
Structure	Δομή
Properties	Φυσικές Ιδιότητες
Targets	Βιολογικοί Στόχοι
Rings	Δακτύλιοι
Combination	Σύνθετος Τύπος
Ligands	Προσδέτες
Quantitative Structure Activity Relationship	Ποσοτικές Σχέσεις Δομής Δράσης
Molecular Polar Surface Area TPSA	Μοριακή Πολική Επιφάνεια
Number of Rotatable Bonds	Αριθμός Περιστρεφόμενων Δεσμών

Molecular Volume	Μοριακός Όγκος
Druglikeness	Φαρμακομοριακή ομοιότητα
Metabolic Stability	Μεταβολική Σταθερότητα
GPCR Ligand	Προσδέτης GPCR
Ion Channel Modulator	Ρυθμιστής Πρωτεϊνών-Καναλιών Ιόντων
Kinase Inhibitor	Αναστολέας Κινάσης
Nuclear Receptor Ligand	Προσδέτης Πυρηνικών Πρωτεϊνών
Enzyme Inhibitor	Αναστολέας Ενζύμων
Protease Inhibitor	Αναστολέας Πρωτεασών
Three-Dimensional	Τρισδιάστατος
Bioavailable	Βιοδιαθέσιμες
Membrane-Permeable	Διαπερατότητα των μεμβρανών
Protein Preparation Wizard	Οδηγός Προετοιμασίας Πρωτεΐνης
Heavy Atoms	Βασικός Σκελετός
Multimeric	Πολυμερές
Assign Bond Orders	Ταυτοποίηση των Δεσμών
Add Hydrogens	Προσθήκη Υδρογόνων σε όλα τα άτομα
Create Zero Bonds to Metals	Αποδέσμευση των Μεταλλικών Ιόντων από δεσμούς με γειτονικά άτομα
Create Disulfide Bonds	Δημιουργία Δισουλφιδικών Δεσμών ανάμεσα σε γειτονικά άτομα θείου
Fill in Missing Side Chains Using Prime	Προσθήκη Πλευρικών Αλυσίδων με χρήση του Prime
Fill in Missing Loops Using Prime	Προσθήκη Βρόγχων με χρήση του Prime
2-(N-Morpholino)-EthaneSulfonic Acid	2-Ν-μορφολινο-αιθανοσουλφονικό Οξύ
Refine H-Bond Assignments	Βελτιστοποίηση του Δικτύου Δεσμών Υδρογόνου

Impref Minimization	Βελτιστοποίηση των Θέσεων των Ατόμων Υδρογόνου του Ενζύμου
Iterations	Επαναλήψεις
Project Table	Πίνακας Δημιουργίας Γραφημάτων
Receptor Grid Generation	Ορισμός της περιοχής του Ενεργού Κέντρου του Ενζύμου
Generate Conformations for Ligand-Set	Δημιουργία Διαμορφώσεων
Create Pharmacophore	Δημιουργία Φαρμακοφόρου
Perform Screening	Εκτέλεση Σάρωσης
Minimization Algorithms	Αλγόριθμοι Ελαχιστοποίησης της Ενέργειας
Steepest Descents	Βαθύτατης Κατάδυσης
Conjugated Gradient	Βαθμιδωτής Σύζευξης
Trajectory	Τροχιά
Snapshots	Χρονικές Στιγμές
Graphical User Interface	Γραφική Διεπιφάνεια Χρήστη
Build Toolbar	Ράβδος Δόμησης
Build	Δόμηση
Current energy	Υπολογισμός Ενέργειας Μορίου
Minimization	Ελαχιστοποίηση Ενέργειας Μορίου
Conformational Search	Διαμορφωτική Ανάλυση
Monte Carlo Multiple Minimum	Μέθοδος Πολλαπλών Ελαχίστων Monte Carlo
Systematic Pseudo-Monte Carlo	Συστηματική Μέθοδος ψευδο-Monte Carlo
Low-Mode Conformational Search Methods	Χαμηλής Συχνότητας Μέθοδος Εφαρμογής Διαμορφωτικών Μεθόδων Ανάλυσης

Mixed MCMM/Low-Mode Conformational Search Methods	Ανάμιξη Μεθόδων Διαμορφωτικής Ανάλυσης 1 και 3
Bad	Μη Ευνοϊκή
Test Set	Ενώσεις Αξιολόγησης
Lead Compound	Ένωση-Οδηγός
Clustering Method	Μέθοδος Ομαδοποίησης
Pharmacophore Fit	Βαθμολογία Προσαρμογής στο Φαρμακοφόρο Μοντέλο
Leukotriene A-4 Hydrolase	Υδρολάση Α4 Λευκοτριενίων
Bacterial Leucyl Aminopeptidase	Βακτηριακή Αμινοπεπτιδάση της Λευκίνης
Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1-Induder	Πρωτεΐνη TRPA1
Taste Receptor TYPE 1 Member 2-Agonist	Υποδοχέας Γεύσης Τύπου 1
Cholecystokinin-1 Receptor	Υποδοχέας της Χοληκυστοκινίνης-1
Cholecystokinin-2 Receptor	Υποδοχέας Χοληκυστοκινίνης-2
Molecular Dynamics	Μοριακή Δυναμική

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

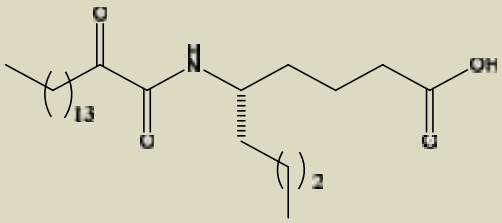
Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

PDB	Protein Data Base
$cPLA_2$	Cytosolic Phospholipases A_2
PAF	Platelet Aggregating Factor
CBL	Ca^{2+} Binding Loop
MAP	Mitogen Activated Protein
C1P	Ceramide-1-Phosphate
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
COX-1 COX-2	Cyclooxygenase-1 Cyclooxygenase-2
sn	Systematic Name
Glide	Grid-Based Ligand Docking with Energetics
HTVS	High-Throughput Virtual Screening
SP	Standard Precision
XP	Extra Precision
IF	Induced Fit
RMSD	Root Mean Square Deviation
IUPAC	International Union of Applied Chemistry
SBP	Structure-Based Pharmacophore
VS	Pharmacophore-Based Virtual Screening
NCI	National Cancer Institute
ACD	Accelrys Available Chemicals Directory
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship

3D	Three-Dimensional
nrotb	Number of Rotatable Bonds
GPCR	G Protein Coupled Receptors
MES	2-(N-Morpholino)-EthaneSulfonic acid
PRCG	Polak-Ribiere Conjugate Gradient
MCMM	Monte Carlo Multiple Minimum
SPMC	Systematic Pseudo-Monte Carlo
ZDD	Zinc Drug Database
MD	Molecular Dynamics
CAS	CAS Registry Number
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

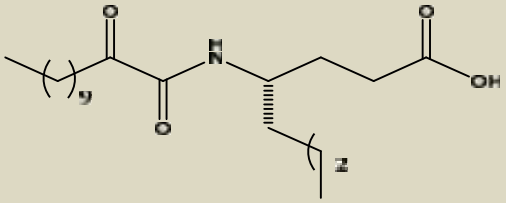
Διαδικτυακός χώρος **http://www.molinspiration.com**-Υπολογισμός μοριακών ιδιοτήτων-Υπολογισμός πιθανότητας βιοδραστικότητας ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία και την αξιολόγηση του φαρμακοφόρου μοντέλου.



2

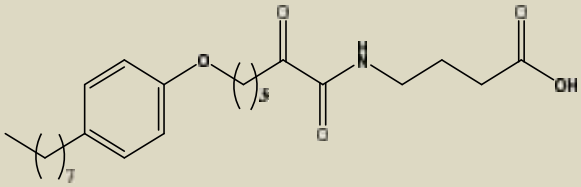
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	7,806
TPSA	83,468
natoms	30,0
MW	425,654
nON	5
nOHNH	2
nviolations	1
nrotb	22
Molecular volume	459,189
Στόχοι φαρμάκων	***Σκορ***
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,15
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,01
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,26

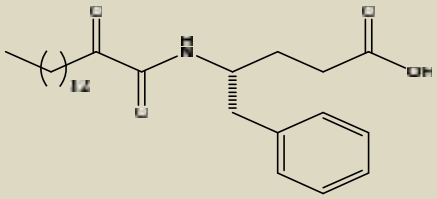
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,13
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,29
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,48

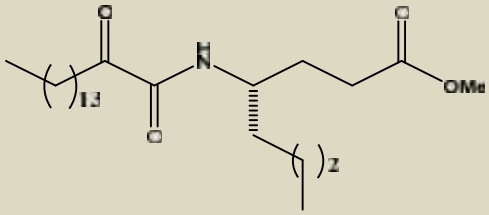


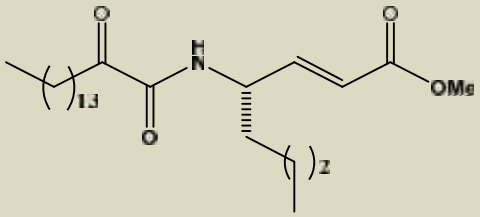
3

Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	5,28
TPSA	83,468
natoms	25,0
MW	355,519
nON	5
nOHNH	2
nviolations	1
nrotb	17
Molecular volume	375,181
Στόχοι φαρμάκων	***Σκορ***
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,18
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,01
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,31
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,16
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,35
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,58

 **4**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	4,483
TPSA	92,702
natoms	29,0
MW	405,535
nON	6
nOHNH	2
nviolations	0
nrotb	17
Molecular volume	405,383
Στόχοι φαρμάκων	***Σκορ***
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,20
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,02
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0.30
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,24
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,33
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,48

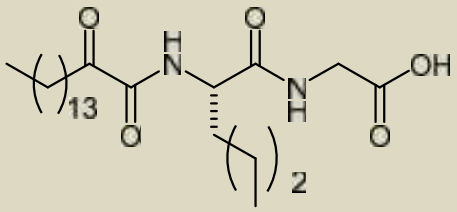
 **5**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	6,656
TPSA	83,468
natoms	31,0
MW	431,617
nON	5
nOHNH	2
nviolations	1
nrotb	19
Molecular volume	446,83
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,22
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	0,00
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,25
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,16
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,31
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,56

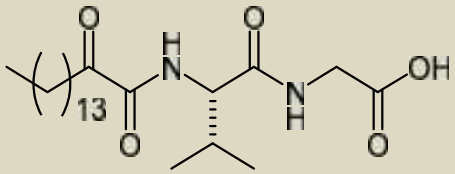
 **6**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	7,608
TPSA	72,474
natoms	30,0
MW	425,654
nON	5
nOHNH	1
nviolations	1
nrotb	22
Molecular volume	459,916
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,04
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,08
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,31
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	-0,01
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,19
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,39

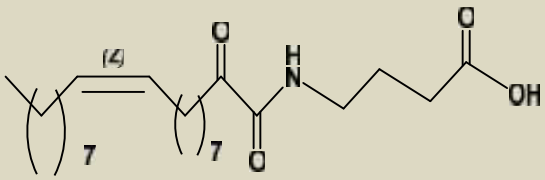


7

Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	7,895
TPSA	72,474
natoms	30,0
MW	423,638
nON	5
nOHNH	1
nviolations	1
nrotb	21
Molecular volume	453,729
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,07
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0.05
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0.32
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0.07
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,24
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,54

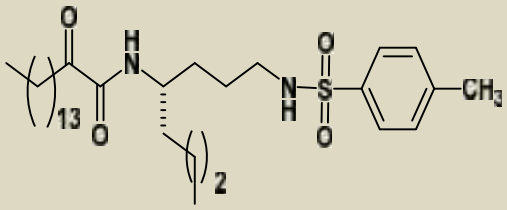
 **8**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	4,953
TPSA	112,566
natoms	31,0
MW	440,625
nON	7
nOHNH	3
nviolations	0
nrotb	21
Molecular volume	456,972
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,16
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,01
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,27
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,13
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,31
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,61

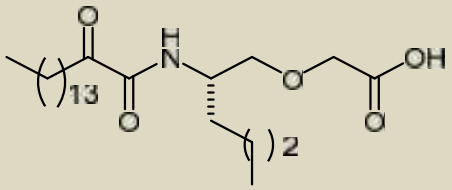
	**9**
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	4,132
TPSA	112,566
natoms	30,0
MW	426,598
nON	7
nOHNH	3
nviolations	0
nrotb	19
Molecular volume	439,955
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,11
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,09
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,33
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	-0,01
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,29
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,66



10

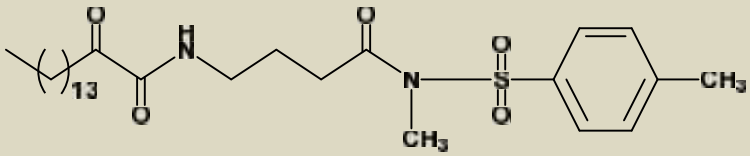
Ιδιότητα	Προβλεπόμενη τιμή
miLogP	6,4
TPSA	83,468
natoms	28,0
MW	395,584
nON	5
nOHNH	2
nviolations	1
nrotb	20
Molecular volume	419,614
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,19
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	0,00
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,29
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,17
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,36
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,47

 **11**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	8,787
TPSA	92,338
natoms	38,0
MW	550,85
nON	6
nOHNH	2
nviolations	2
nrotb	24
Molecular volume	563,992
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,03
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,31
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,32
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	-0,14
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,10
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,35



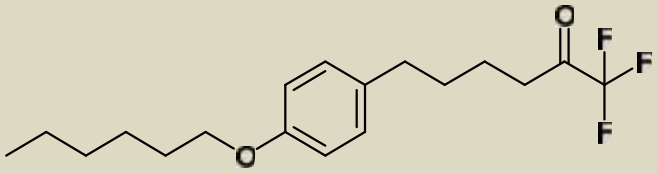
12

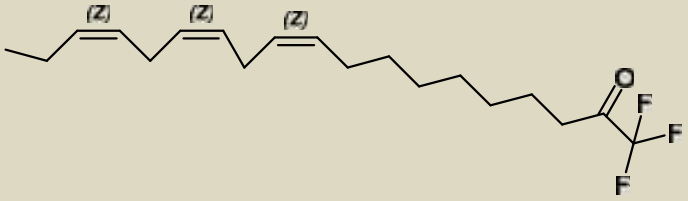
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	6,744
TPSA	92,702
natoms	30,0
MW	427,626
nON	6
nOHNH	2
nviolations	1
nrotb	22
Molecular volume	451,372
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,12
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,14
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,24
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,11
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,28
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,49



13

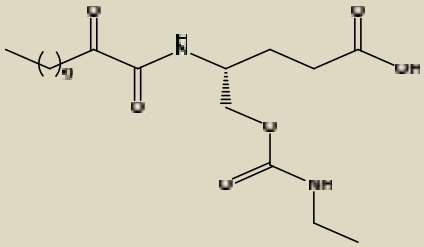
Ιδιότητα	Προβλεπόμενη τιμή
miLogP	6,832
TPSA	100,62
natoms	36,0
MW	522,752
nON	7
nOHNH	1
nviolations	2
nrotb	20
Molecular volume	516,124
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	-0,04
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,28
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,36
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	-0,17
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0.07
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,29

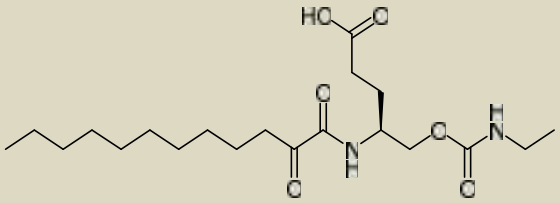
 **14**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	6,01
TPSA	26,305
natoms	23,0
MW	330,39
nON	2
nOHNH	0
nviolations	1
nrotb	12
Molecular volume	311,086
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	-0,07
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,18
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,41
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,19
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,17
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,14

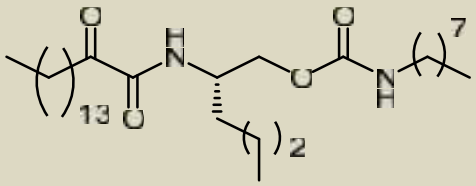


15

Ιδιότητα	Προβλεπόμενη τιμή
miLogP	6,689
TPSA	17,071
natoms	23,0
MW	330,434
nON	1
nOHNH	0
nviolations	1
nrotb	14
Molecular volume	329,745
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,05
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,01
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,36
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,20
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,33
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,15

 **16**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	3,572
TPSA	121,8
natoms	28,0
MW	400,516
nON	8
nOHNH	3
nviolations	0
nrotb	18
Molecular volume	398,749
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,32
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	0,03
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,20
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,26
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,46
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,79

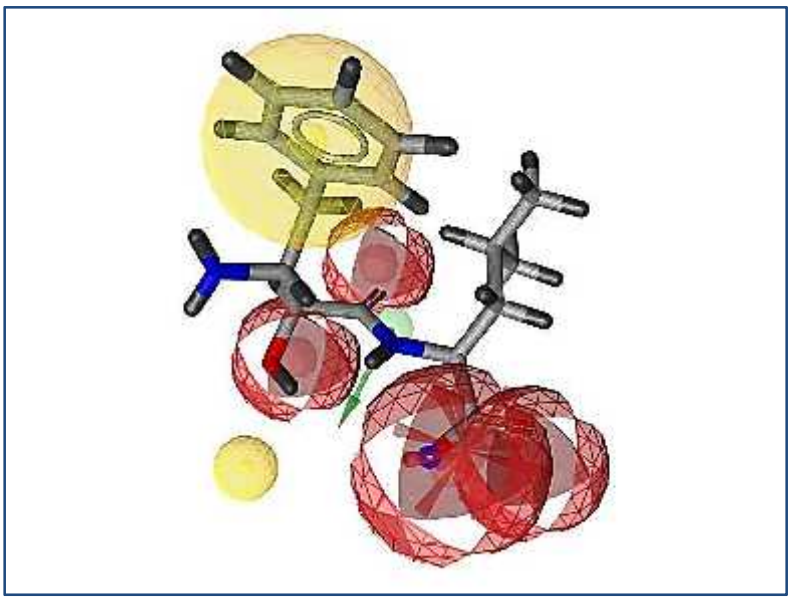
 **17**	
Ιδιότητα	**Προβλεπόμενη τιμή**
miLogP	3,572
TPSA	121,8
natoms	28,0
MW	400,516
nON	8
nOHNH	3
nviolations	0
nrotb	18
Molecular volume	398,749
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,32
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	0,03
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,20
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,26
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,46
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,79



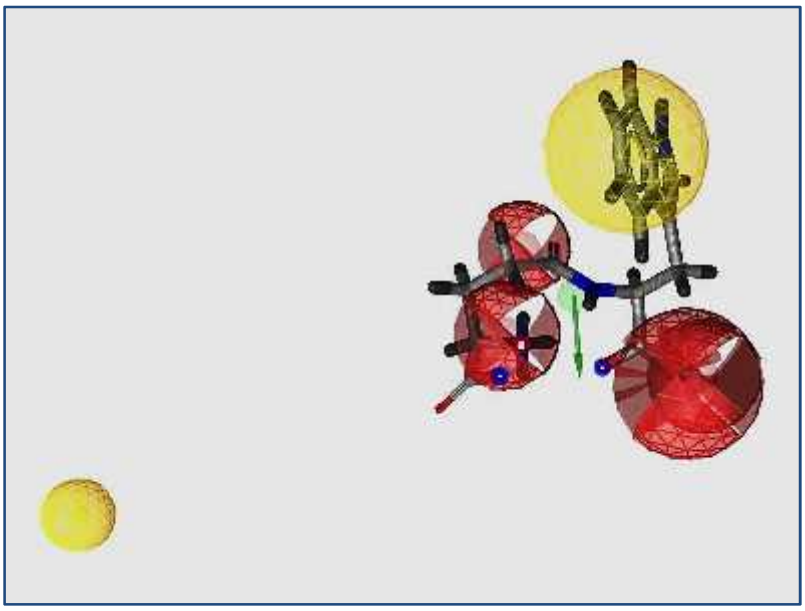
18

Ιδιότητα	Προβλεπόμενη τιμή
miLogP	9,343
TPSA	84,501
natoms	37,0
MW	524,831
nON	6
nOHNH	2
nviolations	2
nrotb	28
Molecular volume	573,129
Στόχοι φαρμάκων	
Προσδέτες GPCR (GPCR ligand)	0,17
Ρυθμιστής πρωτεϊνών-καναλιών ιόντων (Ion channel modulator)	-0,05
Αναστολέας κινάσης (Kinase inhibitor)	-0,13
Προσδέτης πυρηνικών πρωτεϊνών (Nuclear receptor ligand)	0,07
Αναστολέας ενζύμων (Enzyme inhibitor)	0,27
Αναστολέας πρωτεασών (Protease inhibitor)	0,54

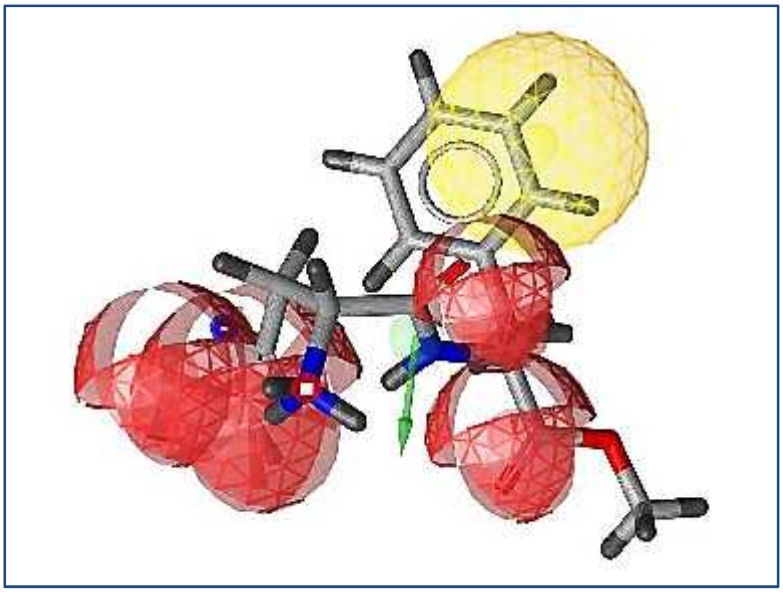
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



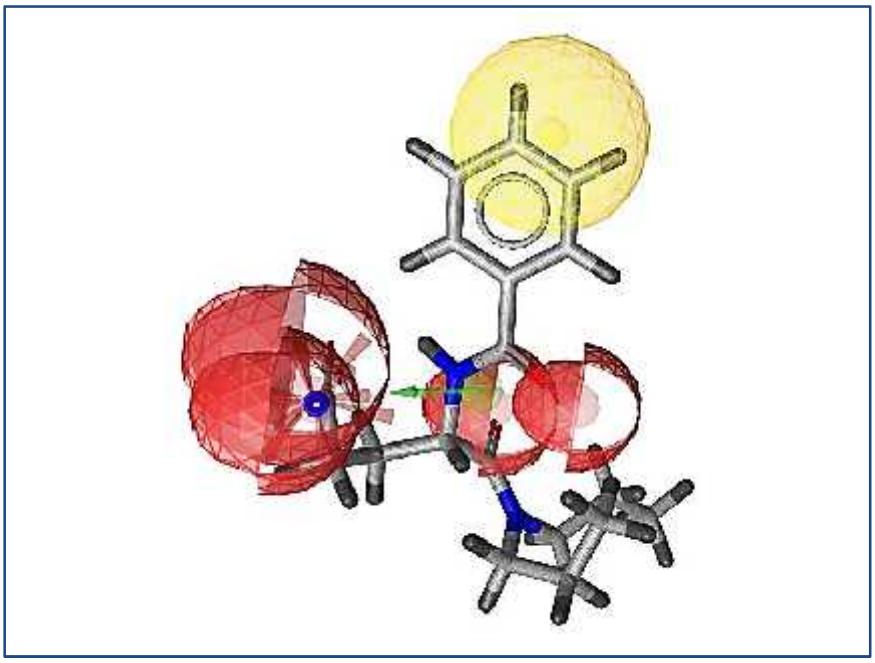
Σχήμα 1: Προσαρμογή της ένωσης 01542895 στο φαρμακοφόρο μοντέλο



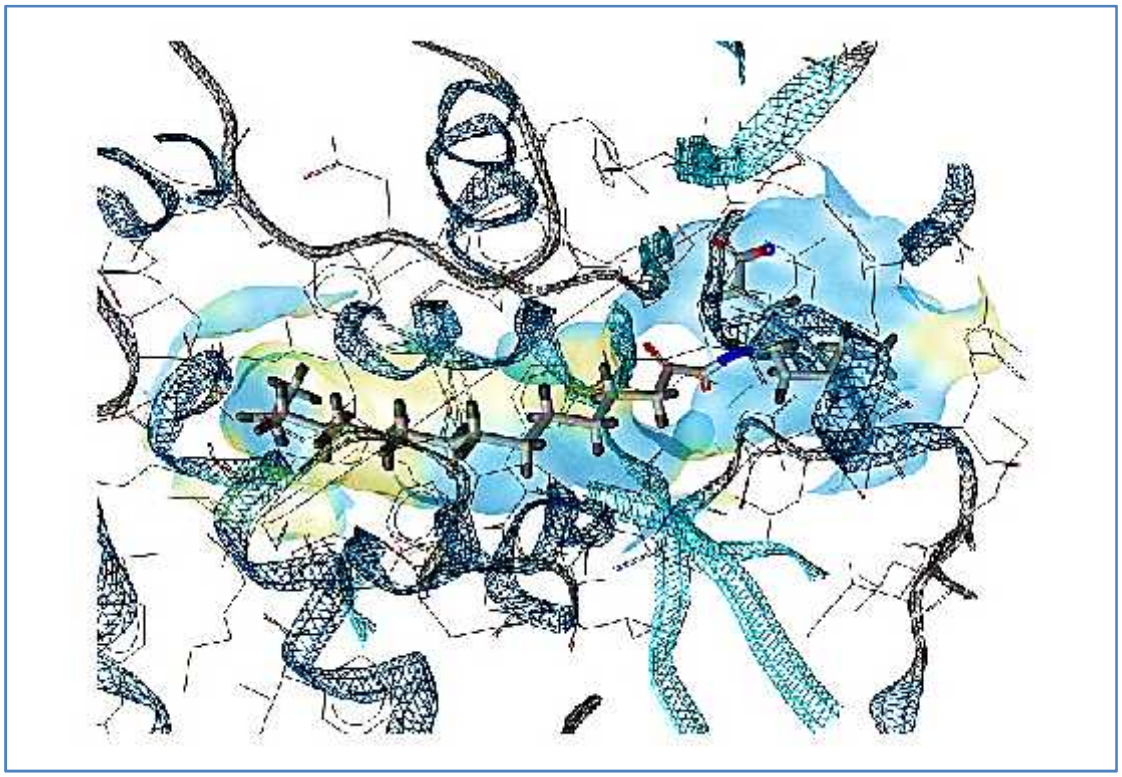
Σχήμα 2: Προσαρμογή της ένωσης 01549362 στο φαρμακοφόρο μοντέλο



Σχήμα 3: Προσαρμογή της ένωσης 01532129 στο φαρμακοφόρο μοντέλο

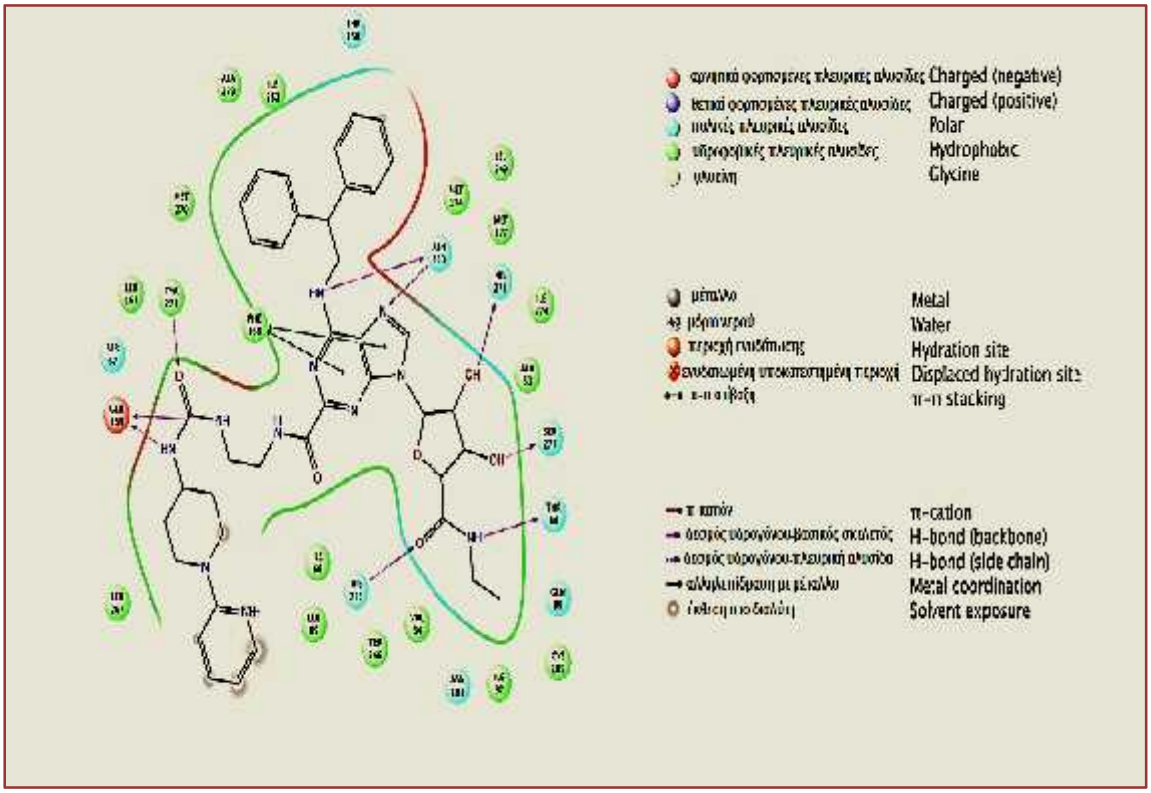


Σχήμα 4: Προσαρμογή της ένωσης 02033841 στο φαρμακοφόρο μοντέλο



Σχήμα 5: Σύμπλεγμα AX074 και ενζύμου $cPLA_2$. Παρουσιάζονται οι υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές του ενζύμου στην περιοχή πρόσδεσης.

Τα σχήματα 1-5 δημιουργήθηκαν με το λογισμικό LigandScout.



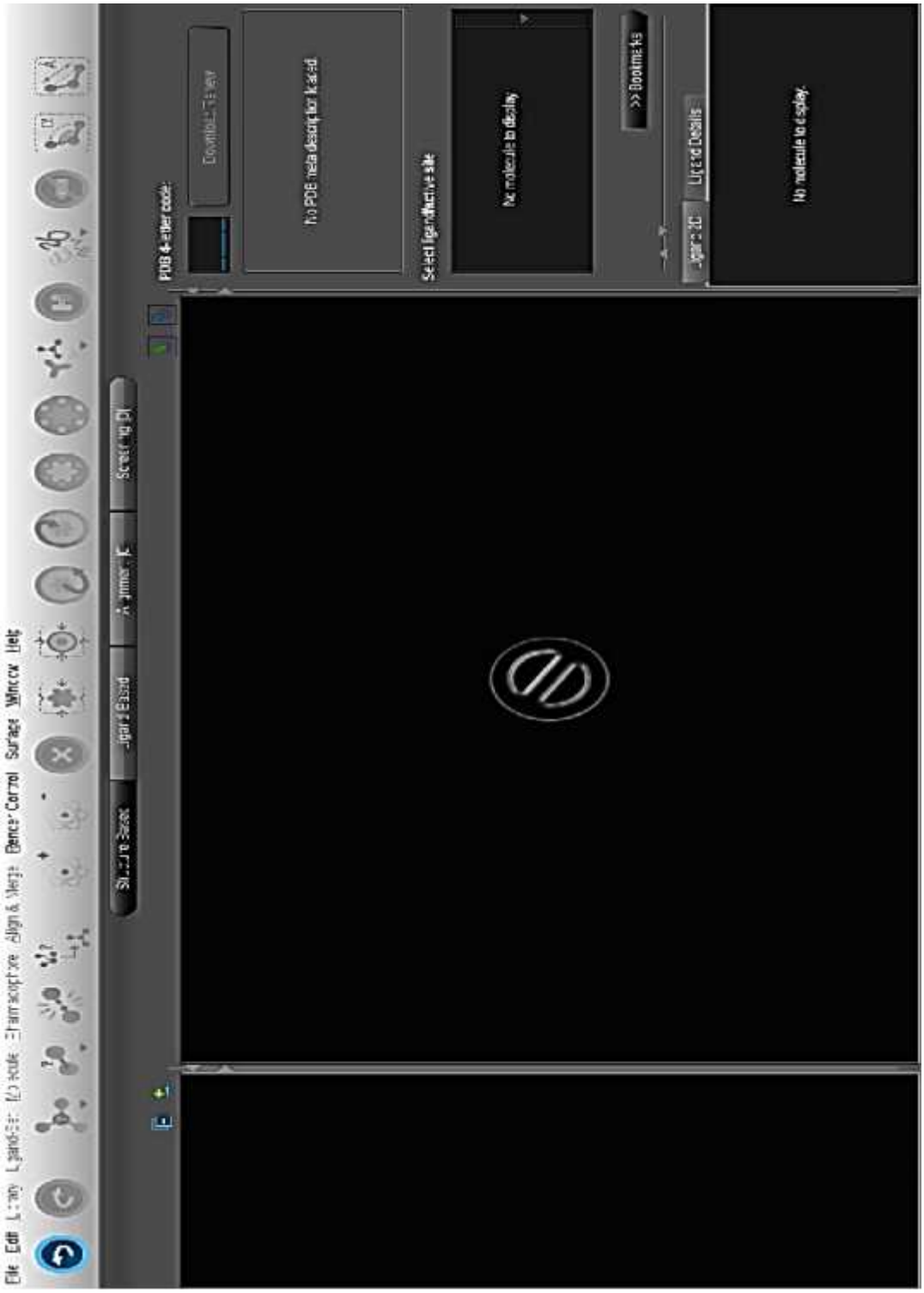
Σχήμα 6: Επεξήγηση συμβολισμών, Διαδικτυακός χώρος: https://www.schrodinger.com/suitegallery/1/

Πίνακας 1: Ενώσεις-κρούσης από βιβλιοθήκη ενώσεων NCI με βαθμολόγηση προσαρμογής στο φαρμακοφόρο μοντέλο μεγαλύτερη από αυτή του αναστολέα AX074 που παρουσιάζει την ισχυρότερη βιολογική δράση.

45705	**555**	**3143**	**3682**	**9972**
12963	**17795**	**29463**	**42010**	**42012**
42014	**43126**	**43657**	**45694**	**45700**
45701	**55781**	**64620**	**66426**	**72557**
82232	**85503**	**88494**	**88720**	**98047**
105599	**109186**	**131049**	**142791**	**156091**
164694	**169169**	**176158**	**186902**	**201707**
203800	**239369**	**255309**	**270907**	**281029**
295562	**303510**	**306121**	**306122**	**306123**
306124	**319666**	**333455**	**333743**	**333744**
334194	**334196**	**356554**	**372329**	**380458**
401551	**522230**	**522629**	**522630**	**522676**
526509	**608047**	**608048**	**608050**	**626995**
626996	**626997**	**627004**	**627210**	**627211**
646356	**648303**	**653950**	**674644**	**676456**
694094	**697588**	**702672**	**702684**	**709889**
717767	**722614**	**723272**	**723990**	**727676**
608052				

Σχήμα 7: Γραφική διεπιφάνεια Maestro της εταιρείας Schrödinger. Πολλές επιλογές εκτελούνται με χρήση των εικονιδίων ενώ μέσω των καταλόγων δίνεται η δυνατότητα πρόσβασης σε λογισμικά της εταιρίας (π.χ. Prime).

Σχήμα 8: Γραφική διεπιφάνεια LigandScout. Δίνεται η δυνατότητα πραγματοποίησης διαφορετικής φύσεως εργασιών στα τέσσερα τμήματα του λογισμικού. Εκτελείται δισδιάστατη και τρισδιάστατη απεικόνιση μορίων και οι βασικότερες εντολές υπάρχουν σε μορφή εικονιδίων προς διευκόλυνση του χρήστη.



ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1 E.A. Dennis, J. Cao, Y.-H. Hsu, V. Magrioti, G. Kokotos, Phospholipase A_2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention, Chem.Rev., 111 (2011) 6130-6185.

2 Διαδικτυακός χώρος: http://www.rcsb.org

3 A. Dessen, Structure and mechanism of human cytosolic phospholipase A_2, Biochimica et Biophysica Acta, 1488 (2000) 40-47.

4 A. Dessen, J. Tang, H. Schmidt, M. Stahl, J.D. Clark, J. Seehra, W.S. Somers, Crystal structure of human cytosolic phospholipase A_2 reveals a novel topology and catalytic mechanism, Cell, 97 (1999) 349-360.

5 S. Jaud, D. Tobias, J. Falke, S. White, Self-induced docking site of a deeply embedded peripheral membrane protein, Biophys. J., 92 (2007) 517-524.

6 Γ. Κόκοτος, "Σημειώσεις για το μάθημα Φαρμακοχημεία", Ε.Κ.Π.Α., ΑΘΗΝΑ, 2008.

7 Θ. Μαυρομούστακος, Π. Ζουμπουλάκης, "Μοριακή μοντελοποίηση, εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία", Ιατρικές Εκδόσεις Γ.Β.Παρισιάνος, 2008.

8 Β. Μούχλης, Ορθολογικός σχεδιασμός και σύνθεση αναστολέων φωσφολιπασών A_2, Διδακτορική Διατριβή, Ε.Κ.Π.Α., ΑΘΗΝΑ, 2010.

9 R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin, Glide: A new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy, J.Med.Chem., 47 (2004) 1739-1749.

10 Schrödinger, Glide User Manual, Schrödinger Press, 2010.

11 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/kb/348

12 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/kb/27

13 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/productpage/14/5/

14 R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, D.T. Mainz, Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes, J.Med.Chem., 49 (2006) 6177-6196.

15 Schrödinger, Virtual Screening Workflow, Schrödinger Suite 2012 Update 2, Schrödinger Press 2012.

16 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/kb/1386

17 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/productpage/14/17/

18 Διαδικτυακός χώρος :
http ://commons.wikimedia.org/wiki/File:Induced_fit_diagram.png

19 W. Sherman, T. Day, M.P. Jacobson, R.A. Friesner, R. Farid, Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects, J.Med.Chem., 49 (2006) 534-553.

20 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/productpage/14/6/

21 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/productpage/14/14/

22 P. Ehrlich, "Über den jetzigen Stand der Chemotherapie", Ber. Dtsch. Chem. Ges., 42 (1909) 17–47.

23 T. Langer, R.D. Hoffmann, Pharmacophores and pharmacophore searches, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.

24 Cramer R. D. III, D.E. Patterson, J.D. Bunce, Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins, J*. Am. Chem. Soc*. 110 (1988) 5959-5967.

25 G. Klebe, Comparative Molecular Similarity Indices Analysis: CoMSIA, Perspect. Drug Discov. Des., 12 (1998) 87-104.

26 H. Finch, The conformational musings of a medicinal chemist, *Drug Discov. Today*, [Epub ahead of print] 2013.

27 S.-Y. Yang, Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances, Drug Disc. Today, 15 (2010) 444-450.

28 E. Gregori-Puigjané, V. Setola, J. Hert, B.A. Crews, J.J. Irwin, E. Lounkine, L. Marnett, B.L. Roth, B.K. Shoichet, Identifying mechanism-of-action targets for drugs and probes, PNAS, 109 (2012) 11178-11183.

29 H.-J. Böhm, A novel computational tool for automated structure-based drug design, J. Mol. Recognit., 6 (1993) 131–137.

30 Διαδικτυακός χώρος: http://www.inteligand.com/ligandscout/manual/

31 H.-J. Boehm, M. Boehringer, D. Bur, H. Gmuender, W. Huber, W. Klaus, D. Kostrewa, H. Kuehne, T. Luebbers, N. Meunier-Keller, F. Mueller, Novel inhibitors of DNA Gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening, J. Med. Chem., 43 (2000) 2664-2674.

32 J.H. Hsieh, X.S. Wang, D. Teotico, A. Golbraikh, A. Tropsha, Differentiation of AmpC beta-lactamase binders vs. decoys using classification kNN QSAR modeling and application of the QSAR classifier to virtual screening, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 22 (2008) 593-609.

33 http://www.inteligand.com/ligandscout3/downloads/ligandscout-tutorial-cards.pdf

34 W.P. Walters, M.T. Stahl, M.A. Murcko, Virtual screening – an overview, *Drug Discov. Today,* 3 (1998) 160-178.

35 J. Irwin, B. Shoichet, ZINC-A free database of commercially available compounds for virtual screening, J. Chem. Inf. Model., 45 (2005) 177-182.

36 J.J. Irwin, T. Sterling, M.M. Mysinger, E.S. Bolstad, R.G. Coleman, ZINC: A free tool to discover chemistry for biology, J. Chem. Inf. Model., 52 (2012) 1757−1768.

37 Διαδικτυακός χώρος: http://wiki.uoft.bkslab.org/index.php/ZINC_Database

38 Διαδικτυακός χώρος: http://www.molecular-networks.com/products/corina

39 Διαδικτυακός χώρος: http://www.license.umn.edu/Products/AMSOL-71--Software-to-Calculate-Free-Energies-of-Solvation__Z05201.aspx

40 R. Wang, Y. Fu, L. Lai, A new atom-additive method for calculating partition coefficients, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 37 (1997) 615-621.

41 Mannhold R. (2006) Calculation of Lipophilicity: A classification of Methods, In: Testa B, Kramer S.D., Wunderli-Allenspach H., Folkers G. (Eds). Pharmacokinetic Profiling in Drug Research, Wiley, VCH, Zurich, pp 333-352.

42 D. E Clark, What has polar surface area ever done for drug discovery?, Fut. Med Chem., 3 (2011) 3469-3484.

43 C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Deliv. Rev., 46 (2001) 3-26.

44 A. Nicholls, G.B. McGaughey, R.P. Sheridan, A.C. Good, G. Warren, M. Mathieu, S.W. Muchmore, S.P. Brown, J.A. Grant, J.A. Haigh, N. Nevins, A.N. Jain, B. Kelley, Molecular shape and medicinal chemistry: a perspective, *J. Med. Chem.*, 53 (2010) 3862-3886.

45 Διαδικτυακός χώρος: http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties

46 Διαδικτυακός χώρος: http://www.molinspiration.com/services/properties.html

47 Διαδικτυακός χώρος: http://www.molinspiration.com/services/volume.html

48 Διαδικτυακός χώρος: http://www.molinspiration.com/docu/miscreen/druglikeness.html

49 Διαδικτυακός χώρος: http://www.molinspiration.com/docu/miscreen/virtualscreening.html

50 Διαδικτυακός χώρος: http://dtp.nci.nih.gov/docs/3d_database/stats/trendv.html

51 Διαδικτυακός χώρος: http://cactus.nci.nih.gov/download/nci/

52 Διαδικτυακός χώρος: http://dtp.nci.nih.gov/docs/3d_database/dis3d.html

53 Διαδικτυακός χώρος: http://www.maybridge.com/portal/alias__Rainbow/lang__en/tabID__229/DesktopDefault.aspx

54 Διαδικτυακός χώρος: http://htc.wustl.edu/collections.html

55 Διαδικτυακός χώρος: http://en.wikipedia.org/wiki/PubChem

56 Schrödinger, Maestro 9.0 Tutorial, Schrödinger Press, 2009.

57 Schrödinger, Protein Preparation Guide, Schrödinger Suite 2009, Schrödinger Press.

58 R.T. Pickard, X. Grace Chiou, B.A. Strifler, M.R. DeFelippis, P.A. Hyslop, A. Louise Tebbe, Y.K. Yee, L.J. Reynolds, E.A. Dennis, R.M. Kramer, J.D. Sharp, Identification of essential residues fo the catalytic function of 85-kDa cytosolic phospholipase A_2, J.Biol.Chem., 271 (1996) 19225-19231.

59 Schrödinger, LigPrep 2.4 User Manual, Schrödinger Press, 2010.

60 Y. Connolly Martin, Let's not forget tautomers, J. Comput. Aided Mol. Des., 23 (2009) 693–704.

61 Schrödinger, MacroModel 9.8 User Manual, Schrödinger Press, 2010.

62 Schrödinger, Maestro 9.1 User Manual, Schrödinger Press, 2010.

63 Schrödinger, Induced Fit Docking Schrödinger Suite 2010, Schrödinger Press, 2010.

64 Θ. Μαυρομούστακος, Κ. Παπακωνσταντίνου, Θ. Τσέλιος, "Αρχές Οργανικής Χημείας", Υπό έκδοση.

65 J.C. McKew, F. Lovering, J.D. Clark, J. Bemis, Y. Xiang, M. Shen, W. Zhang, J.C. Alvarez, D. Joseph-McCarthy, Structure-activity relationships of indole cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ inhibitors: substrate mimetics, Bioorg.Med.Chem.Lett., 13 (2003) 4501-4504.

66 A. Gopalsamy, H. Yang, J.W. Ellingboe, J.C. McKew, S. Tam, D. Joseph-McCarthy, W. Zhang, M. Shen, J.D. Clark, 1,2,4-Oxadiazolidin-3,5-diones and 1,3,5-triazin-2,4,6-triones as cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ inhibitors, Bioorg.Med.Chem.Lett., 16 (2006) 2978-2981.

67 V.D. Mouchlis, E. Barbayianni, T.M. Mavromoustakos, G. Kokotos, The application of rational design on phospholipase A_2 inhibitors, Current Medicinal Chemistry, 18 (2011) 2566-2582.

68 J.E. Burke, A. Babakhani, A.A. Gorfe, G. Kokotos, S. Li, V.L. Woods Jr., J. Andrew McCammon, E.A. Dennis, Location of inhibitors bound to group IVA phospholipase A_2 determined by molecular dynamics and deuterium exchange mass spectrometry, J. Am. Chem. Soc., 131 (2009) 8083–8091.

69 V.D. Mouchlis, V. Michopoulou, V. Constantinou-Kokotou, T. Mavromoustakos, E.A. Dennis, G. Kokotos, Binding conformation of 2-oxoamide inhibitors to group IVA cytosolic phospholipase A_2 determined by molecular docking combined with molecular dynamics, J. Chem. Inf. Model, 52 (2012) 243-254.

70 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/kb/739

71 J.E. Burke, Y.-H. Hsu, R.A. Deems, S. Li, V.L. Woods Jr, E.A. Dennis, A phospholipid substrate molecule residing in the membrane surface mediates opening of the lid region in group IVA cytosolic phospholipase A_2, J.Biol. Chem., 283 (2008) 31227-31236.

72 Y. Lin, R. Nielsen, D. Murray, W.L. Hubbell, C. Mailer, B.H. Robinson, M.H. Gelb, Docking phospholipase A_2 on membranes using electrostatic potential-modulated spin relaxation magnetic resonance, Science, 279 (1998) 1925-1929.

73 L.A. Trimble, I.P. Street, H. Perrier, N.M. Tremblay, P.K. Weech, M.A. Bernstein, NMR Structural studies of the tight complex between a trifluoromethyl ketone inhibitor and the 85-kDa human phospholipase A_2, Biochemistry, 32 (1993) 12560-12565.

74 E. Barbayianni, D. Stephens, A. Grkovich, V. Magrioti, Y.-H. Hsu, P. Dolatzas, D. Kalogiannidis, E.A. Dennis, G. Kokotos, 2-Oxoamide inhibitors of phospholipase A2 activity and cellular arachidonate release based on dipeptides and pseudodipeptides, Bioorg.Med.Chem., 17 (2009) 4833-4843.

75 C. Baskakis, V. Magrioti, N. Cotton, D. Stephens, V. Constantinou-Kokotou, E.A. Dennis, G. Kokotos, Synthesis of polyfluoro ketones for selective inhibition of human phospholipase A_2 enzymes, J.Med.Chem., 51 (2008) 8027-8037.

76 D. Stephens, E. Barbayianni, V. Constantinou-Kokotou, A. Peristeraki, D.A. Six, J. Cooper, R. Harkewicz, R.A. Deems, E.A. Dennis, G. Kokotos, Differential inhibition of group IVA and group VIA phospholipases A_2 by 2-Oxoamides, J.Med.Chem., 49 (2006) 2821-2828.

77 G. Antonopoulou, V. Magrioti, D. Stephens, V. Constantinou-Kokotou, E.A. Dennis, G. Kokotos, Synthesis of 2-oxoamides based on sulfonamide analogs of γ-amino acids and their activity on phospholipase A_2, J.Pept.Sci., 14 (2008) 1111-1120.

78 D. Six, E. Barbayianni, V. Loukas, V. Constantinou-Kokotou, D. Hadjipavlou-Litina, D. Stephens, A.C. Wong, V. Magrioti, P. Moutevelis-Minakakis, S.F. Baker, E.A. Dennis, G. Kokotos, Structure-activity relationship of 2-Oxoamide inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A_2 and group V secreted phospholipase A_2, J.Med.Chem., 50 (2007) 4222-4235.

79 E. Amandi-Burgermeister, U. Tibes, B.M. Kaiser, W.G. Friebe, W.V. Scheuer, Suppression of cytokine synthesis, integrin expression and chronic inflammation by inhibitors of cytosolic phospholipase A_2, Eur. J. of Pharmacol., 326 (1997) 237-250.

80 Β. Μαγκριώτη, "Ενώσεις με Φαρμακολογικό Ενδιαφέρον", Σημειώσεις για το διαπανεπιστημιακό μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών «Οργανική Σύνθεση και Εφαρμογές στη Χημική Βιομηχανία», Ε.Κ.Π.Α., ΑΘΗΝΑ, 2012.

81 K.N. Sudha, M. Shakira, P. Prasanthi, N. Sarika, C.N. Kumar, P.A. Babu, Virtual screening for novel COX-2 inhibitors using the ZINC database, Bioinformation, 2 (2008) 325-329.

82 G. Kokotos, S. Kotsovolou, D.A. Six, V. Constantinou-Kokotou, C.C. Beltzner, E.A. Dennis, Novel 2-Oxoamide Inhibitors of human group IVA Phospholipase A_2**,** J. Med. Chem*., 45 (*2002) 2891-2893.

83 Διαδικτυακός χώρος: http://zinc.docking.org/

84 Διαδικτυακός χώρος: http://www.drugbank.ca/drugs/DB03424

85 Διαδικτυακός χώρος: https://www.ebi.ac.uk/chembldb/index.php/compound/inspect/CHEMBL2103812

86 Διαδικτυακός χώρος: http://www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=617379

87 Διαδικτυακός χώρος: http://www.drugbank.ca/drugs/DB00168

88 S. Pradhan, U.H. Shah, A.G. Mathur, S. Sharma, Aspartame: Sweetener with anti-inflammatory potential? J.Pharmacol.Pharmacother., 1 (2010) 113-114.

89 Διαδικτυακός χώρος: http://www.molinspiration.com/

90 Διαδικτυακός χώρος: http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp

91 D. Bermudez-Ocana, H. Aguilar-Mariscal, T. Ramon Frias, J.L. Ble-Castillo, F.J. Flores-Murrieta, J.C. Diaz-Zagoya, V. Granados-Soto, I.-E. Juarez-Rojop, Proglumide enhances the antinociceptive effect of cyclooxygenase inhibitors in diabetic rats in the formalin test, Eur. J.Pharmacol., 664 (2011) 8-13.

92 Z.P. Bernstein, S. Yucht, E. Battista, M. Lema, M.B. Spaulding, Proglumide as a morphine adjunct in cancer pain management, J. Pain Symptom Manage., 15 (1998) 314-320.

93 G.J. McCleane, The cholecystokinin antagonist proglumide enhances the analgesic efficacy of morphine in humans with chronic benign pain, Anesth Analg., 87 (1998) 1117-1120.

94 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/kb/1382

95 Διαδικτυακός χώρος: http://www.schrodinger.com/kb/616

96 S.M. Noha, B. Jazzar, S. Kuehnl, J.M. Rollinger, H. Stuppner, A.M. Schaible, O. Werz, G. Wolber, D. Schuster, Pharmacophore-based

discovery of a novel cytosolic phospholipase $A_2\alpha$ inhibitor, Bioorg. Med. Chem. Lett., 22 (2012) 1202-1207.

97 R.D. Urniaz, K. Jóźwiak, X ray Crystallographic Structures as a Source of Ligand Alignment in 3D-QSAR, J. Chem. Inf. Model., 53 (2013) 1406–1414.