



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»

Τριδιάστατες Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης (3D-QSAR)
Συζευγμάτων Ενώσεων Αμανταδίνης με Πολική Κεφαλή ως
Αναστολείς της Πρωτεΐνης M2 του Ιού *Influenza A*

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΜΟΣΧΟΒΟΥ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Τριδιάστατες Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης (3D-QSAR)
Συζευγμάτων Ενώσεων Αμανταδίνης με Πολική Κεφαλή ως
Αναστολείς της Πρωτεΐνης M2 του Ιού *Influenza A*

ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΜΟΣΧΟΒΟΥ

A.M.: 161505

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Αντώνιος Κολοκούρης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Γεωργία Μελαγράκη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΣΣΕ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 17/10/201

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Θωμά Μαυρομούστακο, για την ανάθεση του ερευνητικού θέματος, την πολύτιμη επίβλεψή του σε όλα τα στάδια της παρούσας μελέτης, το συνεχές ενδιαφέρον του αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου στον Αναπληρωτή Καθηγητή Αντώνιο Κολοκούρη, για την καθοδήγηση και τις σημαντικές συμβουλές του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Το θέμα της μεταπτυχιακής εργασίας σχετίζεται με ερευνητική δραστηριότητα, η οποία διεξάγεται στο εργαστήριο του.

Επίσης, ευχαριστώ το μέλος της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου, την Επίκουρη Καθηγήτρια Γεωργία Μελαγράκη για τη βοήθεια και την προθυμία να διορθώσει και να επιμεληθεί την παρούσα εργασία.

Θερμά ευχαριστώ τους Καθηγητές του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την ευκαιρία που μου έδωσαν να φοιτήσω στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Οργανική Σύνθεση και Εφαρμογές στη Χημική Βιομηχανία». Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Καθηγήτρια Παναγιώτα Μουτεβέλη-Μηνακάκη για την πολύτιμη βοήθειά της.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρα. Βροντάκη Ελένη, για τη βοήθεια που απλόχερα μου προσέφερε για την εκμάθηση των υπολογιστικών τεχνικών στα διάφορα υπολογιστικά πακέτα που είναι διαθέσιμα στο εργαστήριο αλλά και για τις εξαιρετικές συμβουλές της.

Ακόμη, ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημείας για την ευχάριστη ατμόσφαιρα στην οποία εργάστηκα. Ευχαριστώ και τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Υπολογιστικής Χημείας του τμήματος Φαρμακευτικής για τη βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος, ένα μεγάλο «ευχαριστώ» στη μητέρα μου και την αδερφή μου, για την κατανόηση, συμπαράσταση και στήριξη που μου προσφέρουν σε κάθε μου επιλογή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας ήταν η *in silico* εύρεση νέων φαρμακευτικών ενώσεων κατά του ιού της *Influenza A*.

Ο ιός της *Influenza A* αποτελεί μια από τις συχνότερες αιτίες αναπνευστικών λοιμώξεων στον άνθρωπο, οι οποίες μπορεί να λάβουν τη μορφή πανδημίας με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας. Η αμανταδίνη ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του '60, ήταν το πρώτο αμινο-αδαμαντανικό ανάλογο που χρησιμοποιήθηκε ως αναστολέας του ιοντικού διαύλου της μεμβρανικής πρωτεΐνης M2. Η ριμανταδίνη άρχισε να χρησιμοποιείται τη δεκαετία του '80. Από τη δεκαετία του 2010 και μετά, η εμφάνιση μεταλλάξεων, και κυρίως η μετάλλαξη S31N, προκάλεσε αντοχή στα συγκεκριμένα φάρμακα, με αποτέλεσμα η εύρεση νέων συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή να καθίσταται ενδιαφέρον πεδίο έρευνας. Προς το παρόν οι αναστολείς της νευραμιδάσης είναι η μόνη κατηγορία αντιγριπικών φαρμάκων που διατίθεται. Μια έντονη ερευνητική προσπάθεια από κάποιες ομάδες κατέληξε στη εύρεση της δομής συζευγμάτων ενώσεων αποτελούμενες από την αμανταδίνη και συνήθως ένα πολικό ετερόκυκλο, τα οποία συνδέονται με μια γέφυρα μεθυλενίου. Οι ενώσεις αυτές ήταν δραστικές έναντι των ιών άγριου τύπου (wild type, WT) και του μεταλλαγμένου S31N. Το δείγμα των ενώσεων αυτών και οι δραστηριότητες έναντι του ιού άγριου τύπου χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τον έλεγχο του σχεδιασμού νέων ενώσεων έναντι του ιού της *Influenza A* άγριου τύπου.

Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε συνδυασμός μοριακής πρόσδεσης με τις ποσοτικές σχέσεις δομής-δράσης τριών διαστάσεων (3D-QSAR), με στόχο την εύρεση νέων, βελτιωμένων συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή, ως αναστολείς του άγριου τύπου του ιού της *Influenza A*. Πραγματοποιήθηκε μελέτη Ποσοτικών Σχέσεων Δομής – Δράσης με βάση τη δομή του προσδέτη στην πειραματική δομή (ligand-based drug design), όπου προέκυψαν δύο επικυρωμένα μοντέλα 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε ελαχιστοποίηση ενέργειας 38 συζευγμάτων ενώσεων μεταξύ ενός αμινο-αδαμαντανικού παραγώγου και ενός ετεροκυκλικού μορίου. Οι ενώσεις αυτές είναι αναστολείς του ιοντικού διαύλου

M2/WT. Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των παραγώγων και παραγωγή των πεδίων CoMFA και CoMSIA. Τελικά, δημιουργήθηκαν δύο επικυρωμένα μοντέλα 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA. Η ροή εργασίας που ακολουθήθηκε μας έδωσε πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά που πρέπει να φέρει ένας αναστολέας του ιοντικού διαύλου της πρωτεΐνης M2/WT. Τα ληφθέντα *in silico* μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη βιολογικής δραστηριότητας νέων συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή, τα οποία περιλαμβάνουν την αμανταδίνη συνδεδεμένη με μια πολική ομάδα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις *in silico* μελέτες επιβεβαίωσαν τα *in vitro* πειράματα αναστολής του ιού *Influenza A* WT από τα νέα παράγωγα. Ακόμη, προτείνεται η σύνθεση των *R* εναντιομερών καθώς προβλέπεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα έναντι του ιού της *Influenza A* WT.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ιός της *Influenza A*, Μοριακή Μοντελοποίηση, Μοριακή Πρόσδεση, 3D-QSAR, CoMFA/CoMSIA.

ABSTRACT

The aim of the present thesis was the *in silico* identification of new compounds against the *influenza A* virus.

Influenza A virus is one of the most common causes of respiratory infections in humans, which may take the form of a pandemic with increased mortality rates. Amantadine was discovered in the 1960s, it was the first amino-adamantan analogue used as an ion channel inhibitor of the membrane protein M2. Rimantadine was used in the 1980s. Since the decade of 2010, the emergence of mutations, particularly the S31N mutation, has prompted resistance to these drugs, resulting in the finding of new conjugates of amantadine compounds with a polar head becoming an interesting field of research. Currently, neuraminidase inhibitors are the only class of drugs available. An intense research effort by some groups has resulted in finding the structure of compound conjugates composed of amantadine and usually a polar heterocycle linked to a methylene bridge. These compounds were active against wild type viruses (wild type, WT) and mutant S31N. The sample of these compounds and wild-type virus activities were used in the present study to control the design of novel compounds against the wild-type influenza A virus.

In the present study a combination of molecular binding with 3D dimensional structure-action relationships (3D-QSAR) was attempted to find new, improved conjugates of polar head amantadine compounds as inhibitors of the wild type of *influenza A* virus. Structure-based ligand-based drug design, where two validated 3D-QSAR CoMFA and CoMSIA models emerged. Firstly, energy minimization of 38 conjugates of compounds was performed between an amino-adamantane derivative and a heterocyclic molecule. These compounds are inhibitors of the ion channel M2/WT. Secondly, alignment of derivatives and creation of the CoMFA and CoMSIA fields was carried out. Finally, two validated 3D-QSAR CoMFA and CoMSIA models were created. The workflow followed gave us information on the structural characteristics that an ion-channel blocker of the M2 / WT protein must bring. The silico-derived models were used to predict biological activity of new polar head amantadine compound conjugates comprising amantadine attached to a polar group.

Results from in silico studies confirmed the in vitro *influenza A*/WT virus inhibition experiments from the new derivatives. Furthermore, the synthesis of R enantiomers is proposed as they are expected to exhibit greater biological activity against the *Influenza A* WT virus.

SUBJECT AREA: Ligand Based Rational Drug Design

KEYWORDS: *Influenza A* Virus, Molecular Modeling, 3D-QSAR, CoMFA/CoMSIA.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	16
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Ο ΙΟΣ ΤΗΣ <i>INFLUENZA A</i>	17
1.1 Ιστορική αναδρομή – Επιδημιολογία.....	17
1.2 Ταξινόμηση του ιού <i>Influenza A</i>	20
1.3 Δομή του ιού <i>Influenza A</i>	23
1.3.1 Βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης , PB1.....	24
1.3.2 Βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 2, PB2.....	24
1.3.3 Όξινη πρωτεΐνη της πολυμεράσης, PA.....	25
1.3.4 Αιμοσυγκολλητίνη, HA.....	25
1.3.5 Νουκλεοπρωτεΐνη, NP.....	25
1.3.6 Νευραμινιδάση, NA.....	25
1.3.7 Μεμβρανικές πρωτεΐνες M1 και M2.....	26
1.3.8 Μη δομικές πρωτεΐνες NS1 και NS2.....	26
1.4 Ιικός κύκλος της <i>Influenza A</i>	28
1.5 Χημειοθεραπεία κατά του ιού της <i>Influenza A</i>	29
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 Ο ΙΟΝΤΙΚΟΣ ΔΙΑΥΛΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ <i>INFLUENZA A/M2</i>	31
2.1 Ιοντικός δίαυλος.....	31
2.2 Ο ιοντικός δίαυλος του ιού της <i>Influenza A/M2</i>	32
2.2.1 Επίδραση του pH.....	34
2.2.2 Ο ρόλος των πολικών αμινοξέων στην αγωγιμότητα πρωτονίων.....	34
2.2.3 Μηχανισμός αγωγιμότητας πρωτονίων – Μηχανισμός Grotthuss.....	37
2.3 Αμανταδίνη – Ριμανταδίνη.....	38
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ	41
3.1 Η πορεία μιας ένωσης ως φάρμακο στην αγορά.....	41
3.2 Μοριακή Μοντελοποίηση.....	43
3.2.1 Σχεδιασμός διδιάστατων και τριδιάστατων δομών.....	45
3.2.2 Ελαχιστοποίηση ενέργειας	46
3.3 Επιπλέον εργαλεία προετοιμασίας δομών.....	47
3.4 Μοριακή Πρόσδεση.....	49

3.4.1	Αλγόριθμοι μοριακής πρόσδεσης.....	51
3.4.1.1	Αλγόριθμοι Monte Carlo	51
3.4.1.2	Αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής.....	51
3.4.1.3	Γενετικοί Αλγόριθμοι.....	51
3.4.2	Ο αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης GLIDE.....	52
3.5	Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης.....	56
3.5.1.	Ιστορική αναδρομή.....	57
3.5.2	Ανάλυση Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης, QSAR.....	59
3.5.3	Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης τριών διαστάσεων	60
3.5.4	Οι μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA.....	60
3.5.4.1	Ανάλυση των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων	64
3.5.4.2	Επικύρωση του μοντέλου 3D-QSAR.....	66
3.5.5	Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης τεσσάρων διαστάσεων.....	67
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	69
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <i>IN SILICO</i> ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	
	ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΜΕ ΠΟΛΙΚΗ ΚΕΦΑΛΗ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ	
	ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ <i>INFLUENZA A</i>	71
4.1	Εισαγωγή.....	71
4.2	Επιλογή και προετοιμασία της πρωτεΐνης M2.....	72
4.3	Σχεδιασμός και προετοιμασία των αναστολέων.....	75
4.4	Μοριακή πρόσδεση με τη χρήση του αλγορίθμου GLIDE.....	78
4.5	Ανάπτυξη μοντέλου 3D-QSAR.....	80
4.5.1	Ομάδες δεδομένων – Ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου.....	80
4.5.2	Ευθυγράμμιση της ομάδας δεδομένων.....	82
4.5.3	Ανάλυση των μεθοδολογιών CoMFA και CoMSIA.....	83
4.5.3.1	Ανάλυση μεθοδολογίας CoMFA.....	83
4.5.3.2	Ανάλυση μεθοδολογίας CoMSIA.....	85
4.5.4	Επικύρωση των μοντέλων 3D-QSAR CoMFA και 3D-CoMSIA.....	87
4.5.5	Ισοϋψείς χάρτες CoMFA και CoMSIA.....	90
4.5.5.1	Ισοϋψείς χάρτες CoMFA.....	90
4.5.5.2	Ισοϋψείς χάρτες CoMSIA.....	92

4.6 Έλεγχος δραστικότητας νέων συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης-πολικής κεφαλής με τη χρήση των μοντέλων 3D-QSAR, CoMFA και CoMSIA.....	94
4.7 Σύγκριση μοντέλων CoMFA/CoMSIA.....	98
4.8 Συμπεράσματα.....	99
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	101
5. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	103
6. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	107
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	111
8. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	113

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Πανδημίες της γρίπης από το 1889μ.Χ. έως το 2009μ.Χ.	19
Σχήμα 1.2: Παράδειγμα ονοματολογίας του ιού της γρίπης.....	22
Σχήμα 1.3: Η δομή του ιού της Influenza A.....	23
Σχήμα 1.4: Τα στάδια αναπαραγωγής του ιού της Influenza A.....	29
Σχήμα 2.1: Σχηματική απεικόνιση ανοικτού και κλειστού ιοντικού διαύλου.....	31
Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης του ιοντικού διαύλου της M2.....	34
Σχήμα 2.3: Ο μηχανισμός Grotthuss στο ύδωρ.....	38
Σχήμα 2.4: Οι μοριακές δομές της αμανταδίνης και ριμανταδίνης.....	39
Σχήμα 2.5: Συνοπτική παράσταση μηχανισμού δράσης της αμανταδίνης ως αναστολέας του ιοντικού διαύλου της M2.....	39
Σχήμα 3.1: Πορεία του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμακευτικών μορίων.....	43
Σχήμα 3.2: Στάδια μελέτης των μορίων που λαμβάνουν μέρος στην μοριακή πρόσδεση ή/και το QSAR.....	45
Σχήμα 3.3: Η μετατροπή της διδιάστατης δομής της αμανταδίνης και ριμανταδίνης στην τριδιάστατη.....	46
Σχήμα 3.4: Αυτοματοποιημένα βήματα της εφαρμογής Protein Preparation Wizard.....	48
Σχήμα 3.5: Τα αυτοματοποιημένα βήματα της εφαρμογής LigPrep.....	49
Σχήμα 3.6: Προσδιορισμός των περιοχών πυρήνα και των περιστρεφόμενων ομάδων.....	53
Σχήμα 3.7: Τα στάδια αξιολόγησης προσδετών με τη χρήση του αλγορίθμου GLIDE.....	54
Σχήμα 3.8: Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται από τον εντοπισμό του στόχου έως την ανακάλυψη νέων φαρμάκων.....	57
Σχήμα 3.9: Οι κατηγορίες των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης.....	59
Σχήμα 3.10: Ευθυγράμμιση (Alignment) 65 αδαμαντανικών αναλόγων για την 3D-QSAR μελέτη.....	62
Σχήμα 3.11: Αναπαράσταση αποτελεσμάτων ανάλυσης CoMFA με τη χρήση τριδιάστατων ισοϋψών χαρτών (3D contour maps).....	64

Σχήμα 3.12: Τα βήματα που ακολουθούνται για την ανάπτυξη μοντέλων 4D-QSAR.....	68
Σχήμα 4.1: Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στην συγκεκριμένη περίπτωση.....	72
Σχήμα 4.2: Ο λανθασμένος προσανατολισμός της αμινομάδας της αδαμαντίνης προς το N-τελικό άκρο και ο ορθός προσανατολισμός αυτής προς το C-τελικό άκρο.....	73
Σχήμα 4.3: Το αποτέλεσμα της υπέρθεσης των δύο δομών.....	78
Σχήμα 4.4: Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης μέσω GLIDE.....	79
Σχήμα 4.5: Το ικρίωμα που επιλέχθηκε με τα κοινά δέκα άτομα.....	82
Σχήμα 4.6: Το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης των 38 ενώσεων που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του μοντέλου CoMFA και CoMSIA βασισμένο στη δραστική ένωση 1.....	83
Σχήμα 4.7: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών για το μοντέλο CoMFA, τόσο για την ομάδα εκμάθησης όσο και για την ομάδα ελέγχου.....	85
Σχήμα 4.8: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών για το μοντέλο CoMSIA, τόσο για την ομάδα εκμάθησης όσο και για την ομάδα ελέγχου.....	87
Σχήμα 4.9: Οι ισοϋψείς χάρτες $StDev * Coeff$ των πεδίων CoMFA για την δραστική ένωση 29.....	91
Σχήμα 4.10: Οι ισοϋψείς χάρτες $StDev * Coeff$ των πεδίων CoMSIA για τη δραστική ένωση 29.....	93

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Ο ιός της γρίπης όπως παρατηρείται από το μικροσκόπιο.....	17
Εικόνα 1.2: Ο ιός της Influenza A.....	21
Εικόνα 2.1: Ο ομοτετραμερής πόρος της διαμεμβρανικής περιοχής της M2.....	32
Εικόνα 2.2: Η θέση της H37 και της W41 στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες της M2.....	35

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Συγκεντρωτικός πίνακας των γονιδίων του ιού της γρίπης Α, οι θέσεις τους στο ιικό σωματίδιο και οι λειτουργίες τους.....	27
Πίνακας 3.1 Καταμερισμός κόστους ανά ένωση σε κάθε πείραμα.....	41
Πίνακας 4.1 Οι μοριακές δομές των 38 συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης και οι πειραματικές τιμές αναστολής της M2/WT.....	75
Πίνακας 4.2 Οι πειραματικές τιμές (% x 10 ⁻²) και οι προβλεπόμενες CoMFA & CoMSIA από το μοντέλο τιμές για τα 38 συζεύγματα ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή.....	81
Πίνακας 4.3 Τα στατιστικά αποτελέσματα του μοντέλου CoMFA.....	84
Πίνακας 4.4 Τα στατιστικά αποτελέσματα του μοντέλου CoMSIA.....	86
Πίνακας 4.5 Κριτήρια αποδοχής μοντέλου για τη μεθοδολογία CoMFA με χρήση του κόμβου Enalos KNIME.....	89
Πίνακας 4.6 Κριτήρια αποδοχής μοντέλου για τη μεθοδολογία CoMSIA με χρήση του κόμβου Enalos KNIME.....	89
Πίνακας 4.7 Οι μοριακές δομές των οκτώ αδαμαντανικών αναλόγων που αξιολογήθηκαν με τη χρήση των μοντέλων 3D-QSAR.....	95
Πίνακας 4.8 Οι προβλεπόμενες τιμές των συζευγμάτων αμανταδίνης με πολική κεφαλή λαμβάνοντας υπόψη τη στερεοχημεία, με χρήση των μοντέλων 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA.....	97

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

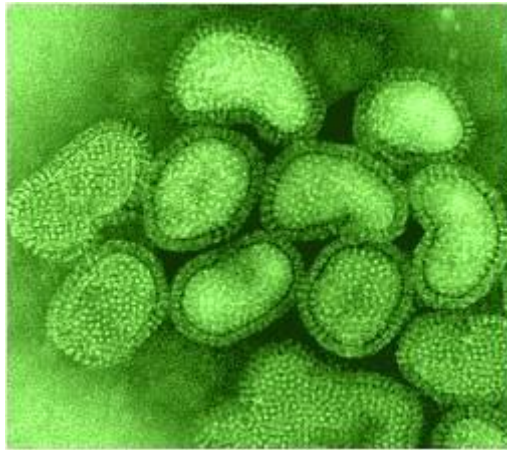
Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διαπανεπιστημιακού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Οργανική Σύνθεση και Εφαρμογές στη Χημική Βιομηχανία» που οργανώνει το Τμήμα Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα *in silico* πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Μοντελοποίησης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακου κατά τη χρονική διάρκεια του Μαρτίου 2017 έως τον Σεπτέμβριο του 2018.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Ο ΙΟΣ ΤΗΣ *INFLUENZA* A

1.1 Ιστορική αναδρομή – Επιδημιολογία

Οι ιοί της γρίπης (Εικόνα 1.1) αποτελούν μια από τις συχνότερες αιτίες αναπνευστικών λοιμώξεων στον άνθρωπο με παγκόσμια σημασία καθώς εμφανίζουν τη μοναδική ικανότητα να προκαλούν εποχικές επιδημίες, οι οποίες ποικίλλουν ως προς τη βαρύτητα και την ένταση, αλλά και πανδημίες με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας.¹



Εικόνα 1.1 Ο ιός της γρίπης όπως φαίνεται από το μικροσκόπιο.³⁰

Ο διεθνής όρος *influenza* προέρχεται από το λατινικό «*influentia*» που σημαίνει επιρροή και οφείλεται στην πεποίθηση της τότε εποχής ότι η νόσος ήταν το αποτέλεσμα της επίδρασης των άστρων στον άνθρωπο.¹ Η ελληνική ονομασία της νόσου, γρίπη, προέρχεται από τη γοτθική λέξη *gripan* (αγγλικά *gripe*) που σημαίνει αρπάζω απότομα.¹ Επίσης, αγγλικά χρησιμοποιείται και ο όρος *flu*.²

Η κλινική εικόνα της γρίπης με την αιφνίδια εμφάνιση αναπνευστικής νόσου, η οποία διαρκεί λίγες εβδομάδες αλλά και την επίσης αιφνίδια υποχώρησή της, την καθιστά εξαιρετικά χαρακτηριστική ώστε να επιτρέπει την αναγνώριση αρκετών επιδημιών του παρελθόντος.¹ Ήδη το 412 π.Χ. ο Ιπποκράτης αναφέρει μια τέτοιου είδους επιδημία αλλά η πρώτη αξιόπιστη αναφορά στον ιό της γρίπης πραγματοποιήθηκε το 1694 από τον Molineux. Εργαστηριακά, ο

ιός της γρίπης απομονώθηκε το 1933 από τους Smith, Andrews, Laidlaw δίνοντας την αρχή για την περαιτέρω μελέτη του ιού.⁶

Ο ιός της γρίπης προσβάλλει σε παγκόσμιο επίπεδο τον πληθυσμό και συνήθως προκαλεί περιορισμένες ή εκτεταμένες επιδημίες, οι οποίες παρατηρούνται στις περισσότερες χώρες σχεδόν κάθε χρόνο. Σε περίοδο επιδημίας μπορεί να προσβληθεί περίπου το 10% του πληθυσμού, εκ του οποίου το 50% θα αναπτύξει συμπτώματα και θα σημειωθεί αύξηση του ποσοστού των θανάτων. Η συχνότητα των μεγάλων επιδημιών είναι περίπου κάθε 2-5 χρόνια. Ελλοχεύει πάντα ο κίνδυνος μια επιδημία να πάρει διαστάσεις πανδημίας.

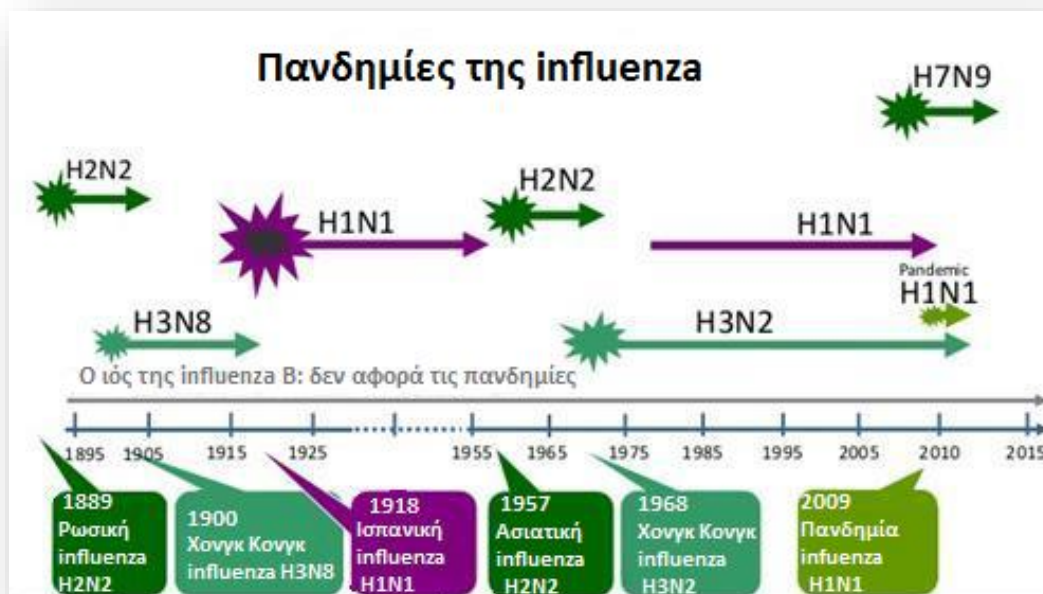
Μια επιδημία γρίπης χαρακτηρίζεται ως πανδημία όταν πληρούνται οι ακόλουθες δύο προϋποθέσεις. Πρώτον, το κύμα γρίπης ξεκινά από μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή και εξαπλώνεται σε όλον τον κόσμο, προσβάλλοντας υψηλό ποσοστό του πληθυσμού και αυξάνοντας το δείκτη θνησιμότητας. Δεύτερον, η νόσος πρέπει να έχει προκληθεί από ένα καινούριο στέλεχος του ιού, το οποίο δεν έχει εμφανιστεί μέχρι στιγμής.^{7, 8}

Η πρώτη πανδημία εμφανίστηκε το καλοκαίρι του 1580 ξεκινώντας από την Ασία και σε διάρκεια έξι μηνών έφτασε έως την Αμερική. Ακολούθησαν αρκετές πανδημίες γρίπης ανά τους αιώνες με πιο σημαντική αυτή του 1918.

Η πανδημία της γρίπης του 1918 – 1920, γνωστή και ως «Ισπανική Γρίπη» αποτελεί ένα από τα πιο δραματικά γεγονότα στην ιστορία της Ιατρικής. Αξίζει να σημειωθεί ότι περισσότεροι άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους σε ένα μόνο έτος από ότι σε τέσσερα έτη της μαύρης θανατηφόρας πανώλης το 1347 έως το 1351. Η προέλευση της δεν είναι γνωστή, πιθανολογείται ότι ξεκίνησε το 1918 από την Κίνα. Η γρίπη ήταν πιο θανατηφόρα για άτομα ηλικίας 20 έως 40 ετών. Αυτό το μοτίβο νοσηρότητας ήταν ασυνήθιστο για τη γρίπη, η οποία συνήθως ευθύνεται για το θάνατο ηλικιωμένων και μικρών παιδιών. Η πανδημία εμφάνισε δύο και σε μερικές χώρες τρία κύματα, αναφέρεται ότι προσβλήθηκε το 50% του πληθυσμού παγκοσμίως, το 25% εμφάνισε κλινικά τη νόσο και η θνησιμότητα ήταν 40-50 εκατομμύρια, αριθμός που στην πραγματικότητα υπήρξε κατά πολύ μεγαλύτερος.^{1, 9}

Η επόμενη πανδημία εμφανίζεται το 1957 στην Κίνα, γι' αυτό και ονομάζεται «Ασιατική Γρίπη». Μέσα σε έξι μήνες είχε εξαπλωθεί παγκοσμίως, προσβάλλοντας το 40-50% του πληθυσμού και προκαλώντας τον θάνατο ενός εκατομμυρίου ατόμων κυρίως παιδιών και ηλικιωμένων. Υπεύθυνος για αυτή την πανδημία ήταν ο ιός της Influenza A, υπότυπου H2N2.¹

Το 1968 παρουσιάστηκε πανδημία που οφειλόταν στον αντιγονικό υπότυπο H3N2, γνωστή και ως «Γρίπη του Χονγκ Κονγκ», προκαλώντας 34.000 θανάτους στις ΗΠΑ. Μεγάλη αναστάτωση προκάλεσε το 1997 στο Χονγκ Κονγκ ο υπότυπος H5N1, ο οποίος ήταν υπεύθυνος για την γνωστή «Γρίπη των πτηνών», το συγκεκριμένο στέλεχος κυκλοφορούσε μόνο ανάμεσα στα πτηνά, πιθανότατα όμως μετά από ανασυνδυασμό των γονιδίων του με ανθρώπινα γονίδια έκανε την εμφάνισή του στους ανθρώπους.¹⁰ Πιο σύγχρονα, τον Απρίλιο του 2009 ένα νέο στέλεχος του υπότυπου H1N1 απείλησε την παγκόσμια υγεία προκαλώντας μια νέα πανδημία, την αποκαλούμενη «Γρίπη των χοίρων» με 10.000 θανάτους.^{3, 11} Οι πανδημίες της γρίπης από το 1889 έως το 2009 περιγράφονται συγκεντρωτικά στο Σχήμα 1.1.



Σχήμα 1.1. Πανδημίες της γρίπης από το 1889 μ.Χ. έως το 2009 μ.Χ.³³

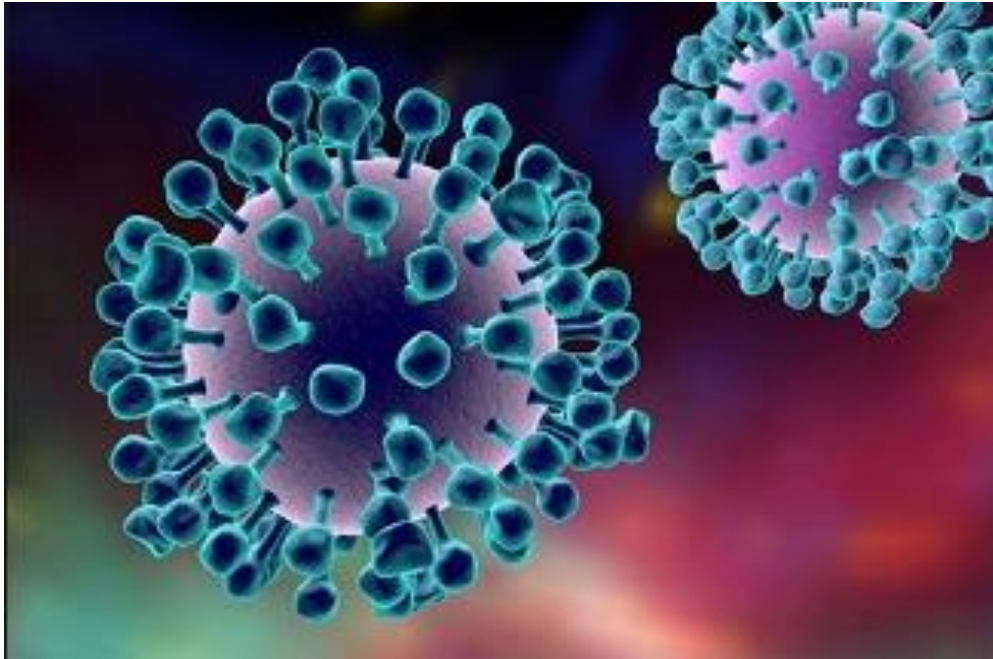
1.2 Ταξινόμηση του ιού *Influenza A*

Οι ιοί της γρίπης ανήκουν στην οικογένεια των Ορθοβλεννοϊών (*Orthomyxoviridae*). Το όνομα τους το πήραν από τις ελληνικές λέξεις «ορθός» και «βλέννη» λόγω της ικανότητας των ιών να προσκολλώνται στη βλέννη.¹² Η οικογένεια των Ορθοβλεννοϊών περιλαμβάνει επτά γένη.¹³

1. Influenza virus A
2. Influenza virus B
3. Influenza virus C
4. Influenza virus D
5. Isavirus
6. Quaranjavirus
7. Thogotovirus

Οι ιοί της γρίπης των τριών πρώτων γενών ταξινομούνται περαιτέρω βάσει αντιγονικών διαφορών των νουκλεοπρωτεϊνών (NP) και των μεμβρανικών πρωτεϊνών τους (M). Οι ιοί της Influenza A προσβάλλουν ανθρώπους, θηλαστικά και πτηνά. Οι ιοί της Influenza B προσβάλλουν ανθρώπους και οι ιοί της γρίπης C προσβάλλουν ανθρώπους, χοίρους και σκύλους.¹³

Οι ιοί της Influenza A (Εικόνα 1.2) κατηγοριοποιούνται σε υποτύπους με βάση τα επιφανειακά τους αντιγόνα, αιμοσυγκολλητίνη (HA) και νευραμινιδάση (NA). Η ταξινόμηση σε υποτύπους, που διαφέρουν στην αλληλουχία των αμινοξέων τουλάχιστον κατά το 30%, έχει πρακτική σημασία καθώς δεν υπάρχει διασταυρούμενη ανοσία μεταξύ των διαφορετικών υποτύπων με αποτέλεσμα οι αντιγονικές διαφορές να είναι καθοριστικές για την κατανόηση της επιδημιολογίας της γρίπης αλλά και για την παραγωγή εμβολίων.¹



Εικόνα 1.2 Ο ιός της *Influenza A* ²⁸

Έως τώρα έχουν αναγνωρισθεί 16 διαφορετικά μόρια αιμοσυγκολλητίνης (HA) (H1, H2, H3 κτλ.) και 9 νευραμινιδάσης (NA) (N1, N2, N3 κτλ.) ως προς τις αντιγονικές τους ιδιότητες. Πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών είναι εφικτοί, με απόρροια κάθε συνδυασμός να είναι ένας νέος υποτύπος του ιού.¹

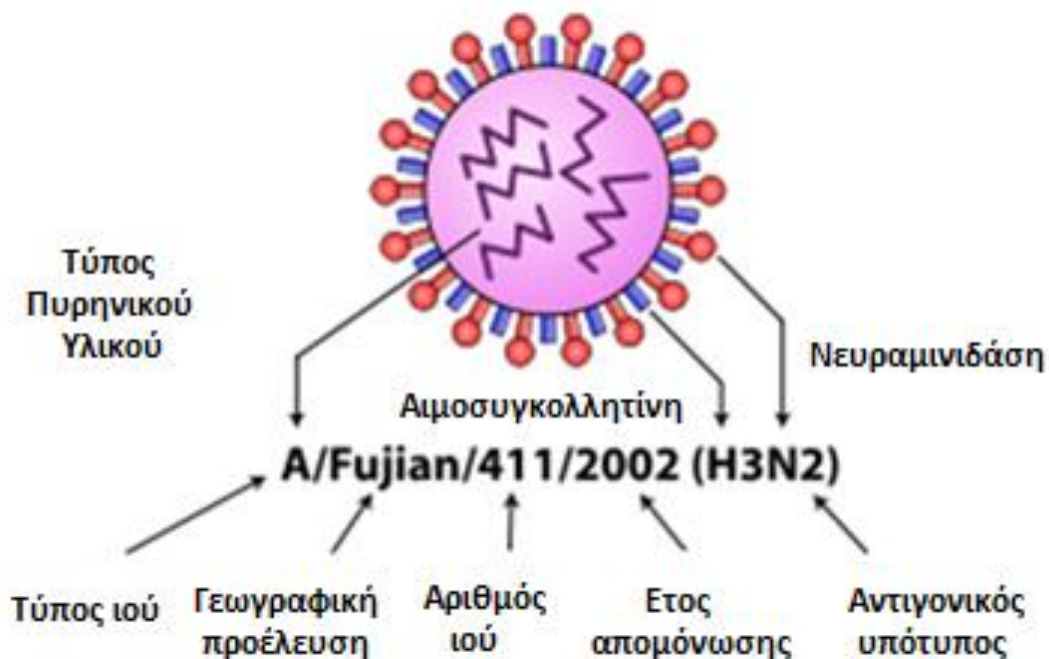
Οι υπότυποι που έχουν απομονωθεί από τον άνθρωπο είναι οι H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7 και H9N2. Με κυρίαρχους τους υποτύπους H1N1, H2N2 και H3N2. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο υπότυπος H1 κυκλοφορούσε μέχρι το 1957 όπου τον διαδέχθηκε ο υπότυπος H2 μέχρι το 1968. Από το 1968 μέχρι σήμερα κυκλοφορεί ο υπότυπος H3 ενώ από το 1976 επανεμφανίστηκε ο H1. Όσον αφορά στη νευραμινιδάση, στον υπότυπο N1 ανήκαν όλοι οι ιοί της γρίπης A μέχρι το 1957, στον υπότυπο N2 από το 1957 μέχρι σήμερα ενώ το 1976 επανεμφανίστηκε ο N1, ο οποίος εξακολουθεί να εμφανίζεται επίσης μέχρι σήμερα. Οι υπόλοιποι υπότυποι νευραμινιδάσης έχουν απομονωθεί μόνο σε πτηνά και άλογα.¹

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η ονοματολογία των ιών της *influenza* περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Τον τύπο του ιού (A, B, C).

2. Τον αρχικό ξενιστή από τον οποίο απομονώθηκε ο ιός, εκτός του ανθρώπου, πχ πτηνό.
3. Τη γεωγραφική προέλευση, π.χ. Κίνα.
4. Τον αριθμό του ιού.
5. Το έτος απομόνωσης, π.χ. 1958.
6. Μέσα σε παρένθεση την αντιγονική περιγραφή της αιμοσυγκολλητίνης και της νευραμινιδάσης του ιού, πχ (H1N1).

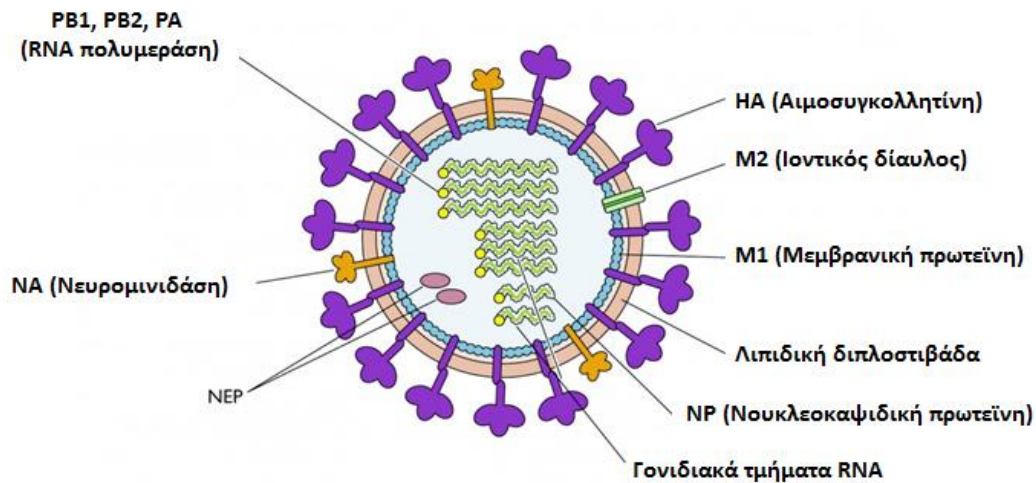
Στα ανθρώπινα στελέχη η αναφορά του αρχικού ξενιστή παραλείπεται. Για παράδειγμα, η ονοματολογία A/HongKong/1/1982/(H3N2) χαρακτηρίζει έναν ιό τύπου A που απομονώθηκε σε άνθρωπο το 1982 στο Χονγκ Κονγκ με αριθμό ιού 1 και υπότυπο H3N2.¹⁴ Άλλο ένα παράδειγμα ονοματολογίας του ιού της γρίπης περιγράφεται στο Σχήμα 1.2.



Σχήμα 1.2 Παράδειγμα ονοματολογίας του ιού της γρίπης ²⁹

1.3 Δομή του ιού *Influenza A*

Ο ιός της *Influenza A* περιέχει ένα μονόκλωνο αρνητικής πολικότητας RNA, το οποίο είναι χωρισμένο σε 8 τμήματα (Σχήμα 1.3).^{3, 12} Το σχήμα του είναι σφαιρικό ή ελικοειδές και τα σωματίδια του έχουν διάμετρο 80-120 nm.¹² Η μορφολογία των ιικών σωματιδίων είναι ένα γενετικό χαρακτηριστικό, το οποίο εξαρτάται από πολλές ιικές πρωτεΐνες (HA, NA, M1 και M2).¹² Ένας ακόμα παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τη μορφολογία του ιού είναι η φύση του κυττάρου-ξενιστή.¹ Κάθε σωματίδιο αποτελείται από 1-2% RNA, 70-75% πρωτεΐνες, 20-24% λιπίδια και 5-8% καρβοξύλια.¹⁵



Σχήμα 1.3 Η δομή του ιού της *Influenza A* ³¹

Τα τμήματα του ιικού RNA συνδέονται στενά με τη νουκλεοπρωτεΐνη (NP) σχηματίζοντας τη ριβονουκλεοπρωτεΐνη (RNP) που καλείται νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη.¹² Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί αντιγονικοί τύποι NP, οι οποίοι αντιστοιχούν στους τρεις διαφορετικούς τύπους της γρίπης (A, B, C).^{1, 2}

Το νουκλεοκαψίδιο συνδέεται με ένα σύμπλοκο RNA – πολυμεράσης. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από τρεις πρωτεΐνες: τη βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 1 (PB1), τη βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 2 (PB2) και την όξινη πρωτεΐνη της πολυμεράσης (PA).^{1, 2, 12}

Ακόμα, το νουκλεοκαψίδιο περιβάλλεται από μία άλλη πρωτεΐνη που ονομάζεται μεμβρανική ή μητρική (matrix) πρωτεΐνη (M1), η οποία αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του ιού.^{1, 2, 12} Υπάρχει και μια δεύτερη μεμβρανική πρωτεΐνη, η

M2, η οποία σχηματίζει ιοντικό δίαυλο και κωδικοποιείται από το ίδιο γονίδιο με αυτό της M1.^{1, 2, 3, 12}

Στην εξωτερική πλευρά των μεμβρανικών πρωτεϊνών (M1, M2) παρατηρείται μια λιπιδική διπλοστιβάδα, η οποία αποτελεί το φάκελο.^{1, 12} Από το φάκελο προεκβάλλουν δύο γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αγκαθωτή όψη της επιφάνειας του ιού.¹ Η πρώτη γλυκοπρωτεΐνη είναι η αιμοσυγκολλητίνη (HA). Αυτή αποτελείται από δύο διαφορετικές υπομονάδες, την HA1 και την HA2, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό.^{1, 2, 12} Η δεύτερη γλυκοπρωτεΐνη είναι η νευραμινιδάση (NA), που αποτελείται από 4 όμοιες υπομονάδες.^{1, 2, 12} Κάθε μόριο της NA συνδέεται με το λιπιδικό φάκελο μέσω υδρόφοβου δεσμού.^{1, 12} Υπενθυμίζεται ότι αυτές οι δύο γλυκοπρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την κατηγοριοποίηση του ιού σε αντιγονικούς υποτύπους.

Το ιικό RNA κωδικοποιεί δύο μη δομικές πρωτεΐνες τη NS1 που συντίθεται πρώιμα κατά τη μόλυνση και τη NS2 που σχηματίζεται όψιμα.^{1, 12}

1.3.1 Βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 1, PB1

Η βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 2 (PB2) μαζί με την βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 1 (PB1) και την όξινη πρωτεΐνη της πολυμεράσης (PA) απαρτίζουν το σύμπλεγμα της πολυμεράσης. Η PB1 κωδικοποιείται από το δεύτερο τμήμα του RNA, αποτελεί το βασικό συστατικό του συμπλέγματος πολυμεράσης και είναι απαραίτητη τόσο για την έναρξη της αντιγραφής όσο και για την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου ιικού RNA.¹⁸

1.3.2 Βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης 2, PB2

Η βασική πρωτεΐνη της πολυμεράσης (PB2) κωδικοποιείται από το πρώτο τμήμα του RNA, περιέχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού και μεταφέρεται στον πυρήνα των προσβεβλημένων κυττάρων προκειμένου να λάβει χώρα η ιική αναπαραγωγή.¹⁶ Ακόμη, εμφανίζει δράση ενδονουκλεάσης, δηλαδή χρησιμοποιεί το mRNA του κυττάρου ξενιστή ώστε να δημιουργήσει περιοχές εκκίνησης για τη σύνθεση του ιικού mRNA.¹⁷

1.3.3 Όξινη πρωτεΐνη της πολυμεράσης, PA

Η όξινη πρωτεΐνη της πολυμεράσης (PA) κωδικοποιείται από το τρίτο τμήμα του RNA είναι η μικρότερη υπομονάδα του συμπλέγματος πολυμεράσης, περιέχει κι αυτή σήματα πυρηνικού εντοπισμού ώστε να μετακινείται στον πυρήνα. Η PA είναι απαραίτητη για την ιική αντιγραφή και μεταγραφή. Μεταλλαγές που μπορεί να συμβούν κοντά στο καρβοξυλικό άκρο της φαίνεται ότι είναι ικανές να αναστείλουν τη μεταγραφή.¹⁹

1.3.4 Αιμοσυγκολλητίνη, HA

Η αιμοσυγκολλητίνη (HA) είναι μια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη του ιού της γρίπης που κωδικοποιείται από το τέταρτο μεγαλύτερο τμήμα του RNA. Η HA είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση στα κύτταρα του ξενιστή, πιο συγκεκριμένα προσδένεται στο ολιγοσακχαριδικό άκρο του σιαλικού οξέος εμφανίζοντας εκλεκτικότητα ως προς το είδος του υποδοχέα σύνδεσης.¹⁵ Στην αρχή της λοίμωξης η HA έχει μορφή μονής πολυπεπτιδικής αλυσίδας, η οποία στην πορεία διαιρείται σχηματίζοντας δύο υπομονάδες την HA1 και την HA2 που ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό.²⁰ Η δομή της στο χώρο περιλαμβάνει μια σφαιρική κεφαλή, υπεύθυνη για τη σύνδεση με τους κυτταρικούς υποδοχείς και μια ουρά υπεύθυνη για την διείσδυση του ιού στο κύτταρο.²⁰

1.3.5 Νουκλεοπρωτεΐνη, NP

Η νουκλεοπρωτεΐνη (NP) κωδικοποιείται από το πέμπτο τμήμα του γονιδιώματος του ιού της Influenza A, είναι το πιο άφθονο συστατικό της ριβονουκλεοπρωτεΐνης (RNP). Αποτελεί ένα ειδικό αντιγόνο του ιού και είναι απαραίτητο για την αντιγραφή και μεταγραφή του.¹⁹ Ακόμη, η NP διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μετακίνηση του ιικού RNA στον πυρήνα κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της ιικής λοίμωξης.^{21, 22} Μετέπειτα η NP μαζί με τις M1 και NS2 συμμετέχουν στη μετακίνηση των θυγατρικών ιικών RNA στο κυτταρόπλασμα προς το σχηματισμό νέων ιικών σωματιδίων.^{21, 22}

1.3.6 Νευραμινιδάση, NA

Η νευραμινιδάση (NA) κωδικοποιείται από το έκτο τμήμα RNA, είναι η δεύτερη σημαντική επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη του ιού της γρίπης. Φαίνεται ότι

απομακρύνει τα υπολείμματα του σιαλικού οξέος από την επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή προωθώντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη διείσδυση του ιού στο κύτταρο καθώς και την απελευθέρωση των νεοσχηματισθέντων ιών από αυτό.²

1.3.7 Μεμβρανικές πρωτεΐνες M1 και M2

- **Η πρωτεΐνη M1**

Η μεμβρανική πρωτεΐνη (M1) κωδικοποιείται από το έβδομο τμήμα RNA, βρίσκεται κάτω από τη λιπιδική διπλοστιβάδα και αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη του ιού. Λαμβάνει μέρος σε πολλές λειτουργίες. Πρώτον, συνδέεται με το RNA και αναστέλλει την ιική μεταγραφή.^{23, 24, 25} Φαίνεται να ρυθμίζει την πυρηνική μετακίνηση του ιικού RNA.²⁵ Ακόμα, συνδέεται με το RNP προωθώντας την έξοδο από τον πυρήνα και αναστέλλοντας την είσοδο.²⁵ Μια αρκετά σημαντική λειτουργία που λαμβάνει μέρος η M1 είναι τη συναρμολόγηση των θυγατρικών ιικών σωματιδίων.^{23, 24}

- **Η πρωτεΐνη M2**

Η M2 είναι μια ομοτετραμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη 97 αμινοξέων που κωδικοποιείται, όμοια με την M1, από το έβδομο τμήμα του RNA. Λειτουργεί ως ιοντικός διάυλος, εκλεκτικά ως προς το H⁺ έχοντας κατεύθυνση μεταφοράς από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο ώστε να ρυθμίζεται το pH.²⁶ Ο ρόλος της πρωτεΐνης M2 θα αναλυθεί λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 2.

1.3.8 Μη δομικές πρωτεΐνες NS1 και NS2

- **Η NS1 πρωτεΐνη**

Οι μη δομικές πρωτεΐνες NS1 & NS2 κωδικοποιούνται από το όγδοο τμήμα του RNA. Φαίνεται ότι ρυθμίζει την έκφραση κυτταρικών και ιικών πρωτεϊνών συνδεδεμένη με διαφορετικά μόρια RNA. Ακόμη, αναστέλλει την ωρίμανση και την πυρηνική έξοδο του κυτταρικού mRNA, πράγμα που χρησιμοποιείται στην σύνθεση του ιικού mRNA.^{1, 2}

- **Η NS2 πρωτεΐνη**

Η NS2 πρωτεΐνη συμβάλλει στην απομάκρυνση από τον πυρήνα του ιικού RNA δρώντας ως ενδιάμεσο επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη σύνδεση τμημάτων

της ριβονουκλεοπρωτεΐνης με τις νουκλεοπορίνες, οι οποίες είναι συστατικά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.¹

Πίνακας 1.1 Συγκεντρωτικός πίνακας των γονιδίων του ιού *Influenza A*, οι θέσεις τους στο ιικό σωματίδιο και οι λειτουργίες τους

Τμήμα RNA	Πρωτεΐνες	Περιοχή στο ιικό Σωματίδιο	Λειτουργίες
1 2 3	PB1 πολυμεράση PB2 πολυμεράση PA πολυμεράση	Εσωτερική	Σύμπλεγμα ενζύμων, συμβάλει στη μεταγραφή RNA & στην παθογένεια του ιού
4	HA αιμοσυγκολλητίνη	Προεκβολές περιβλήματος	Γλυκοπρωτεΐνη, αντιγόνο, δέσμευση σε υποδοχείς του σιαλικού οξέος
5	NP νουκλεοπρωτεΐνη	Εσωτερική	Μετακίνηση RNP προς τον πυρήνα, πολλαπλασιασμός
6	NA νευραμινιδάση	Προεκβολές περιβλήματος	Γλυκοπρωτεΐνη, ενζυμική & αντιγονική δραστηριότητα
7	M1 μητρικές πρωτεΐνες M2	Κάτω από το περίβλημα Διαπερνά περίβλημα και καψίδιο	Δομικό υλικό Δίαυλος ιόντων, προσαρμογή pH
8	NS1 μη δομικές πρωτεΐνες NS2	Εσωτερική	Δομικά υλικά

1.4 Ιικός κύκλος της *Influenza A*

- **1ο στάδιο:** προσκόλληση του ιού στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή

Ο ιός της γρίπης προσβάλλει τα κύτταρα μέσω της σύνδεσης της HA με ειδικούς επιφανειακούς υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή που περιέχουν σιαλικό οξύ.¹⁵

- **2ο στάδιο:** ενδοκύττωση ή ενδοκυττάρωση του ιού

Με τον όρο ενδοκύττωση εννοούμε μια μη εκλεκτική διαδικασία εγκόλπωσης ουσιών ή μικροοργανισμών, των οποίων η πρόσληψη μέσω της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων καθίσταται αδύνατη, ιδιαίτερα για μόρια όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες ή πολυνουκλεοτίδια.^{2, 3}

- **3ο στάδιο:** σύντηξη λιπιδικού φακέλου

Η σύντηξη του λιπιδικού φακέλου που περιβάλλει τον ιό με τις μεμβράνες των ενδοσωμάτων, μια διαδικασία που απαιτεί όξινο περιβάλλον ($pH = 5,0-6,0$) και το διαχωρισμό της HA σε HA1 και HA2.²⁰ Η σύντηξη έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου του ιού στο κυτταρόπλασμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν τη σύντηξη, οι M2 πρωτεΐνες, δρώντας ως διάλυτοι ιόντων εισάγουν πρωτόνια στο εσωτερικό του νουκλεοκαψιδίου δημιουργώντας όξινο περιβάλλον.¹ Το χαμηλό pH είναι αυτό που προωθεί και την αποσύνδεση της πρωτεΐνης M1 από το RNP επιτρέποντας στο σύμπλεγμα της RNA-πολυμεράσης να μεταναστεύσει στον πυρήνα του κυττάρου.²⁵

- **4ο στάδιο:** μεταγραφή αγγελιοφόρου RNA (mRNA)

Μόλις το RNP μεταναστεύσει στον πυρήνα του κυττάρου, το σύμπλεγμα της πολυμεράσης (PB1, PB2, PA) ξεκινά την αρχική μεταγραφή του mRNA από όλα τα τμήματα του ιικού RNA.

- **5ο στάδιο:** μετάφραση ιικών πρωτεϊνών

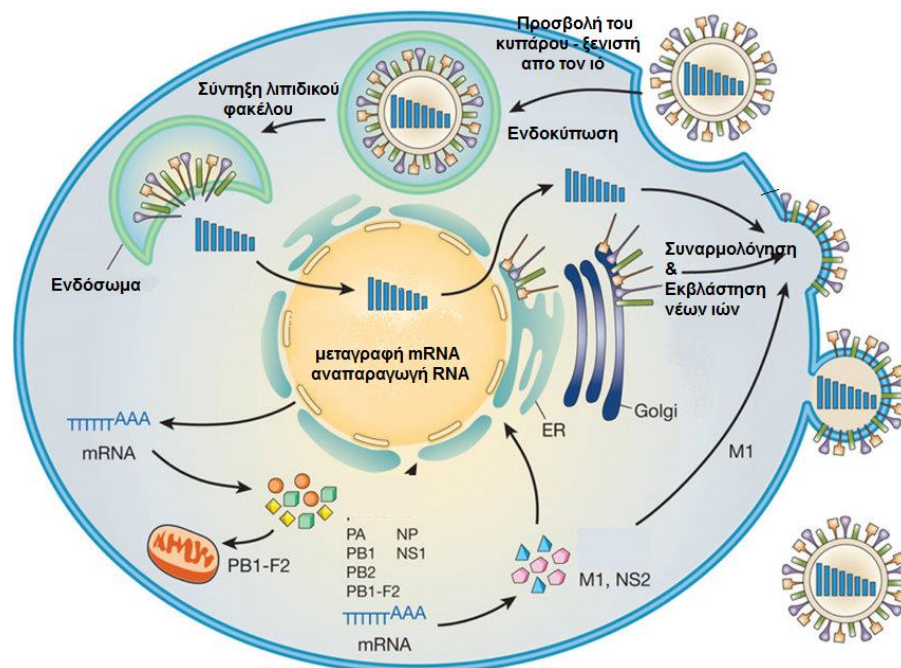
Αφού ολοκληρωθεί η παραγωγή του mRNA, αυτό εγκαταλείπει τον κυτταρικό πυρήνα και προσδένεται στα ριβοσώματα όπου αρχίζει η μετάφραση των ιικών πρωτεϊνών.^{16, 18}

- **6ο στάδιο:** συναρμολόγηση θυγατρικών ιικών σωματιδίων

Ξεκινά με την πρόσδεση της νουκλεοπρωτεΐνης με τα νεοσχηματισθέντα ιικά RNA σχηματίζοντας το νουκλεοκαψίδιο.^{24, 25} Τα νουκλεοκαψίδια εξέρχονται από τον πυρήνα συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες M1 και M2. Μόλις προσεγγίζουν την κυτταρική μεμβράνη περιβάλλονται από ένα φάκελο που περιέχει της πρωτεΐνες HA, NA και M2.¹

- **7ο στάδιο:** εκβλάστηση (ή λύση) ιού από το κύτταρο

Οι ιοί εξέρχονται από το κύτταρο μέσω λιπιδικών διόδων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.² Η απελευθέρωση των νέων ιών από το κύτταρο ανιχνεύεται μετά το πέρας 5-6 ωρών από τη μόλυνση του κυττάρου και μεγιστοποιείται μετά από 7-8 ώρες.¹



Σχήμα 1.4. Τα στάδια αναπαραγωγής του ιού της *Influenza A* ³²

1.5 Χημειοθεραπεία κατά του ιού της *Influenza A*

Τα συμπτώματα που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της λοίμωξης με τον ιό της γρίπης ποικίλλουν, μπορεί να πρόκειται για μια ήπια νόσο του αναπνευστικού συστήματος με ρινίτιδα και φαρυγγίτιδα μέχρι μια πρωτοπαθή ιογενή πνευμονία με θανατηφόρο κατάληξη.

Η θεραπεία του ιού της *Influenza A* είναι κατά κύριο λόγο συμπτωματική. Συνίσταται οι ασθενείς να μένουν κλινήρεις 2-3 μέρες ώστε να υποχωρήσουν τα οξέα συμπτώματα. Η κεφαλαλγία και ο πυρετός συνίσταται να αντιμετωπίζεται με χορήγηση ΜΣΑΦ (Μη Στερεοειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα) και κυρίως παρακεταμόλης, ενώ για την ανακούφιση του ασθενή από τον έντονο βήχα μπορεί να χορηγηθεί κωδεΐνη.

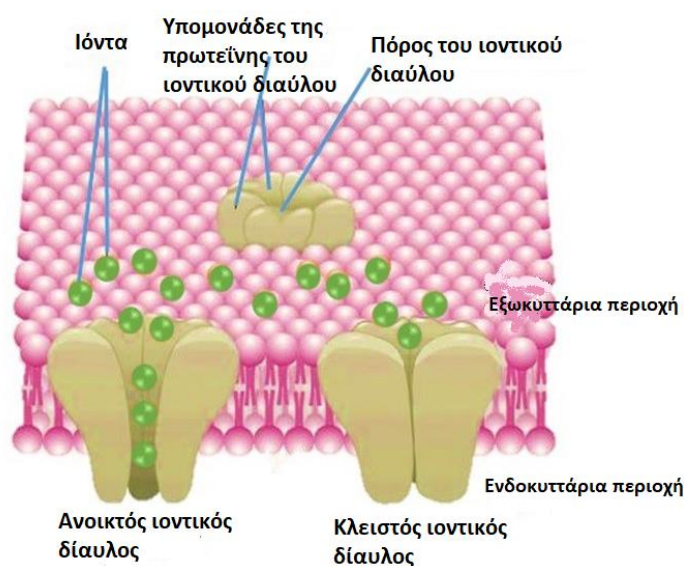
Για τον ιό της *Influenza A* υπάρχουν εγκεκριμένα αντι-ιικά φάρμακα που ανήκουν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις κυκλικές αμίνες αμανταδίνη (Amantadine) και ριμανταδίνη (Rimantadine), οι οποίες αναστέλλουν τη δράση της μεμβρανικής πρωτεΐνης M2. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους αναστολείς της νευραμινιδάσης. Στην τρίτη κατηγορία ανήκει η ριμπαβιρίνη, η οποία είναι συνθετικό νουκλεοσιδικό ανάλογο που αναστέλλει τη σύνθεση του νουκλεϊκού οξέος του ιού μέσω αλλαγών στο μεταβολισμό του κυττάρου.¹ Στην παρούσα διπλωματική εργασία θα μελετήσουμε την πρώτη κατηγορία και πιο συγκεκριμένα συζεύγματα ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Ο ΙΟΝΤΙΚΟΣ ΔΙΑΥΛΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΗΣ *INFLUENZA A/M2*

2.1 Ιοντικός διάυλος

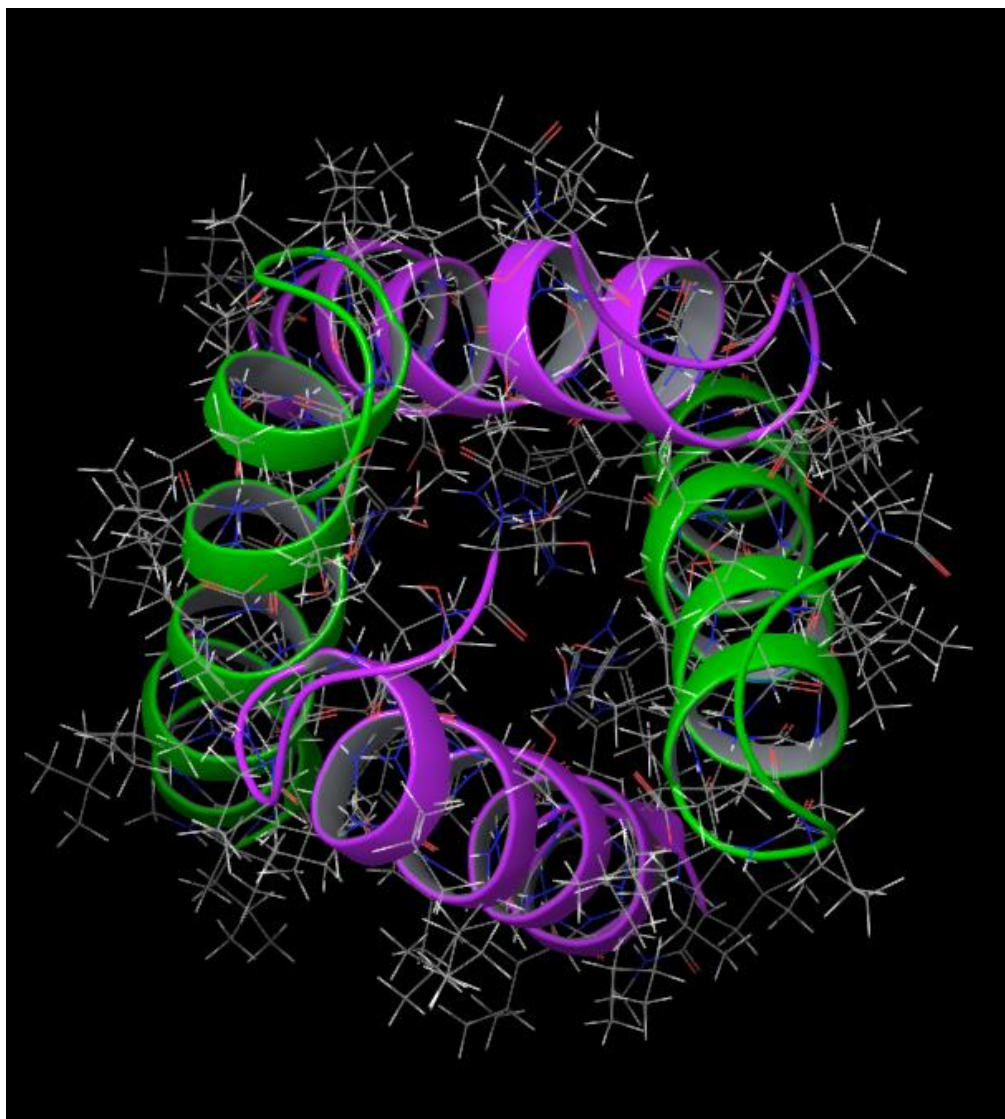
Οι ιοντικοί διάυλοι είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν πόρους ώστε να επιτρέπουν στα ιόντα να διέρχονται μέσω αυτών. Σε αντίθεση με άλλους υδρόφιλους πόρους, οι ιοντικοί διάυλοι εμφανίζουν εκλεκτικότητα ως προς τα ιόντα, δηλαδή επιτρέπουν τη διέλευση μόνο σε συγκεκριμένα ιόντα.³⁴ Η εκλεκτικότητά τους εξαρτάται από τη διάμετρο και το σχήμα του διαύλου αλλά και από την κατανομή των αμινοξέων που βρίσκονται στο εσωτερικό του.³⁴ Αυτό συμβαίνει καθώς ο διάυλος είναι αρκετά στενός σε ορισμένα σημεία με αποτέλεσμα τα ιόντα να έρχονται σε επαφή με το τοίχωμά του και κατ' αυτόν τον τρόπο να τον διαπερνούν μόνο τα ιόντα που έχουν κατάλληλο μέγεθος και φορτίο.³⁴ Οι ιοντικοί διάυλοι δεν είναι μόνιμα ανοικτοί, ανοίγουν για λίγο και έπειτα ξανακλείνουν, γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως ελεγχόμενοι διάυλοι (Σχήμα 2.1).³⁴ Η μεταφορά ιόντων που παρατηρείται στους διαύλους ισοδυναμεί με έναν ηλεκτρικό παλμό που διαδίδεται εντός ή εκτός του κυττάρου.³⁴ Η ροή ιόντων αλλάζει το μεμβρανικό δυναμικό, το οποίο με τη σειρά του μεταβάλλει τις ηλεκτροχημικές δυνάμεις που είναι υπεύθυνες για τις διαμεμβρανικές μετακινήσεις και τη μεταφορά άλλων ιόντων ώστε να εξαναγκάσει άλλους ιοντικούς διαύλους να ανοίξουν.³⁴



Σχήμα 2.1 Σχηματική απεικόνιση ανοικτού και κλειστού ιοντικού διαύλου ³

2.2 Ο ιοντικός διάυλος του ιού της *Influenza A/M2*

Η M2 είναι μια ομοτετραμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη 97 αμινοξέων (Εικόνα 2.1) που κωδικοποιείται, όμοια με την M1, από το έβδομο τμήμα του RNA. Λειτουργεί ως ιοντικός διάυλος, εκλεκτικά ως προς το H^+ έχοντας κατεύθυνση μεταφοράς από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο ώστε να ρυθμίζεται το pH.²⁶



Εικόνα 2.1 Ο ομοτετραμερής πόρος της διαμεμβρανικής περιοχής της M2

Στο ενδόσωμα των προσβεβλημένων κυττάρων η δραστηριότητα της M2 ως ιοντικός διάυλος επιτρέπει τη μείωση του pH των εισερχόμενων ιικών σωματιδίων ώστε να πραγματοποιηθεί η ιική αντιγραφή καθώς επιτρέπει την αποσύνδεση του RNP από την M1 και την είσοδό του στον πυρήνα.^{1, 2} Ακόμη, η M2 διατηρεί υψηλό το pH στο σύμπλεγμα Golgi, πράγμα που συμβάλλει στην

ανθεκτικότητα των νεοσχηματισθέντων μορίων HA, για να επιτευχθεί η συναρμολόγηση νέων ιικών σωματιδίων.¹ Οι δύο μεμβρανικές πρωτεΐνες, M1 και M2, είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες για την ελικοειδή μορφή των ιικών σωματιδίων.²⁷

Αποτελείται από τρεις περιοχές:

- Την εξωκυτταρική N- τελική περιοχή, αποτελούμενη από 23 αμινοξέα.
- Τη διαμεμβρανική περιοχή (Transmembrane, TM), αποτελούμενη από 25 αμινοξέα.
- Την ενδοκυτταρική C- τελική περιοχή, αποτελούμενη από 49 αμινοξέα.

Η διαμεμβρανική περιοχή σχηματίζει έναν ομοτετραμερή πόρο που δρα ως διάυλος πρωτονίων και κάθε μονομερές εμφανίζει δομή αριστερόστροφης α-έλικας και αλληλουχία αμινοξέων (ίδη Παράρτημα I), η οποία ονομάζεται Udorn (WT M2)^{3, 26}:

Udorn: S22 S23 D24 P25 L26 V27 V28 A29 A30 S31 I32 I33 G34 I35 L36 H37 L38 I39 L40 W41 I42 L43 D44 R45 L46

Υπάρχει και η Weybridge με αλληλουχία:

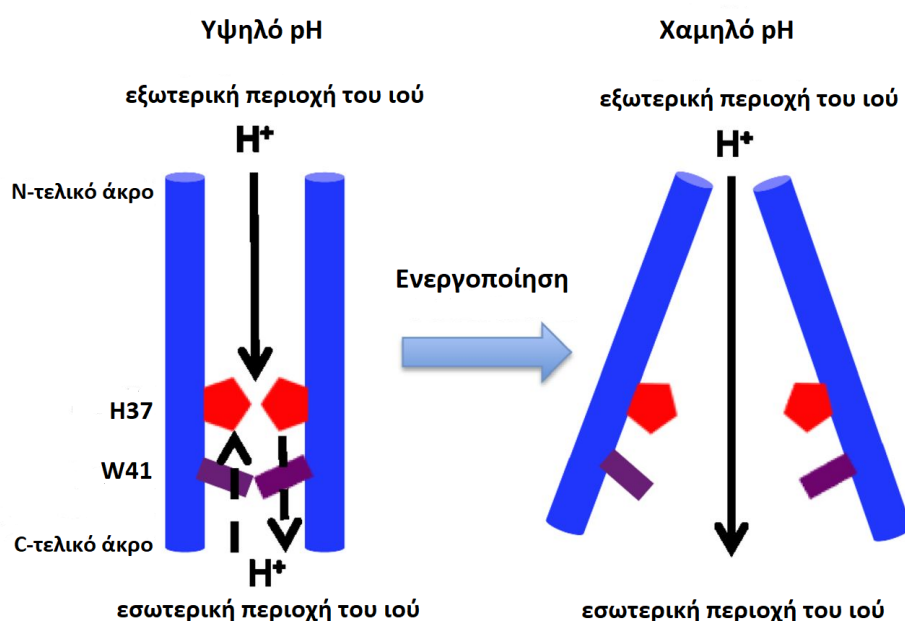
Weybridge: S22 S23 D24 P25 L26 V27 I28 A29 A30 S31 I32 I33 G34 I35 L36 H37 F38 I39 L40 W41 I42 L43 D44 R45 L46

Σε αυτή παρατηρούνται δύο μεταλλάξεις η V28I και η L38F.³ Στην παρούσα εργασία τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στη WT/M2.

Τα σημαντικά αμινοξέα για την ενεργοποίηση του διαύλου είναι η ιστιδίνη στη θέση 37 (H37) και η θρυπτοφάνη στη θέση 41 (W41).³⁶ Ο ιοντικός διάυλος της M2 ενεργοποιείται σε χαμηλό pH και παρουσιάζει χαμηλή αγωγιμότητα.^{36, 39} Η H37 και πιο συγκεκριμένα το ιμιδαζόλιο που φέρει, είναι υπεύθυνα για την εκλεκτικότητα ως προς τα ιόντα H⁺ και το όξινο pH.³⁶ Όταν η H37 αντικατασταθεί με άλλα αμινοξέα όπως γλυκίνη, αλανίνη, γλουταμινικό οξύ, σερίνη ή θρεονίνη η εκλεκτικότητα του διαύλου ως προς τα πρωτόνια χάνεται και ο μεταλλάκτης μπορεί πλέον να μεταφέρει ιόντα Na⁺ και K⁺.³⁶

2.2.1 Επίδραση του pH

Η πρωτεΐνη M2, ως διάυλος πρωτονίων μπορεί να βρεθεί σε δύο καταστάσεις ανάλογα με την τιμή του pH. Σε όξινο περιβάλλον ($\text{pH} < 5$), οι πλευρικές αλυσίδες των H37 του τετραμερούς πρωτονιώνονται και λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης των ιμιδαζολίων που είναι θετικά φορτισμένα η M2 βρίσκεται σε ανοικτή κατάσταση.⁴⁰ Σε βασικό περιβάλλον ($\text{pH} > 7,5$), η M2 βρίσκεται σε κλειστή κατάσταση, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπει τη διέλευση ιόντων (Σχήμα 2.2).^{36, 39, 42}



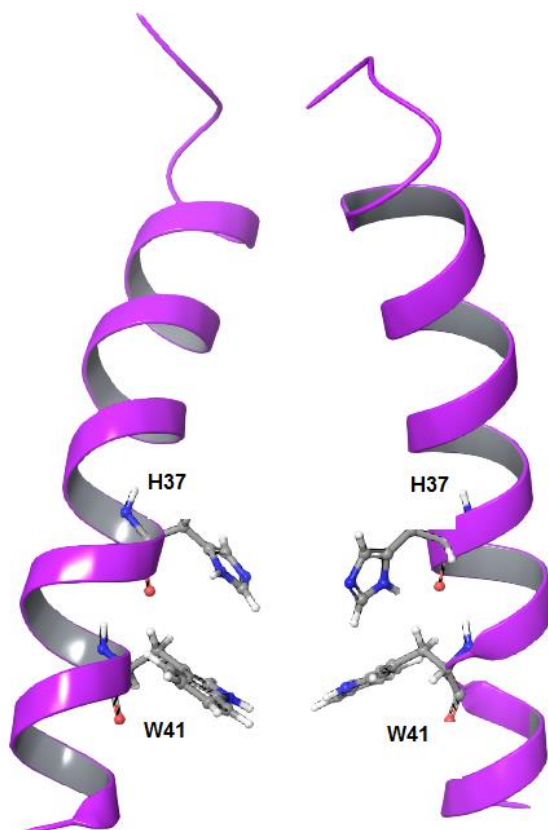
Σχήμα 2.2 Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης του ιοντικού διαύλου της M2.

Σε υψηλό pH, οι διαμεμβρανικές έλικες συγκρατούνται σφικτά και η πύλη θρυπτοφάνης είναι κλειστή. Σε χαμηλό pH, η πρωτονίωση των ιμιδαζολίων της H37 αποσταθεροποιεί το πακετάρισμα των ελίκων, επιτρέποντας την ενυδάτωση του πόρου και την εισροή πρωτονίων. Για λόγους ευκρίνειας φαίνονται μόνο δύο από τις τέσσερις έλικες.⁴²

2.2.2 Ο ρόλος των πολικών αμινοξέων στην αγωγιμότητα πρωτονίων

Η διαμεμβρανική περιοχή της M2 έχει τη δομή αμφιπαθούς α-έλικας με τις λιπόφιλες ομάδες να βρίσκονται προς το εσωτερικό της λιπιδικής διπλοστιβάδας και τις πολικές να βρίσκονται στο εσωτερικό του ιοντικού διαύλου. Το C-τελικό άκρο τοποθετείται προς το ιικό καψίδιο ενώ το N-τελικό άκρο τοποθετείται εντός λιπιδικής μεμβράνης.² Αναλυτικότερα, οι διαμεμβρανικές έλικες σχηματίζουν μια αριστερόστροφη δέσμη τεσσάρων

ελίκων που σχηματίζουν γωνία περίπου 23° με τον κάθετο άξονα του επιπέδου της μεμβράνης, δημιουργώντας έναν καλά σχηματισμένο διάυλο. Ένας δακτύλιος μεθυλίων της V27 περιορίζει το N-τελικό άκρο του πόρου στα $3,1 \text{ \AA}$ περίπου και οι H37, W41 βρίσκονται εντός του πόρου (Εικόνα 2.2).^{39, 42}



Εικόνα 2.2 Η θέση της H37 και της W41 στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες της M2

Οι ινδολικοί δακτύλιοι της W41 συνωστίζονται σε απόσταση Van der Waals ο ένας από τον άλλο απαγορεύοντας τη διέλευση μορίων ύδατος ή πρωτονίων. Ακόμη, η αμινομάδα του ινδολίου της W41 της μιας υπομονάδας βρίσκεται σε απόσταση σχηματισμού δεσμού υδρογόνου με την καρβοξυλομάδα του D44 της απέναντι υπομονάδας. Η σταθεροποίηση της κλειστής πύλης επιτυγχάνεται μέσω της W41 και αυτών των δεσμών υδρογόνου. Τέλος, οι πλευρικές αλυσίδες της R45 συμμετέχουν σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις με το D44. Μειώνοντας το pH λαμβάνει πρωτονίωση των H37 όπου αποσταθεροποιείται το πακετάρισμα «έλικας-έλικας» λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων. Η συγκεκριμένη διαμορφωτική αναδιάταξη διασπά τις αλληλεπιδράσεις της W41 και του D44 επιτρέποντας τη διάνοιξη της πύλης του διαύλου. Η ανοικτή

κατάσταση του διαύλου φαίνεται να σταθεροποιείται μέσω ευνοϊκής αλληλεπίδρασης των κατιόντων ιμιδαζολίου της H37 και του π-ηλεκτρονιακού νέφους της W41. Οι αλληλεπιδράσεις π-κατιόντος αναγνωρίζονται ως κύριες μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες είναι σημαντικές για τη σταθεροποίηση της δομής των πρωτεϊνών και ενεργειακά είναι ισότιμες ή ισχυρότερες από ένα δεσμό υδρογόνου. Ένα ζευγάρι κυστεινών στο N-τελικό άκρο σχηματίζει ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς *in vivo*. Ως εκ τούτου, οι διαμεμβρανικές έλικες είναι «δεμένες» σε ένα μεγάλο μόριο με δισουλφιδικούς δεσμούς στο N-τελικό άκρο και στην αμφιπαθή δέσμη δεξιόστροφων ελίκων στο C-τελικό άκρο. Διασφαλίζοντας με αυτό τον τρόπο ότι η αποσταθεροποίηση της δέσμης των ελίκων που λαμβάνει χώρα κατά την ενεργοποίηση του διαύλου δεν προκαλεί τη διάσπαση του τετραμερούς.

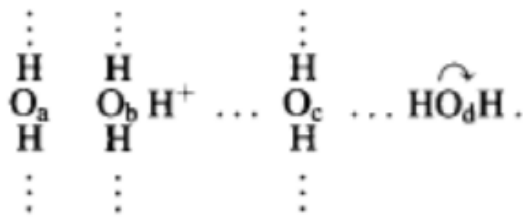
Η A/M2 περιλαμβάνει κι άλλα πολικά αμινοξέα κατά μήκος του πόρου του διαύλου, τα οποία αποτελούν βασική προϋπόθεση για την ενυδάτωση του διαύλου και τη μεταφορά των πρωτονίων. Η ροή των πρωτονίων πραγματοποιείται με κατεύθυνση από το N-τελικό προς το C-τελικό άκρο. Τα αμινοξέα του διαμεμβρανικού τμήματος της M2 που συμβάλλουν στη μεταφορά των πρωτονίων είναι η S31, η H37, το D44 και η R45. Μεταλλάξεις αυτών οδηγούν σε μείωση του ρυθμού ροής των πρωτονίων. Πιο συγκεκριμένα η μετάλλαξη S31A, όπου η σερίνη στη θέση 31 έχει αντικατασταθεί από μια αλανίνη, οδηγεί σε μέτρια ελάττωση του ρυθμού ροής πρωτονίων ενώ η μετάλλαξη D44A, όπου το ασπαραγινικό οξύ έχει αντικατασταθεί από μία αργινίνη, οδηγεί σε σημαντική ελάττωση του ρυθμού ροής των πρωτονίων, καθώς το D44 διευκολύνει την έξοδο των πρωτονίων.

Ακόμη, η δομή NMR του κλειστού διαύλου δείχνει ότι η περιοχή του C-τελικού άκρου μετά την περιοχή της W41 είναι πυκνά πακεταρισμένη με υδρόφοβες φαινυλαλανίνες, οι οποίες σφραγίζουν το διάυλο στη συγκεκριμένη περιοχή. Το D44 και η R45 είναι τα μοναδικά πολικά αμινοξέα στο υδρόφοβο κομμάτι του διαύλου, οπότε είναι πιθανό να λειτουργούν επικουρικά στην έξοδο των πρωτονίων δεχόμενα τα πρωτόνια ή τα οξόνια και στην πορεία να τα απελευθερώνουν στην υδρόφιλη περιοχή της μεμβράνης. Σημειώνεται ότι το D44 διατηρείται σχεδόν πάντα στους μεταλλαγμένους ιούς ενώ η R45 πάντα.

2.2.3 Μηχανισμός αγωγιμότητας πρωτονίων – Μηχανισμός Grotthuss

Τα πρωτόνια παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά σε σύγκριση με άλλα ιόντα στα βιολογικά συστήματα καθώς βρίσκονται σε δυναμική ανταλλαγή με το ύδωρ, ρυθμιστικά διαλύματα, ομάδες λιπιδίων, πρωτεϊνών και άλλων κυτταρικών μορίων. Για αυτό το λόγο η κίνηση πρωτονίων κατά μήκος των λιπιδικών μεμβρανών απαιτεί ένα ξεχωριστό μηχανισμό από εκείνους που έχουν υιοθετηθεί για τα άλλα είδη ιοντικών διαύλων.³ Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι ο μηχανισμός Grotthuss (Σχήμα 2.3).

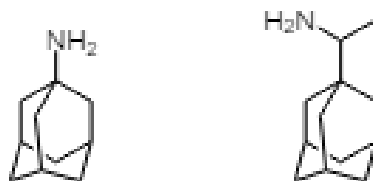
Σύμφωνα με το μηχανισμό Grotthuss τα μέσα μεταφοράς των πρωτονίων εμφανίζουν μια έντονη τοπική δυναμική αλλά παραμένουν στη θέση τους. Τα πρωτόνια μεταφέρονται διαμέσου δεσμών υδρογόνου από το ένα μέσο μεταφοράς στο άλλο ενώ σύγχρονα πραγματοποιείται αναδιοργάνωση του περιβάλλοντος των πρωτονίων, η οποία περιλαμβάνει επαναπροσανατολισμό μεμονωμένων ειδών ή και διευρυμένων συνόλων. Απόρροια της αναδιοργάνωσης είναι ο σχηματισμός μιας συνεχούς ανενόχλητης τροχιάς για τη μετανάστευση πρωτονίων, η οποία αποτελεί και αναπόσπαστο κομμάτι των σταδίων που περιλαμβάνει τη διάχυσή τους. Τα μόρια ύδατος δεν περιστρέφονται ελεύθερα αλλά συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου. Ένα επιπλέον πρωτόνιο στο διάλυμα βρίσκεται με τη μορφή του οξωνίου δημιουργώντας την πρώτη στιβάδα επιδιάλυτωσης. Το οξώνιο αλληλεπιδρά ασθενέστερα με δεσμούς υδρογόνου με περισσότερα μόρια ύδατος στη δεύτερη στιβάδα επιδιάλυτωσης. Στην περιοχή γύρω από το επιπλέον πρωτόνιο, όπου οι δεσμοί υδρογόνου είναι ισχυρότεροι, τα πρωτόνια μετατοπίζονται σαν αποτέλεσμα δημιουργίας και διάσπασης δεσμών υδρογόνου των ασθενέστερων δεσμών με τα πιο απομακρυσμένα μόρια.³⁸



Σχήμα 2.3 Ο μηχανισμός Grotthuss στο ύδωρ. Παριστάνεται ένα υδροξόνιο H_3O_b^+ που αλληλεπιδρά με το H_2O_c στην πρώτη στιβάδα και με το H_2O_d στη δεύτερη. Οι τρεις δεσμοί υδρογόνου στην πρώτη στιβάδα επιδιαιλύτωσης του H_3O^+ δεν συμμετέχουν αρχικά στη διαδικασία. Ο δεσμός $\text{O}_b\text{H}\dots\text{O}_c$ είναι ένας σχετικά ισχυρός δεσμός που δεν είναι εύκολο να διασπαστεί. Ο δεσμός $\text{O}_c\dots\text{HO}_d$ διασπάται και αμέσως δημιουργείται το $\text{H}_2\text{O}_b\dots\text{H}^+\dots\text{O}_c\text{H}_2$ και το γύρω περιβάλλον επαναπροσανατολίζεται. Το H_2O_a δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με το O_b και το H^+ εντοπίζεται πλέον στο O_c .³⁸

2.3 Αμανταδίνη – Ριμανταδίνη

Η αμανταδίνη (Am, υδροχλωρικό άλας του 1-αμινο-αδαμαντανίου) και η ριμανταδίνη (Rim, υδροχλωρικό άλας της α-μέθυλο-1-αδαμαντομεθαναμίνης) ήταν τα πρώτα αντιικά φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση του ιού της *Influenza A* και εισήλθαν στη θεραπευτική τη δεκαετία του '60 (Σχήμα 2.4).^{1, 2, 3} Και τα δύο φάρμακα παρουσιάζουν ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα, κατανέμονται ευρέως στον οργανισμό και απεκκρίνονται από τους νεφρούς. Κλινικές μελέτες έδειξαν ότι και τα δύο φάρμακα μπορούν να χορηγηθούν τόσο για την πρόληψη όσο και για τη θεραπεία κατά του ιού της *Influenza A*. Επίσης, μειώνουν τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της νόσου όταν χορηγούνται μέσα σε 48 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων.¹ Η συνιστώμενη δόση για την προφύλαξη είναι 100mg ανά 12ωρο για όσο διάστημα υφίσταται η επιδημία ενώ για θεραπεία η αμανταδίνη χορηγείται στην ίδια ποσότητα για 10 μέρες και η ριμανταδίνη σε 150mg ανά 12ωρο για επίσης 10 μέρες.¹ Συγκρίνοντας τα δύο φάρμακα, η ριμανταδίνη είναι περισσότερα ανεκτή και παρουσιάζει λιγότερες παρενέργειες.^{1, 2, 3} Η τοξικότητά τους είναι δοσοεξαρτώμενη και αφορά κυρίως το ΚΝΣ και την καρδιά. Ως ανεπιθύμητες ενέργειες, και των δύο, έχουν παρατηρηθεί διαταραχές ύπνου, ευερεθιστότητα, τρόμος.¹

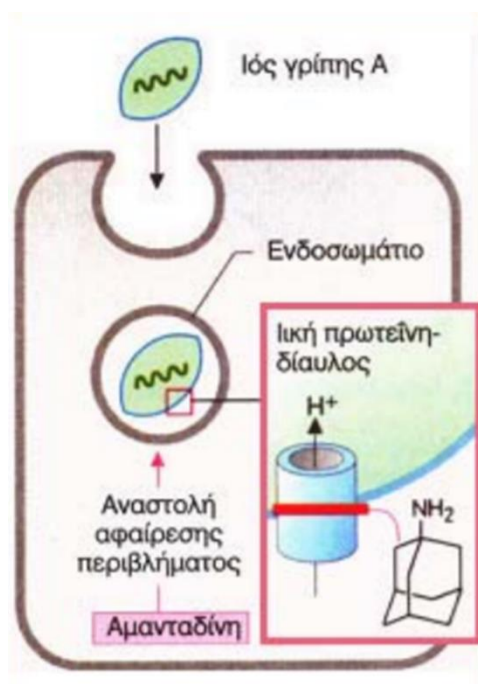


Αμανταδίνη Ριμανταδίνη

Σχήμα 2.4 Οι μοριακές δομές της αμανταδίνης και της ριμανταδίνης

Η ικανότητα αυτών των μορίων (αδαμαντάνες) να αναστέλλουν τη δράση του ιού σχετίζεται στενά με τη δομή του μορίου. Για αυτό προτάθηκε ότι ο συνδυασμός μιας αμινομάδας με έναν υδρογονανθρακικό δακτύλιο μεγαλύτερο των πέντε ατόμων άνθρακα προκαλεί αναστολή του ιού.

Οι αδαμαντάνες δρουν αναστέλλοντας το διάυλο μεταφοράς ιόντων της μητρικής πρωτεΐνης M2 (Σχήμα 2.5). Κατά αποτέλεσμα, δεν επέρχονται αλλαγές στο pH του κυττοπλάσματος, οι οποίες είναι απαραίτητες πρώτον στο στάδιο της απέκδυσης του ιού, δεύτερον στο διαχωρισμό της μεμβρανικής πρωτεΐνης από το RNP κατά το αρχικό στάδιο της αναπαραγωγής του ιού και τρίτον στο στάδιο της συναρμολόγησης των νέων ιών.^{1, 2}



Σχήμα 2.5 Συνοπτική παράσταση μηχανισμού δράσης της αμανταδίνης ως αναστολέας του ιοντικού διαύλου της M2 ⁴⁴

Οι διαφορές στην αναστολή μεταξύ διαφορετικών στελεχών *Influenza A* (π.χ. Rockstock, Weybridge) υποδεικνύουν ότι η βέλτιστη συγκέντρωση της αμανταδίνης εξαρτάται κι από άλλα χαρακτηριστικά του εκάστοτε ιού.³

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε μεταλλαγμένους ιούς, με παρόμοιες συγκεντρώσεις αμανταδίνης, έδειξαν ότι δεν προκάλεσε αναστολή του ιού, εμφάνισε δηλαδή ανεκτικότητα. Από ανάλυση αλληλουχίας των μεταλλαγμένων ιών φάνηκε ότι περιείχαν μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη M2 και πιο συγκεκριμένα στις θέσεις V27, A30, S31 και G34. Επιπρόσθετα, από τα πειράματα αυτά φάνηκε ότι η πρωτεΐνη M2 ήταν στόχος δράσης της αμανταδίνης ενώ οι μεταλλάξεις που προκαλούνται ορίζουν τη θέση σύνδεσής της.⁴³ Οι υποκαταστάσεις αυτές παρατηρούνται στην περιοχή των 19 αμινοξέων (25-43), της διαμεμβρανικής περιοχής. Σημειώνεται ότι οι πιο συχνές παρατηρούμενες μεταλλάξεις είναι οι V27A, A30T, S31N, V27G, V27D, A30P.³ Η μετάλλαξη S31N είναι υπεύθυνη για την ανθεκτικότητα άνω του 90% στην αμανταδίνη και ριμανταδίνη.^{2, 3}

Η ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του ιού της *Influenza A* στα φάρμακα αμανταδίνη και ριμανταδίνη δημιούργησε μια νέα, επιτακτική ανάγκη ανακάλυψης νέων φαρμάκων.

Σημειώνεται ότι η αμανταδίνη παρουσιάζει και άλλη δράση που είναι κατά της νόσου του Parkinson λόγω απελευθέρωσης ντοπαμίνης από τους κεντρικούς νευρώνες.^{1, 41}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

3.1 Η πορεία μιας ένωσης ως φάρμακο στην αγορά

Η έρευνα και ο σχεδιασμός ενώσεων που θα αποτελέσουν νέα φάρμακα είναι μια πολύπλοκη, χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία. Υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες μελέτες για το πόσο κοστίζει να κυκλοφορήσει ένα φάρμακο στην αγορά. Πρόσφατες εκτιμήσεις αναφέρουν ένα εύρος από 300 εκατομμύρια έως 1,7 δισεκατομμύρια δολάρια.⁴⁵ Στον Πίνακα 3.1 που ακολουθεί αναλύεται ο καταμερισμός του κόστους ανά ένωση σε κάθε πείραμα.⁴⁵

Πίνακας 3.1 Καταμερισμός κόστους ανά ένωση σε κάθε πείραμα ⁴⁵

Πείραμα	Τυπικό κόστος ανά ένωση (\$)
Υπολογιστική Χημεία	10
Βιοχημική δοκιμή	400
Δοκιμή σε κυτταρική καλλιέργεια	4.000
Τοξικότητα σε ποντίκια	12.000
Κρυσταλλική δοκιμή πρωτεΐνης	100.000
Δοκιμή αποτελεσματικότητας σε ποντίκια	1.000.000
Ανθρώπινες κλινικές δοκιμές	500.000.000

Ένα φάρμακο για να εισέλθει στο εμπόριο πρέπει να περάσει από προκλινικές δοκιμές.⁴⁵ Αυτές είναι :

- Οι βιοχημικές δοκιμές
- Οι κυτταρικές δοκιμές
- Οι δοκιμές σε ζώα
- Οι κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους

Από καθένα τύπο δοκιμών αντλούνται διαφορετικές πληροφορίες για τον τρόπο που η ένωση αλληλεπιδρά με το σώμα.⁴⁵ Πιο συγκεκριμένα, μελετώνται η φαρμακολογία, η φαρμακοκινητική και η τοξικολογική της δράση.⁴⁶ Οι προκλινικές μελέτες μπορεί να διαρκέσουν χρόνια και πολλές ενώσεις

ενδέχεται να παρουσιάσουν ιδιότητες που δεν τις καθιστούν ικανές ώστε να χαρακτηρισθούν ως φάρμακα και εν τέλει να απορριφθούν.⁴⁷

Οι κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους έχουν σχεδιαστεί ως μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, που καλούνται φάσεις, με σκοπό να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος της βλάβης στους ανθρώπους αλλά και για να κυκλοφορήσει το φάρμακο στην αγορά το συντομότερο δυνατό.⁴⁵ Σύμφωνα με τον Οργανισμό Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (Food and Drug Administration, FDA), ο οποίος θεωρείται από τους αυστηρότερους οργανισμούς στον κόσμο, οι φάσεις είναι τέσσερις (I, II, III, IV). Οι πρώτες τρεις φάσεις (I, II, III) αφορούν στην ασφάλεια, αποτελεσματικότητα και τη δοσολογία του φαρμάκου, όπου το φάρμακο δοκιμάζεται σε χιλιάδες ασθενείς αλλά και υγιείς εθελοντές. Το φάρμακο θα εισέλθει στην αγορά μόνο αν περάσει επιτυχώς και όλες τις φάσεις.^{45, 47} Στην τέταρτη (IV) φάση ελέγχονται απρόβλεπτες παρενέργειες που μπορεί να προκύψουν από τη μακροχρόνια χρήση.⁴⁷

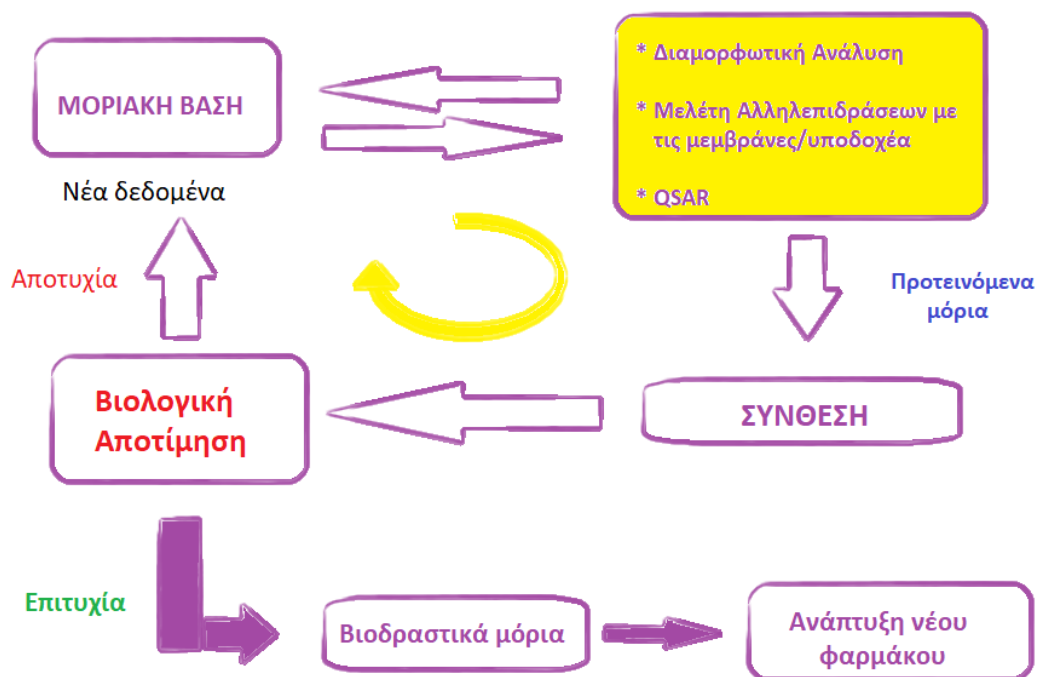
Σημειώνεται ότι η αποτυχία πολλών ενώσεων στις κλινικές δοκιμές δεν έγκειται στην αδυναμία τους να δράσουν αποτελεσματικά στην ασθένεια. Οι περισσότερες αποτυγχάνουν λόγω απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού, αποβολής και τοξικότητας (ADMET, Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Toxicity).⁴⁵

Για χρόνια η ανακάλυψη νέων φαρμάκων βασιζόταν σχεδόν αποκλειστικά στη διαίσθηση του φαρμακοχημικού (random screening).⁴⁶ Παρασκευάζονταν χιλιάδες μόρια καθιστώντας τη διαδικασία εξαιρετικά χρονοβόρα καθώς κόστιζε πολλές ανθρωποώρες αλλά και αρκετά δαπανηρή λόγω των πολλών πρώτων υλών που απαιτούσε η σύνθεση των δυνάμει φαρμακευτικών σκευασμάτων.

Ο ορθολογικός σχεδιασμός βοήθησε ώστε να μειωθεί ο χρόνος και το κόστος της διαδικασίας καθώς επιταχύνει την ανακάλυψη χημικών δομών που θα εισέλθουν στις προκλινικές μελέτες. Σε αυτή την αλλαγή συνέτειναν οι πρόσφατες ανακαλύψεις σε επιστήμες όπως της Συνδυαστικής Χημείας, Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας, Βιοχημείας, Χημειο- και Βιοπληροφορικής, Βιοφυσικής, Υπολογιστικής Χημείας, Μοριακής Μοντελοποίησης και των Μοριακών Γραφικών.⁴⁶

3.2 Μοριακή Μοντελοποίηση

Η ανάπτυξη νέων λογισμικών καθώς και η εξέλιξη των υπολογιστικών συστημάτων υπήρξαν καθοριστικές στην εφαρμογή της στρατηγικής του ορθολογικού σχεδιασμού (Σχήμα 3.1).⁴⁶



Σχήμα 3.1 Πορεία του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμακευτικών μορίων ⁴⁶

Το ενδιαφέρον της Υπολογιστικής Χημείας επικεντρώνεται:

- στη διαμορφωτική ανάλυση του εν δυνάμει φαρμακευτικού μορίου, ώστε να προκύψουν οι ενεργειακά ευνοϊκότερες διαμορφώσεις και να επιλεγούν οι πιθανές βιοδραστικές
- στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων του φαρμακευτικού μορίου με τις βιολογικές μεμβράνες και τον υποδοχέα, αν αυτός είναι γνωστός
- σε ποσοτικές μελέτες δομής δράσης, αν ο υποδοχέας είναι άγνωστος ⁴⁶

«Η Μοριακή Μοντελοποίηση μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σύνολο υπολογιστικών τεχνικών που βασίζονται στη Θεωρητική Χημεία, αλλά και σε πειραματικά δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της διαμόρφωσης, με σκοπό την πρόβλεψη των μοριακών, χημικών και βιοχημικών

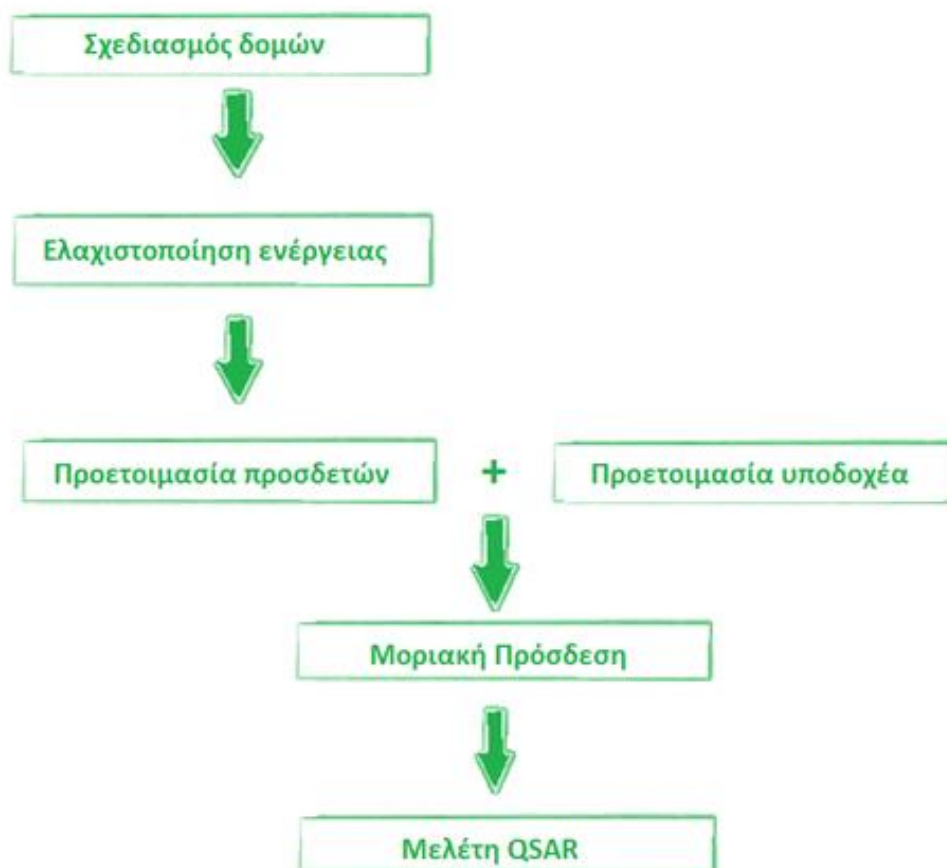
τους ιδιοτήτων. Μπορεί δηλαδή να αποτελέσει μια γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος». ⁴⁶

Οι δυνατότητες της Μοριακής Μοντελοποίησης συνοψίζονται στις ακόλουθες:

- ✓ τριδιάστατη αναπαράσταση της μοριακής δομής των μορίων
- ✓ χρήση μοριακών γραφικών για το χειρισμό του μοριακού συστήματος
- ✓ υπολογισμό και ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μοριακού συστήματος
- ✓ διαμορφωτική ανάλυση του μορίου
- ✓ προσομοίωση του μοριακού συστήματος
- ✓ υπολογισμό των μοριακών τροχιακών
- ✓ υπέρθεση μοριακών συστημάτων
- ✓ μελέτη πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς (molecular docking)
- ✓ μελέτη Ποσοτικών Σχέσεων Δομής – Δράσης (Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR)
- ✓ μελέτη μεταβολικών ιδιοτήτων ⁴⁶

Ο ερευνητικός αυτός κλάδος ή αλλιώς ο *in silico* ορθολογικός σχεδιασμός έχει εφαρμοστεί με επιτυχία τα τελευταία εικοσιπέντε χρόνια στην παραγωγή καινοτόμων φαρμάκων. Δύο προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στον Ορθολογικό Σχεδιασμό, οι οποίες είναι η Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) και οι Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR). Αυτές οι μεθοδολογίες χρησιμοποιούνται αυτόνομα ή σε συνδυασμό ανάλογα με το υπό μελέτη σύστημα. ^{46, 47, 48}

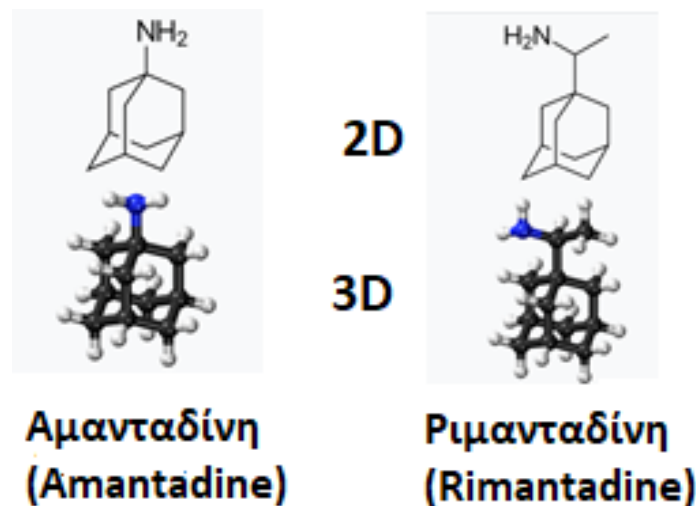
Η διαδικασία μελέτης μορίων με τη Μοριακή Πρόσδεση αλλά και με τις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια (Σχήμα 3.2):



Σχήμα 3.2 Στάδια μελέτης των μορίων που λαμβάνουν μέρος στην μοριακή πρόσδεση ή/και το QSAR ⁴⁷

3.2.1 Σχεδιασμός διδιάστατων και τριδιάστατων δομών

Ο σχεδιασμός των δομών, αρχικά διδιάστατος και στην πορεία τριδιάστατος (Σχήμα 3.3) πραγματοποιείται μέσω διαφόρων λογισμικών σχεδιασμού όπως ChemDraw, Isis Draw κ.ά. Προσοχή χρειάζεται στην στερεοδομή κατά τη δόμηση ώστε να μην προκύψει λανθασμένο ισομερές ή στερεοϊσομερές. Μοντέλα μοριακών συστημάτων, κυρίως πρωτεΐνες, μπορούν να αντληθούν μέσα από βάσεις δεδομένων κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ καθώς και NMR.^{45,46} Μια παγκόσμια βάση δεδομένων είναι η “Protein Data Bank (www.pdb.org)”, η οποία περιλαμβάνει οργανισμούς που επεξεργάζονται και διανέμουν κρυσταλλογραφικά δεδομένα PDB, με ελεύθερη πρόσβαση για όλον τον κόσμο.⁴⁷



Σχήμα 3.3 Η μετατροπή της διδιάστατης (2D) δομής της αμανταδίνης και ριμανταδίνης στην τριδιάστατη

3.2.2 Ελαχιστοποίηση ενέργειας

Κάθε μοριακό σύστημα περιέχει εσωτερική ενέργεια, η οποία αποτελείται από δύο συνιστώσες, την κινητική και τη δυναμική. Η κινητική ενέργεια (E_K) σχετίζεται με τη μάζα και την ταχύτητα του συστήματος, όσο μεγαλύτερη η μάζα και η ταχύτητα τόσο μεγαλύτερη κινητική ενέργεια μπορεί να παραχθεί. Η δυναμική ενέργεια (E_D) σχετίζεται με τη διαμόρφωση του μορίου, το οποίο προτιμά να βρίσκεται σε γεωμετρία ώστε να χαρακτηρίζεται από χαμηλή δυναμική ενέργεια. Η δυναμική ενέργεια προσδιορίζεται από τις ενδο- και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις αλλά και τις δυνάμεις που ασκούνται στο μοριακό σύστημα από το περιβάλλον.⁴⁶

Τα μόρια υιοθετούν διαμορφώσεις που χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένη εσωτερική ενέργεια, η οποία εξαρτάται μόνο από τη δυναμική ενέργεια καθώς η κινητική ενέργεια παραμένει ίδια για κάθε διαμόρφωση του μορίου. Ως εκ τούτου, κάθε διαμόρφωση αντιστοιχεί σε διαφορετική δυναμική ενέργεια, η οποία εξαρτάται από τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις του μορίου.⁴⁶

Στη Μοριακή Μοντελοποίηση, προκειμένου να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των διαμορφώσεων του μορίου εφαρμόζονται αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας (minimization algorithms).⁴⁶ Ιδανικότερος αλγόριθμος ενέργειας

θεωρείται αυτός που στο μικρότερο χρόνο προσεγγίζει το τοπικό ενεργειακό ελάχιστο.^{46, 47}

3.3 Επιπλέον εργαλεία προετοιμασίας δομών

Ένα βήμα πριν τη μοριακή πρόσδεση είναι η κατάλληλη προετοιμασία του υποδοχέα αλλά και του μορίου που πρόκειται να συνδεθεί.⁴⁷ Η εταιρεία Schrodinger προσφέρει δύο εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την εν λόγω προετοιμασία (πρωτεΐνης και υποδοχέα), τα οποία παρουσιάζονται κάτωθι.⁴⁷

- **Η εφαρμογή προετοιμασίας πρωτεϊνών (Protein Preparation Wizard)**

Οι τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών έχουν αντληθεί από μια τράπεζα δεδομένων ως PDB αρχεία. Αυτά τα αρχεία πρέπει να πρώτα να προετοιμαστούν δεδομένου της ακαταλληλότητάς τους να χρησιμοποιηθούν στους *in silico* υπολογισμούς. Ένα τυπικό αρχείο PDB δίνει πληροφορίες για τα άτομα του άνθρακα, οξυγόνου, αζώτου και θείου του υποδοχέα-πρωτεΐνης, για τον προσδέτη (στην περίπτωση που είναι συγκρυσταλλωμένος με την πρωτεΐνη), για τα μέταλλα (στην περίπτωση μεταλλοπρωτεϊνών) καθώς και για μόρια ύδατος (μόνο για το άτομο του οξυγόνου).⁴⁷ Σημειώνεται ότι σε μια X-ray κρυσταλλογραφία δεν αποτυπώνονται τα άτομα υδρογόνου, με αποτέλεσμα να μην αντλείται καμία πληροφορία για τον ιοντισμό και την ταυτομέρεια κάποιων αμινοξέων όπως της H, του D και του E.⁴⁷ Τέτοιου είδους προβλήματα λύνονται με την εφαρμογή του Protein Preparation Wizard, η οποία παρέχει μια σειρά αυτοματοποιημένων βημάτων (Σχήμα 3.4) για την προετοιμασία των αρχείων PDB δίνοντας υψηλής ποιότητας τρισδιάστατες δομές για τους υπολογισμούς μοντελοποίησης.⁴⁷

Βήματα Protein Preparation Wizard

1. Προσδιορισμός της τάξης των δεσμών (assign bond orders)
2. Προσθήκη ατόμων υδρογόνου (add hydrogens)
3. Έλεγχος μετάλλων (treat metals)
4. Έλεγχος δισουλφιδικών δεσμών (treat disulphides)
5. Ανίχνευση επικαλύψεων (find overlaps)
6. Διαγραφή μορίων ύδατος (delete waters)
7. Δημιουργία ετεροκαταστάσεων (generate het states)
8. Βελτιστοποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου (optimization of hydrogen bonding network)
9. Διαδικασία βελτιστοποίησης της δομής (optimizing the structure)

Σχήμα 3.4 Αυτοματοποιημένα βήματα της εφαρμογής Protein Preparation Wizard ⁴⁷

- **Η εφαρμογή προετοιμασίας προσδετών (LigPrep)**

Η συγκεκριμένη εφαρμογή είναι μια συλλογή εργαλείων μοντελοποίησης για την προετοιμασία υψηλής ποιότητας μεγάλου αριθμού τρισδιάστατων μοριακών δομών, οι οποίες μπορεί να προκύψουν είτε ξεκινώντας από διδιάστατες είτε από τρισδιάστατες δομές. Οι τριδιάστατες δομές που προκύπτουν χαρακτηρίζονται από χαμηλή ενέργεια, κατάλληλη στερεοχημεία και ιοντισμό. Τα βήματα της εφαρμογής περιγράφονται στο Σχήμα 3.5.⁴⁷

Βήματα LigPrep

1. Μετατροπή δισδιάστατων δομών σε τρισδιάστατες
2. Προσθήκη ατόμων υδρογόνου (add hydrogen atoms)
3. Απομάκρυνση μη επιθυμητών μοριακών δομών (remove unwanted molecules)
4. Ουδετεροποίηση φορτισμένων ομάδων (neutralize charged groups)
5. Δημιουργία καταστάσεων ιοντισμού (generate ionization states)
6. Δημιουργία ταυτομερών (generate tautomers)
7. Φιλτράρισμα δομών (filter the structures)
8. Δημιουργία εναλλακτικών χειρόμορφων κέντρων (generate alternative chiralities)
9. Δημιουργία χαμηλής ενέργειας διαμορφώσεων των μη αρωματικών δακτυλίων (generate low-energy ring conformations)
10. Απομάκρυνση των προβληματικών μοριακών δομών (remove problematic structures)
11. Βελτιστοποίηση της μοριακής δομής (optimize the geometry)

Σχήμα 3.5 Τα αυτοματοποιημένα βήματα της εφαρμογής LigPrep ⁴⁷

3.4 Μοριακή Πρόσδεση

Ως μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) ορίζεται η πρόβλεψη της δομής του συμπλόκου, το οποίο προκύπτει από την πρόσδεση ενός μορίου προσδέτη σε ένα μεγαλύτερο μόριο υποδοχέα.⁴⁶ Ο υποδοχέας μπορεί να είναι ένα ένζυμο, μια πρωτεΐνη ή ακόμα και τμήμα της έλικας του DNA ενώ ο προσδέτης ένα φαρμακευτικό ή δυνάμει φαρμακευτικό μόριο.^{46, 47} Μέσω αυτής της πρόσδεσης γίνεται γνώση των αλληλεπιδράσεων του φαρμακευτικού μορίου με τον υποδοχέα και έτσι επιτρέπεται η σχεδιασμός καινοτόμων προϊόντων με βελτιωμένη φαρμακευτική δράση.⁴⁶

Η μοριακή πρόσδεση πραγματοποιείται υπολογιστικά μέσω ηλεκτρονικών υπολογιστών από αλγόριθμους μοριακής πρόσδεσης (Surflex-Dock, GLIDE, GOLD κ.ά.), όπου κάθε αλγόριθμος ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του

διαφοροποιεί τη διαδικασία πρόσδεσης.^{46, 47} Τρία σημεία είναι κοινά σε όλους τους αλγόριθμους μοριακής πρόσδεσης:

- i. **Η ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη**, η οποία πραγματοποιείται δημιουργώντας πολλές διαφορετικές διαμορφώσεις του προσδέτη, αποθηκεύοντας τις σε μια βάση δεδομένων και έπειτα πραγματοποιείται άκαμπτη πρόσδεση κάθε μιας στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.
- ii. **Ο σχηματισμός του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη**, σε κάθε αλγόριθμο χρησιμοποιείται διαφορετική μεθοδολογία για να τοπογραφηθεί το ενεργό κέντρο του υποδοχέα, η οποία εξαρτάται από τον προσδιορισμό των πεδίων που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο κάποιου υποδοχέα και τα οποία θα καθορίσουν τις αλληλεπιδράσεις του προσδέτη με αυτό. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη δημιουργία ενός αρχείου που αποτελεί την υπολογιστική απεικόνιση του ενεργού κέντρου του υποδοχέα. Παράδειγμα ο αλγόριθμος GLIDE δημιουργεί το αρχείο “grid”.
- iii. **Η βαθμολόγηση της πρόσδεσης**, εννοώντας τον υπολογισμό της ενέργειας πρόσδεσης κάνοντας χρήση της συνάρτησης υπολογισμού της ενέργειας πρόσδεσης που διαφοροποιείται από τον εκάστοτε αλγόριθμο.^{46, 47} Σκοπός είναι να επιτευχθεί πρόσδεση με το μέγιστο αριθμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ενέργεια πρόσδεσης, $E_{\text{πρόσδεσης}}$, που περιγράφεται από την εξίσωση:

$$E_{\text{πρόσδεσης}} = EEI + EII + EHI + ECII + E^*$$

Όπου:

EEI: Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Electrostatic interactions)

EII: Επαγωγικές αλληλεπιδράσεις (Inductive Interactions)

EHI: Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Hydrophobic Interactions)

ECI: Συνδυασμένες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (Combined Intermolecular Interactions).

E*: Απώλεια ενέργειας ή εντροπίας κατά τη σύνδεση υποδοχέα-προσδέτη.⁴⁸

3.4.1 Αλγόριθμοι μοριακής πρόσδεσης

Υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι στους οποίους χρησιμοποιούνται διαφορετικοί παράμετροι (για παράδειγμα δυνάμεις Coulomb και Van der Waals, δεσμοί υδρογόνου) ώστε να βαθμολογηθεί το μοτίβο μοριακής πρόσδεσης των διαφόρων υπό μελέτη ενώσεων.⁴⁸

3.4.1.1 Αλγόριθμοι Monte Carlo

Στους συγκεκριμένους αλγόριθμους τοποθετείται το μόριο με τυχαίο τρόπο στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα και πραγματοποιούνται τυχαίες αλλαγές στην περιστροφή δεσμών και στις δίεδρες γωνίες του. Ύστερα από κάθε βήμα ακολουθεί ελαχιστοποίηση της ενέργειας του μορίου. Το πλεονέκτημα αυτών των αλγόριθμων είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια απλή συνάρτηση ενέργειας, η οποία δεν απαιτεί πληροφορίες από κάποια συνάρτηση παράγωγου.⁴⁶

3.4.1.2 Αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής

Οι αλγόριθμοι Μοριακής Δυναμικής στηρίζονται στην επίλυση των εξισώσεων κίνησης του Νεύτωνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, σε αντίθεση με τον αλγόριθμο Monte Carlo, την παγίδευση του μορίου σε τοπικά ελάχιστα, καθώς δεν μπορεί να υπερπηδήσει φράγματα μεγαλύτερα των 1-2 Kcal.⁴⁶

3.4.1.3 Γενετικοί Αλγόριθμοι

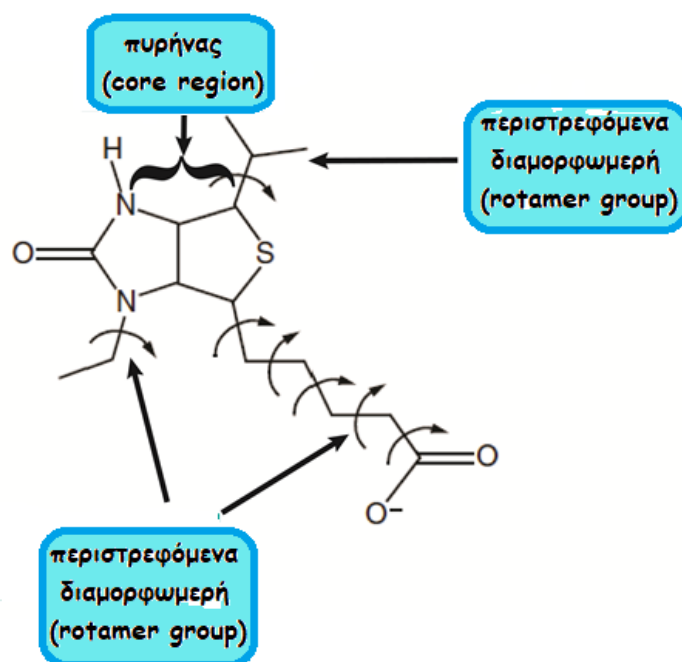
Κατά τη χρήση των γενετικών αλγόριθμων (Genetic Algorithms, GA), η ευκαμψία του προσδέτη γύρω από τους δεσμούς περιστροφής του κωδικοποιείται σε γονίδια. Οι ευνοϊκότερα ενεργειακά λύσεις που προκύπτουν χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο, δηλαδή αναπαράγονται στην επόμενη γενιά λύσεων και λαμβάνουν μια τυχαία μετάλλαξη και διασταύρωση. Το αποτέλεσμα της πρόσδεσης επηρεάζεται από το μέγεθος του πληθυσμού και τη συχνότητα των διασταυρώσεων και των μεταλλάξεων. Οι αλγόριθμοι GOLD και Autodock 4.0 αποτελούν παραδείγματα γενετικών αλγορίθμων μοριακής πρόσδεσης.⁴⁶

3.4.2 Ο αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης GLIDE

Ένας από τους συχνότερους χρησιμοποιούμενους αλγορίθμους μοριακής πρόσδεσης είναι το GLIDE (Grid-based Ligand Docking with Energetics) του πακέτου λογισμικού Maestro της εταιρείας Schrödinger.^{47, 48} Η μοριακή πρόσδεση με το GLIDE μπορεί να γίνει θεωρώντας τον προσδέτη άκαμπτο ή εύκαμπτο ενώ ο υποδοχέας παραμένει άκαμπτος (επιτρέπεται μόνο η περιστροφή ορισμένων υδροξυλομάδων).^{47, 48} Εάν επιλεγεί ο προσδέτης να είναι άκαμπτος τότε αυτός προσδένεται στον υποδοχέα ως έχει, ενώ αν επιλεγεί να είναι εύκαμπτος δημιουργείται ένα σύνολο διαμορφώσεων που μπορεί να αποκτήσει πριν την έναρξη της πρόσδεσης.⁴⁸ Οι πόζες που δημιουργούνται από τη χρήση του προγράμματος περνούν μέσα από μια σειρά φίλτρων ιεράρχησης που εκτιμάται και αξιολογείται.⁴⁸ Στα αρχικά φίλτρα ελέγχεται το μέγεθος του προσδέτη και η συμπληρωματικότητα των αλληλεπιδράσεων του με το ενεργό κέντρο του ενζύμου χρησιμοποιώντας μια μέθοδο πλέγματος (grid-based) βασισμένη στην εμπειρική συνάρτηση ChemScore.^{47, 48} Στον αλγόριθμο GLIDE, θεωρώντας δεδομένη την ευκαμψία του προσδέτη, πραγματοποιείται εκτεταμένη αναζήτηση διαμορφώσεων και απορρίπτονται διαμορφώσεις που δεν προσαρμόζονται στην πρωτεϊνική κοιλότητα που μελετάται.⁴⁸

➤ **Ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη**

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη είναι Monte Carlo.^{46, 47, 48} Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία ο κάθε προσδέτης χωρίζεται σε διάφορες νοητές περιοχές που περιλαμβάνουν την περιοχή του πυρήνα (core region) και τις περιστρεφόμενες ομάδες (rotamer groups).^{46, 47, 48} Κάθε περιστρεφόμενη ομάδα συνδέεται με τον πυρήνα μέσω ενός περιστρεφόμενου δεσμού. Ως πυρήνας ορίζεται το άκαμπτο τμήμα του μορίου που παραμένει εάν αφαιρεθούν όλα τα τμήματα του μορίου που δυνάμει περιστρέφονται (Σχήμα 3.6).^{46, 47, 48}



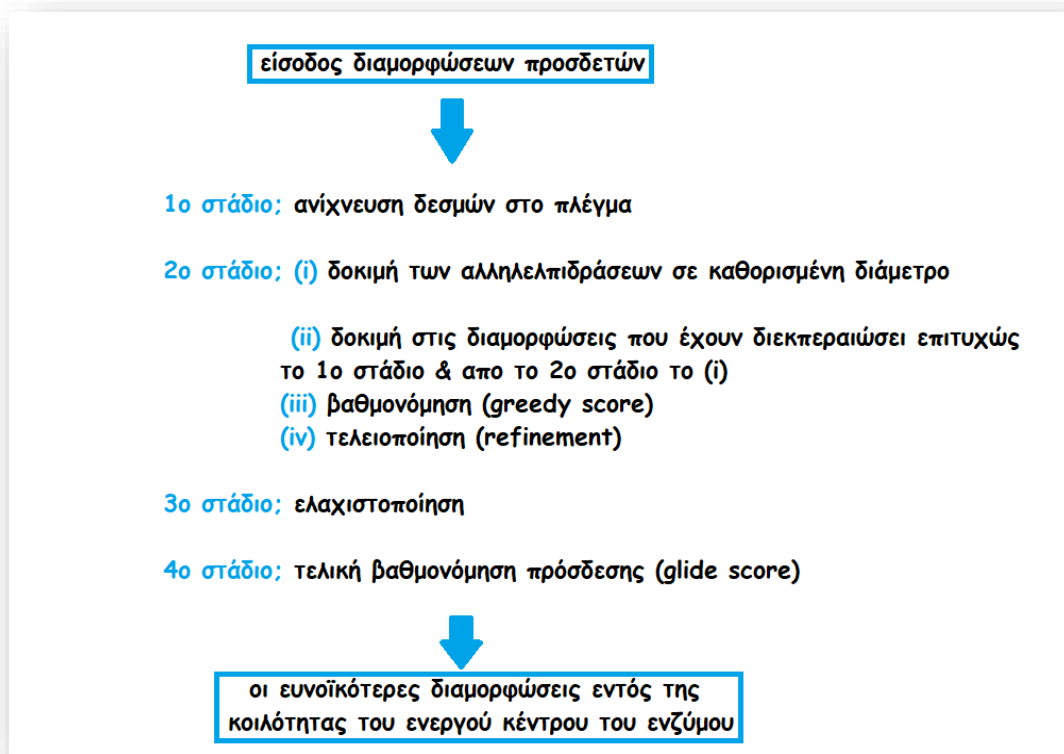
Σχήμα 3.6 Προσδιορισμός περιοχών πυρήνα (core region) και περιστρεφόμενων ομάδων (rotamer groups) ⁴⁸

➤ **Τοποθέτηση του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα**

Κατά τη μοριακή πρόσδεση το εύκαμπτο τμήμα του μορίου προσαρμόζεται στο ενεργό κέντρο δημιουργώντας ένα σύνολο πιθανών διαμορφώσεων, οι οποίες στη συνέχεια αξιολογούνται από το λογισμικό ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους. Οι διαμορφώσεις με την ισχυρότερη ικανότητα πρόσδεσης, με βάση τα φίλτρα αξιολόγησης του προγράμματος, ελαχιστοποιούνται ενεργειακά και επανεξετάζονται ως προς τις γωνίες των δεσμών τους με σκοπό να βρεθεί μια ακόμα πιο ευνοϊκή διαμόρφωση ενεργειακά.⁴⁸

➤ **Η συνάρτηση βαθμονόμησης**

Το σύνολο των δομών με την πιο ικανοποιητική διαμόρφωση ενεργειακά αξιολογείται από τη συνάρτηση GlideScore (GS) και λαμβάνει την τελική βαθμολογία πρόσδεσης, όσο πιο αρνητική είναι η βαθμολογία τόσο πιο ισχυρή είναι η πρόσδεση του μορίου στον υποδοχέα (Σχήμα 3.7).^{47,48}



Σχήμα 3.7 Τα στάδια αξιολόγησης προσδετών με τη χρήση του αλγορίθμου GLIDE ⁴⁸

Με τη συνάρτηση GlideScore υπολογίζεται το σύνολο των επιμέρους αθροισμάτων, το οποίο προκύπτει από τις ακόλουθες συνισταμένες:

- **vdW**: ενέργεια αλληλεπιδράσεων Van der Waals. Υπολογίζεται με μειωμένα ολικά ιοντικά φορτία σε ομάδες με πλήρες φορτίο όπως μέταλλα, ομάδες καρβοξυλίου και γουανιδινικές ομάδες.
- **Coul**: ενέργεια Coulomb. Δίνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των ολικών ατομικών φορτίων.
- **Lipo**: όρος για υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.
- **Hbond**: όρος για τους δεσμούς υδρογόνου. Περιλαμβάνει παραμέτρους ανάλογα με την ιοντική κατάσταση του δότη και του δέκτη.
- **Metal**: όρος για την πρόσδεση του μετάλλου. Περιλαμβάνει μόνο αλληλεπιδράσεις με ανιοντικά άτομα (δέκτες).
- **BuryP**: μη ευνοϊκή βαθμολόγηση των απώσεων των πολικών ομάδων.

- **RotB**: μη ευνοϊκή βαθμολόγηση για ακινητοποιημένους περιστρεφόμενους δεσμούς.
- **Site**: ενέργεια πολικών αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Βαθμολογούνται θετικά οι πολικές αλληλεπιδράσεις (δεν περιλαμβάνονται οι δεσμοί υδρογόνου) σε υδρόφοβο περιβάλλον.

Λαμβάνοντας υπ' όψη τις παραπάνω παραμέτρους, η βαθμολογία πρόσδεσης **GScore** προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

$$\mathbf{GScore} = 0.065 * \mathbf{vdW} + 0,130 * \mathbf{Coul} + \mathbf{Lipo} + \mathbf{Hbond} + \mathbf{Metal} + \mathbf{BuryP} + \mathbf{RotB} + \mathbf{Site}$$

Κατά τη διάρκεια ενός πειράματος μοριακής πρόσδεσης στο GLIDE, μπορούν να εφαρμοστούν τρία επίπεδα ακριβείας:

Πρώτο επίπεδο: Το επίπεδο σάρωσης υψηλού ρυθμού απόδοσης **HTVS** (High Throughput Virtual Screening), είναι κατάλληλο για μεγάλες βιβλιοθήκες δεδομένων λόγω της ταχείας διεκπεραίωσης. Με τη βοήθεια αυτού του επιπέδου μπορούν να αναγνωριστούν βιοενεργά προϊόντα από μια μεγάλη χημική βιβλιοθήκη με ακρίβεια και σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Η ικανότητα να αναγνωριστούν αυτά τα βιοενεργά προϊόντα εξαρτάται κυρίως από την καταλληλότητα και την ποιότητα των βιβλιοθηκών που χρησιμοποιούνται στο εκάστοτε πείραμα.

Δεύτερο επίπεδο: Το επίπεδο **SP** (Standard Precision) με το οποίο παρέχεται υψηλότερος βαθμός ακριβείας αλλά είναι επίσης ταχύ στη διεκπεραίωση.

Τρίτο επίπεδο: Το επίπεδο **XP** (Extra Precision), μια βελτιωμένη λειτουργία στο λογισμικό της μοριακής πρόσδεσης GLIDE, η οποία παρέχει υψηλή ακρίβεια αλλά απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος για τη διεκπεραίωση των υπολογισμών. Η συνάρτηση βαθμονόμησης στο λογισμικό XP Glide παρέχεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$\mathbf{XP\ Glide\ Score} = \mathbf{E_{coul}} + \mathbf{E_{vdW}} + \mathbf{E_{bind}} + \mathbf{E_{penalty}}$$

Οι όροι που προσδιορίζουν μια ευνοϊκή πρόσδεση είναι:

$$\mathbf{E_{bind}} = \mathbf{E_{hyd_enclosure}} + \mathbf{E_{hb_nn_motif}} + \mathbf{E_{hb_cc_motif}} + \mathbf{E_{PI}} + \mathbf{E_{hb_pair}} + \mathbf{E_{phobic_pair}}$$

Οι όροι που παρεμποδίζουν την πρόσδεση είναι:

$$E_{\text{penalty}} = E_{\text{desolv}} + E_{\text{ligand_strain}}$$

Όπου:

- $E_{\text{hyd_enclosure}}$ = Ενέργεια υδροφοβικού εγκλεισμού (Hydrophobic enclosure reward)
- $E_{\text{hb_nn_motif}}$ = Ενέργεια υδρογονικών δεσμών από ουδέτερα άτομα
- $E_{\text{hb_cc_motif}}$ = Ενέργεια υδρογονικών δεσμών από φορτισμένα άτομα (ChemScore H-bond term)
- E_{PI} = Ενέργεια π-κατιοντικών αλληλεπιδράσεων (π-cation interactions)
- $E_{\text{hb_pair}} + E_{\text{phobic_pair}}$ = Ενέργεια ζευγών ατόμων που εμπλέκονται σε υδρογονικούς δεσμούς και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αντίστοιχα.

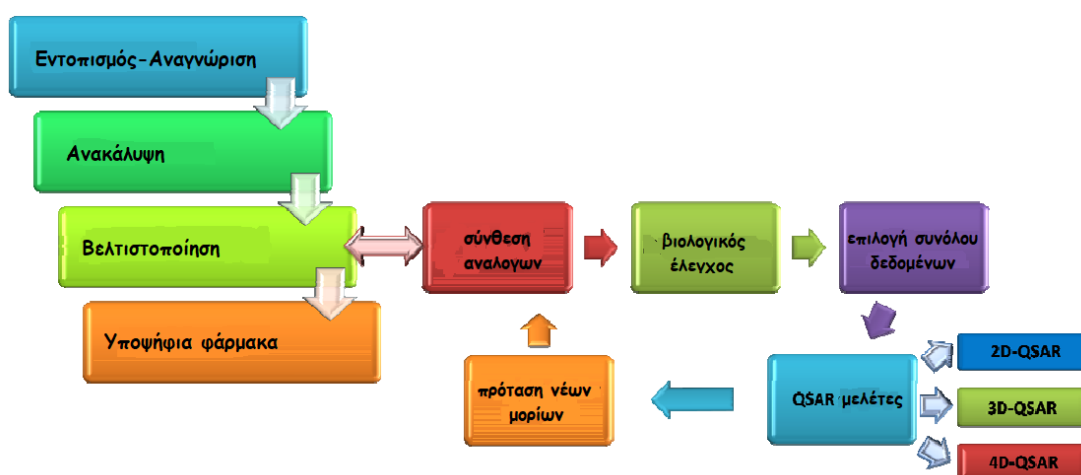
Παρ' όλο που το επίπεδο ΧΡ απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί, χρησιμοποιείται συχνότερα λόγω της υψηλής ακρίβειας των αποτελεσμάτων που παρέχει η εφαρμογή του, της ικανότητας του να απορρίπτει εσφαλμένες «θετικές» βαθμολογίες (false positives) και του ορθού συσχετισμού μεταξύ επιτυχών λύσεων και επιτυχούς βαθμολογίας (GlideScore). Κατά την εφαρμογή της μεθόδου ΧΡ, στον αλγόριθμο τοποθετούνται αρχικά τμήματα του προσδέτη στο ενεργό κέντρο και δομείται το μόριο δεσμό προς δεσμό. Οι λύσεις που προκύπτουν, υποβάλλονται σε ελαχιστοποίηση ενέργειας και αξιολογούνται από τη συνάρτηση βαθμολόγησης ΧΡ.^{47, 48}

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και συνδυασμός των μεθόδων SP και ΧΡ, λαμβάνοντας αρχικά ικανό αριθμό διαμορφώσεων προσδεμένων στο ενεργό κέντρο, έπειτα επιλογή των ευνοϊκότερων συμπλόκων προσδέτη-υποδοχέα που σχηματίστηκαν και εφαρμογή σε αυτά του επιπέδου ΧΡ για βελτιωμένα αποτελέσματα.⁴⁸

3.5 Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης

Με τον όρο QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships), εννοούμε τις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης, οι οποίες αποσκοπούν στην εξαγωγή μοντέλων ή εξισώσεων που συσχετίζουν τη βιολογική δράση με τη δομή, αντλώντας και αξιοποιώντας όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες με

χρήση λιγότερων πειραμάτων.⁴⁹ Οι Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης κατατάσσονται στις πρώτες προσπάθειες για την ανάπτυξη του ορθολογικού σχεδιασμού.⁴⁷ Σκοπός αυτών των μοντέλων είναι να συμβάλλουν σημαντικά στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης των φαρμακομορίων, γι' αυτό έχουν προσφέρει καθοριστικά στη δημιουργία νέων αντιλήψεων για το σχεδιασμό φαρμάκων. Ουσιαστικά, οι Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης στοχεύουν στην πρόβλεψη της δράσης, η οποία θα κατευθύνει τον φαρμακοχημικό ώστε να συνθέσει ή όχι νέα παράγωγα.⁴⁹ Αξίζει να σημειωθεί ότι με τη μέθοδο QSAR επιτυγχάνεται να ελαχιστοποιείται η θυσία των πειραματόζωνων αλλά και το περιβάλλον να επιβαρύνεται λιγότερο. Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται περιγράφονται στο Σχήμα 3.8.^{47, 50}



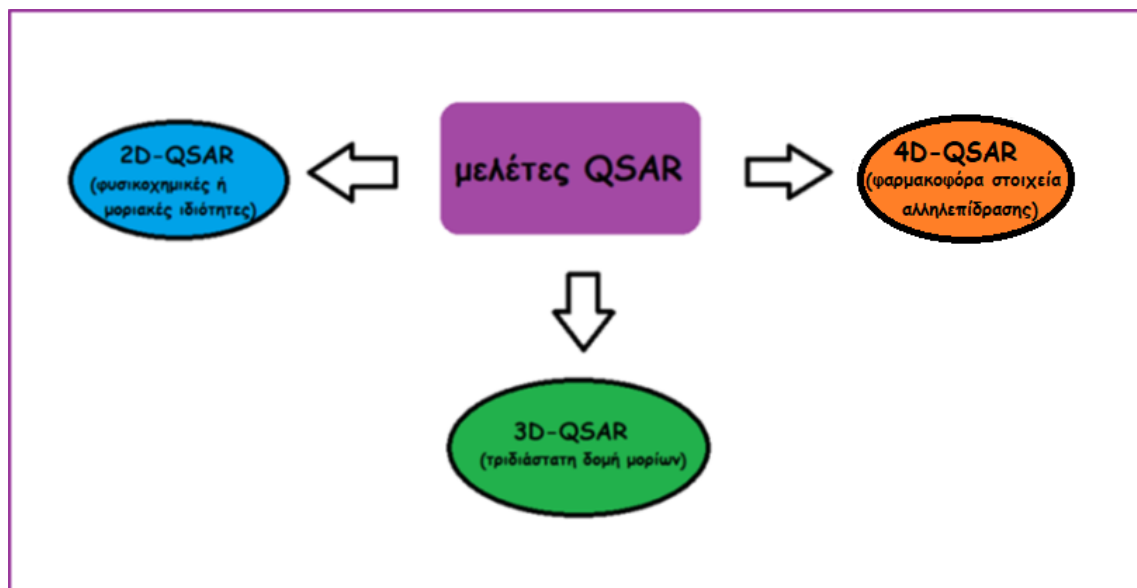
Σχήμα 3.8 Τα βήματα της διαδικασίας που ακολουθούνται από τον εντοπισμό του στόχου έως την ανακάλυψη νέων φαρμάκων ⁵⁰

3.5.1. Ιστορική αναδρομή

Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα οι Crum-Brown και Frazer διατύπωσαν την άποψη ότι η βιολογική δράση σχετίζεται με τη δομή των χημικών ενώσεων.^{47, 49} Την ίδια περίοδο οι Mayer και Overton απέδειξαν ότι η αναισθητική δράση μιας ομάδας οργανικών ενώσεων μεταβάλλεται ανάλογα με τον συντελεστή μερισμού τους σε ελαιόλαδο/ύδωρ, διατυπώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη σχέση της λιποφιλίας με τη γενική αναισθητική δράση.^{47, 49} Το 1939, ο Ferguson εισήγαγε τη θερμοδυναμική ενεργότητα ως μέτρο σύγκρισης της δράσης γενικών αναισθητικών και αντιμικροβιακών ενώσεων.^{47, 49, 51}

Τη δεκαετία του 1930, ο Hammett εισήγαγε τις ηλεκτρονιακές σταθερές σ , κάνοντας ένα σημαντικό βήμα προς την ποσοτικοποίηση της επίδρασης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη δράση.⁴⁹ Σημειώνεται ότι οι ηλεκτρονιακές σταθερές εκφράζουν την επίδραση που ασκείται στους υποκαταστάτες των οργανικών μορίων στο ρυθμό μιας χημικής αντίδρασης, η οποία επίδραση σύμφωνα με τον Hammett είναι σταθερή για κάθε υποκαταστάτη και για συγκεκριμένη αντίδραση.⁴⁹ Τη δεκαετία του 1950, ο Taft πρότεινε μια τροποποίηση στην εξίσωση του Hammett, εισάγοντας τη στερική σταθερά υποκατάστασης E_s , λαμβάνοντας και τα στερικά φαινόμενα που προκαλούνται από τους υποκαταστάτες και επηρεάζουν το ρυθμό μιας αντίδρασης.⁴⁹

Το 1962, οι Hansch και Fujita ανέπτυξαν το πρώτο μοντέλο Ποσοτικών Σχέσεων Δομής – Δράσης (QSAR).^{47,49} Βασίστηκαν στην ιδέα ότι η προσέγγιση των Hammett και Taft μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της βιολογικής δράσης έχοντας ως αφητηρία μια ένωση-οδηγό, η οποία φέρει τη φαρμακοφόρο δομή.⁴⁹ Το 1964 δημοσιεύθηκε για πρώτη φορά από τους ίδιους, η πρώτη εφαρμογή ποσοτικής συσχέτισης της βιολογικής δράσης με τη χημική δομή με τη βοήθεια της στατιστικής, αποτελώντας τομή για την ανάπτυξη των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής – Δράσης ως νέο ερευνητικό πεδίο για το σχεδιασμό φαρμάκων.^{47, 49} Το 1988, ο Cramer ήταν ο πρώτος που εισήγαγε τις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης τριών διαστάσεων (3D-QSAR, 3 Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships), οι οποίες βασίζονται στη τριδιάστατη δομή των ενώσεων.⁵² Το 1997, ο Hopfinger και οι συνεργάτες του πρότειναν τις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης τεσσάρων διαστάσεων (4D-QSAR) ως μια εξέλιξη του 3D-QSAR χρησιμοποιώντας τους περιγραφικούς δείκτες πληρότητας των κυψελίδων του πλέγματος.^{50, 55}



Σχήμα 3.9 Οι κατηγορίες των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης

3.5.2 Ανάλυση Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης, QSAR

Στόχος της τεχνικής QSAR είναι η εύρεση μιας γραμμικής εξίσωσης τύπου (1) ανάμεσα σε μια συγκεκριμένη βιολογική δράση/δραστητικότητα, η οποία αποτελεί την εξαρτημένη μεταβλητή (μεταβλητή απόκρισης) και στα δομικά χαρακτηριστικά μιας σειράς παρόμοιων δομικά μορίων, τα οποία έχουν προκύψει από την ίδια ένωση-οδηγό αφού έχουν υποστεί τις κατάλληλες δομικές τροποποιήσεις.

$$\text{Βιολογική δράση} = \alpha_0 + (\alpha_1 \cdot P_1) + (\alpha_2 \cdot P_2) + \dots + (\alpha_n \cdot P_n) \quad (1)$$

Όπου,

$P_1 - P_n$: παράμετροι που εκφράζουν συγκεκριμένες ιδιότητες των μορίων (περιγραφικές μεταβλητές, descriptors)

$\alpha_0 - \alpha_n$: συντελεστές που εξάγονται με τη χρήση γραμμικής ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης.

Οι εξισώσεις του τύπου (1) συνοδεύονται πάντα από στατιστικά στοιχεία. Αυτά είναι ο συντελεστής συσχέτισης r (r^2), η τυπική απόκλιση (s), η δοκιμασία Fisher, τα οποία βοηθούν στην αξιολόγηση και αξιοπιστία του μοντέλου.⁴⁷

Η αξιοπιστία ενός μοντέλου QSAR επηρεάζεται από την επιλογή των δεδομένων, η οποία πρέπει να γίνεται προσεκτικά.^{47, 49} Ο αριθμός των

ενώσεων θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερος και θα πρέπει να δρουν όλες στον ίδιο υποδοχέα με τον ίδιο μηχανισμό δράσης. Ακόμη, οι τιμές της βιολογικής τους δράσης (IC_{50} , EC_{50} , K_i , κ.ά.) θα πρέπει να κατανέμονται σε ένα μεγάλο εύρος, από πολύ χαμηλές έως πολύ υψηλές τιμές δραστηριότητας.

3.5.3 Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης τριών διαστάσεων (3D-QSAR)

Η πρώτη μέθοδος 3D-QSAR ονομάστηκε Συγκριτική Ανάλυση Μοριακών Πεδίων (**C**omparative **M**olecular **F**ield **A**nalysis, CoMFA), η οποία, όπως προαναφέρθηκε, αναπτύχθηκε το 1988 από τον Cramer. Οι κλασσικές μελέτες QSAR (και 2D-QSAR) συσχετίζουν τη βιολογική δράση των φαρμάκων με φυσικοχημικές ή μοριακές ιδιότητες μη λαμβάνοντας υπόψη τη τριδιάστατη δομή ή τη χειρομορφία των μορίων. Στις 3D-QSAR μελέτες συγκρίνονται τα μόρια μεταξύ τους με βάση της τριδιάστατης δομής τους, όπου υπολογίζονται τα μοριακά πεδία και έπειτα αντιστοιχούνται με τις μοριακές αλληλεπιδράσεις. Το μοντέλο που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει τη βιολογική δράση κι άλλων μορίων. Ακόμα, παρέχει πληροφορίες για την επίδραση των μοριακών πεδίων στην πρόσδεση με τον υποδοχέα.⁴⁹ Σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μέσω γραφικών απεικονίσεων (ισοϋψών χαρτών) που φαίνεται η συμβολή των επιμέρους αλληλεπιδράσεων στη δράση.^{47, 49}

Τα πεδία που χρησιμοποιούνται στη μεθοδολογία CoMFA υπόκεινται σε κάποιους περιορισμούς. Για την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών αναπτύχθηκε από τον Klebe η μεθοδολογία CoMSIA (**C**omparative **M**olecular **S**imilarity **I**ndices **A**nalysis) δηλαδή η Συγκριτική Ανάλυση Δεικτών Μοριακής Ομοιότητας.

3.5.4 Οι μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA

Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον στις μελέτες 3D-QSAR είναι η μεθοδολογία CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis – Συγκριτική Ανάλυση Μοριακών Πεδίων) και η μεθοδολογία CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis – Συγκριτική Ανάλυση

Δεικτών Μοριακής Ομοιότητας), οι οποίες βασίζονται στην τριδιάστατη δομή των ενώσεων και τη βιολογική δραστικότητα που εμφανίζουν.

Η μεθοδολογία CoMFA παρουσίαζε κάποιους περιορισμούς όπως για παράδειγμα ότι η επίδραση της εντροπίας δεν λαμβάνεται υπ'όψιν ή λαμβάνεται μη ικανοποιητικά.⁵² Για την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών αναπτύχθηκε η μεθοδολογία CoMSIA, η οποία στην ουσία αποτελεί επέκταση της μεθοδολογίας CoMFA. Η βασική τους διαφορά εντοπίζεται στο ότι η μεθοδολογία CoMSIA χρησιμοποιεί δείκτες ομοιότητας (similarity indices) για τον υπολογισμό των περιγραφικών μεταβλητών ενώ η μεθοδολογία CoMFA χρησιμοποιεί μοριακά πεδία. Ακόμα, για την εξαγωγή μοντέλου 3D-QSAR μέσω της μεθοδολογίας CoMSIA λαμβάνονται υπ'όψιν περισσότερες μοριακές αλληλεπιδράσεις, υπολογίζονται επιπλέον οι υδρόφοβες συνεισφορές και η επίδραση της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (ως δότες και ως δέκτες) εκτός των ηλεκτροστατικών και στερικών αλληλεπιδράσεων που υπολογίζονται και στη μεθοδολογία CoMFA.⁴⁹

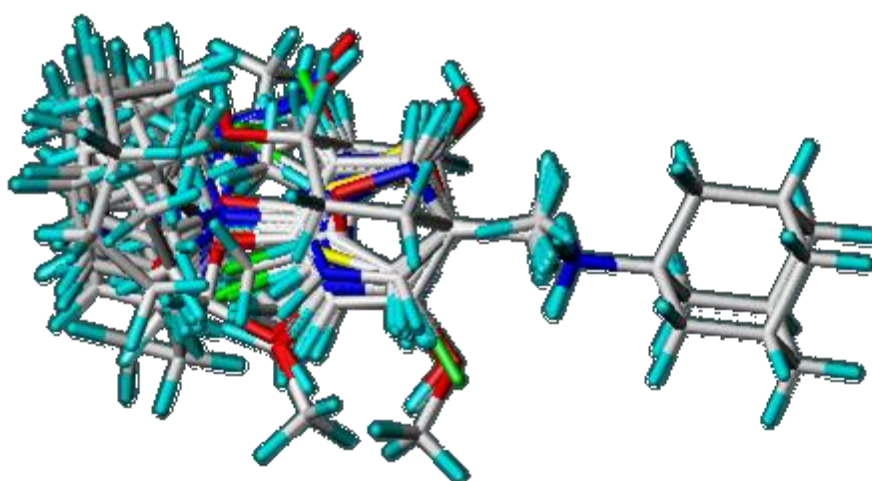
Οι δύο μεθοδολογίες, CoMFA και CoMSIA, περιλαμβάνουν οκτώ στάδια, τα οποία περιγράφονται ακολούθως.

1. Επιλογή δεδομένων. Τα μόρια που είναι υπό μελέτη πρέπει να παρουσιάζουν ίδιο μηχανισμό δράσης και να δρουν στον ίδιο υποδοχέα. Ακόμη, οι τιμές της βιολογικής τους δράσης πρέπει να εμφανίζουν μεγάλο εύρος.

2. Διαχωρισμός δεδομένων σε δύο ομάδες. Αρκετά σημαντικό βήμα, το οποίο απαιτεί μεγάλη προσοχή. Τα δεδομένα χωρίζονται στην ομάδα εκπαίδευσης ή εκμάθησης (training set) και στην ομάδα ελέγχου ή δοκιμής (test set). Ο διαχωρισμός γίνεται είτε τυχαία είτε με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού. Η ομάδα εκμάθησης θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή του 3D-QSAR μοντέλου ενώ η ομάδα ελέγχου για την αξιοπιστία του μοντέλου. Σημειώνεται ότι οι δύο ομάδες θα πρέπει να περιλαμβάνουν μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών και χαρακτηριστικών ομάδων αλλά και μεγάλο εύρος δραστικότητας. Συνήθως η αναλογία του διαχωρισμού τους είναι 70:30 (training set: test set) έως το πολύ 80:20.

3. Υπολογισμός σημειακών ατομικών φορτίων. Ένα βήμα πριν τον υπολογισμό των σημειακών ατομικών φορτίων είναι η επιλογή των ευνοϊκότερων ενεργειακά διαμορφώσεων, οι οποίες μπορεί να έχουν προκύψει μετά την πρόσδεσή τους (ή όχι) στον υποδοχέα. Για τον υπολογισμό των σημειακών ατομικών φορτίων συνήθως επιλέγεται η μέθοδος Gasteiger-Hückel, η οποία αποτελεί συνδυασμό των μεθόδων Gasteiger-Marsili για τον υπολογισμό της σ συνιστώσας του μερικού φορτίου και της μεθόδου Hückel για τον υπολογισμό της π συνιστώσας του μερικού φορτίου. Το άθροισμα αυτών των δύο φορτίων αποτελεί το τελικό σημειακό ατομικό φορτίο.

4. Ευθυγράμμιση (Alignment). Πρώτο βήμα για την ευθυγράμμιση των ενώσεων είναι η επιλογή της ένωσης που θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο (template molecule), συνήθως επιλέγεται η πιο δραστική και σχετικά δύσκαμπτη (Σχήμα 3.10). Εάν είναι γνωστός ο υποδοχέας και έχει προηγηθεί Μοριακή Πρόσδεση εφαρμόζεται η τεχνική ευθυγράμμισης βασισμένη στη δομή του υποδοχέα (structure-based alignment). Κατά την ευθυγράμμιση, κάθε μόριο τοποθετείται σε ένα εικονικό κύβο (box) που περιλαμβάνει ένα δικτυωτό πλέγμα (grid/lattice) και άτομα που λειτουργούν ως αισθητήρες (probe atoms) σε αποστάσεις 1 ή 2 Å μεταξύ τους. Στο μοντέλο CoMFA οι στεरिकές αλληλεπιδράσεις υπολογίζονται σύμφωνα με το δυναμικό Lennard-Jones, ενώ οι ηλεκτροστατικές σύμφωνα με το δυναμικό Coulomb.

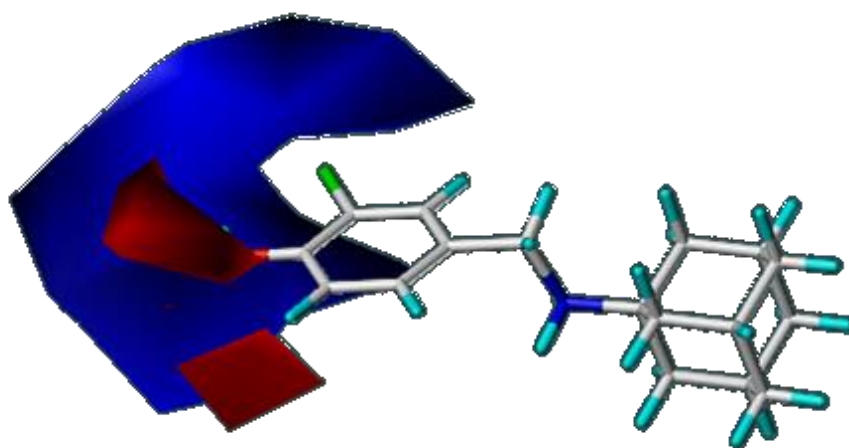


Σχήμα 3.10 Ευθυγράμμιση (Alignment) 65 αδαμαντανικών αναλόγων για την 3D-QSAR μελέτη

5. Εφαρμογή της μεθόδου των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square Analysis, PLS). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιείται με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, η οποία βασίζεται στη μέθοδο των προβολών και εξάγει κάποιες κύριες συνιστώσες που αποτελούν γραμμικό συνδυασμό πολλών μεταβλητών, στη μεθοδολογία CoMFA των στερικών και ηλεκτροστατικών πεδίων, στη μεθοδολογία CoMSIA των δεικτών ομοιότητας στα διάφορα σημεία του πλέγματος. Μια εξίσωση με χιλιάδες συντελεστές συνοδευόμενη από στατιστικά στοιχεία είναι το αποτέλεσμα της ανάλυσης. Παρουσιάζονται αναλυτικά τα βήματά της στην παράγραφο 3.5.4.1.

6. Αναπαράσταση αποτελεσμάτων. Πλεονέκτημα αυτών των μεθοδολογιών είναι η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων τους με τη μορφή τριδιάστατων ισοϋψών χαρτών (3D contour maps, Σχήμα 3.11). Σε αυτούς τους χάρτες παρουσιάζονται οι ευνοϊκότερες / και μη στερικές περιοχές γύρω από τα μόρια όπως επίσης οι ευνοϊκότερες / και μη περιοχές για ηλεκτροθετικούς ή ηλεκτραρνητικούς υποκαταστάτες σε ορισμένες θέσεις. Με αυτό τον τρόπο διαπιστώνεται ποια τμήματα της χημικής ένωσης επιδρούν στη δραστηριότητά της και μπορεί να την αυξήσουν ή να τη μειώσουν.

7. Έλεγχος αξιοπιστίας. Μέσω της αξιολόγησης των στατιστικών στοιχείων του μοντέλου ελέγχεται η αξιοπιστία αυτού. Εφαρμόζεται μια διαδικασία ελέγχου αξιοπιστίας με τη διαδικασία διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation) ώστε να διαπιστωθεί η εσωτερική ικανότητα πρόβλεψης (internal predictive ability) του μοντέλου.



Σχήμα 3.11 Αναπαράσταση αποτελεσμάτων ανάλυσης CoMFA με τη χρήση τριδιάστατων ισοϋψών χαρτών (3D contour maps)

8. Πρόβλεψη. Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιούνται οι προβλέψεις για τα μόρια της ομάδας ελέγχου (test set) ή για νέες δομές που δεν έχουν σχεδιαστεί και δεν υπάρχουν στο σύνολο των δεδομένων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα με απλή ποιοτική επισκόπηση των μοντέλων ή ποσοτικά υπολογίζοντας τα πεδία των μορίων, έπειτα εισαγωγή τους στο μοντέλο και υπολογισμός της βιολογικής τους δραστηριότητας. Στην παράγραφο 3.5.4.2 αναλύεται η διαδικασία.

3.5.4.1 Ανάλυση των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS)

Στις μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA η στατιστική ανάλυση πραγματοποιείται μέσω της ανάλυσης των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (**Partial Least Squares, PLS**).⁵⁴ Η συγκεκριμένη ανάλυση βασίζεται στη μέθοδο των προβολών εξάγοντας τις κύριες συνιστώσες, οι οποίες αποτελούν γραμμικό συνδυασμό πληθώρας μεταβλητών, στην περίπτωση της μεθοδολογίας CoMFA των ηλεκτροστατικών και στερικών πεδίων και στην περίπτωση της μεθοδολογίας CoMSIA των δεικτών ομοιότητας στα διάφορα σημεία του πλέγματος.⁴⁷ Η ανάλυση των μερικών ελαχίστων τετραγώνων καταλήγει σε μία εξίσωση με χιλιάδες συντελεστές, η οποία συνοδεύεται από στατιστικά στοιχεία. Η ανάλυση των μερικών ελαχίστων τετραγώνων πραγματοποιείται σε δύο στάδια:

- **1^ο στάδιο:** δημιουργούνται μοντέλα και εφαρμόζεται σε αυτά μια εσωτερική επικύρωση (cross validation) με τη χρήση της μεθόδου Leave-One-Out (LOO). Σύμφωνα με τη μέθοδο LOO, κάθε φορά εξάγεται μια ένωση από την ομάδα εκμάθησης και έπειτα η δραστικότητά της προβλέπεται από το μοντέλο που δημιουργήθηκε.^{54, 55, 56} Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται:

- i. ο συντελεστής διασταυρούμενης επικύρωσης r_{cv}^2 (ή Q^2), ο οποίος υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs} - Y_{pred})^2}{\sum(Y_{obs} - \bar{Y})^2}$$

Όπου,

Y_{obs} : η παρατηρούμενη τιμή βιολογικής δραστικότητας της ένωσης που παραλείπεται κάθε φορά από την ομάδα εκμάθησης

Y_{pred} : η προβλεπόμενη τιμή βιολογικής δραστικότητας της ένωσης που παραλείπεται κάθε φορά από την ομάδα εκμάθησης

\bar{Y} : ο μέσος όρος των παρατηρούμενων τιμών δραστικότητας της ομάδας εκμάθησης

- ii. το τυπικό σφάλμα των προβλέψεων της διασταυρούμενης επικύρωσης (Standard Error of Prediction, SEP)
- iii. ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών (Optimum Number of Components, ONC)

Ένα μοντέλο 3D-QSAR θεωρείται αποδεκτό όταν η τιμή του συντελεστή διασταυρούμενης επικύρωσης, Q^2 είναι μεγαλύτερη του 0,5.⁵⁵ Το μοντέλο με υψηλότερη τιμή Q^2 και τη χαμηλότερη τιμή SEP αναλύεται περαιτέρω.

- **2^ο στάδιο:** ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών που προέκυψε από το πρώτο στάδιο, χρησιμοποιείται για την εφαρμογή μιας άλλης μεθόδου, της μη διασταυρούμενης επικυρωμένης μεθόδου (No validation). Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζονται:

i. ο συντελεστής μη διασταυρούμενης επικύρωσης R^2_{ncv} (ή R^2), ο οποίος υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs} - Y_{calc})^2}{\sum(Y_{obs} - \bar{Y})^2}$$

Όπου,

Y_{obs} : η παρατηρούμενη τιμή βιολογικής δραστηριότητας της ένωσης που παραλείπεται κάθε φορά από την ομάδα εκμάθησης

Y_{calc} : η τιμή βιολογικής δραστηριότητας της ένωσης που κάθε φορά παραλείπεται από την ομάδα εκμάθησης, η οποία υπολογίζεται από το μοντέλο

\bar{Y} : ο μέσος όρος των παρατηρούμενων τιμών δραστηριότητας της ομάδας εκμάθησης

ii. το τυπικό σφάλμα εκτίμησης (Standard Error of Estimate, SEE)

iii. η τιμή της πιθανότητας (δοκιμασία Fisher, F)

Η δημιουργία του τελικού μοντέλου 3D-QSAR προκύπτει μετά την εφαρμογή της μη διασταυρούμενης επικυρωμένης μεθόδου.

3.5.4.2 Επικύρωση του μοντέλου 3D-QSAR

Το τελικό μοντέλο 3D-QSAR αξιολογείται με μια εξωτερική ομάδα ελέγχου (test set), η οποία δεν περιλαμβάνεται στην ομάδα εκπαίδευσης (training set) που χρησιμοποιήθηκε ώστε να εξαχθεί το μοντέλο. Κριτήριο του μοντέλου αποτελεί ο συντελεστής συσχέτισης για την ομάδα ελέγχου (R^2_{test}), ο οποίος υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$R^2_{test} = 1 - \frac{\sum(Y_{pred(test)} - Y_{test})^2}{\sum(Y_{test} - \bar{Y}_{train})^2}$$

Όπου,

$Y_{\text{pred (test)}}$: η προβλεπόμενη τιμή βιολογικής δραστηριότητας της κάθε ένωσης της ομάδας ελέγχου

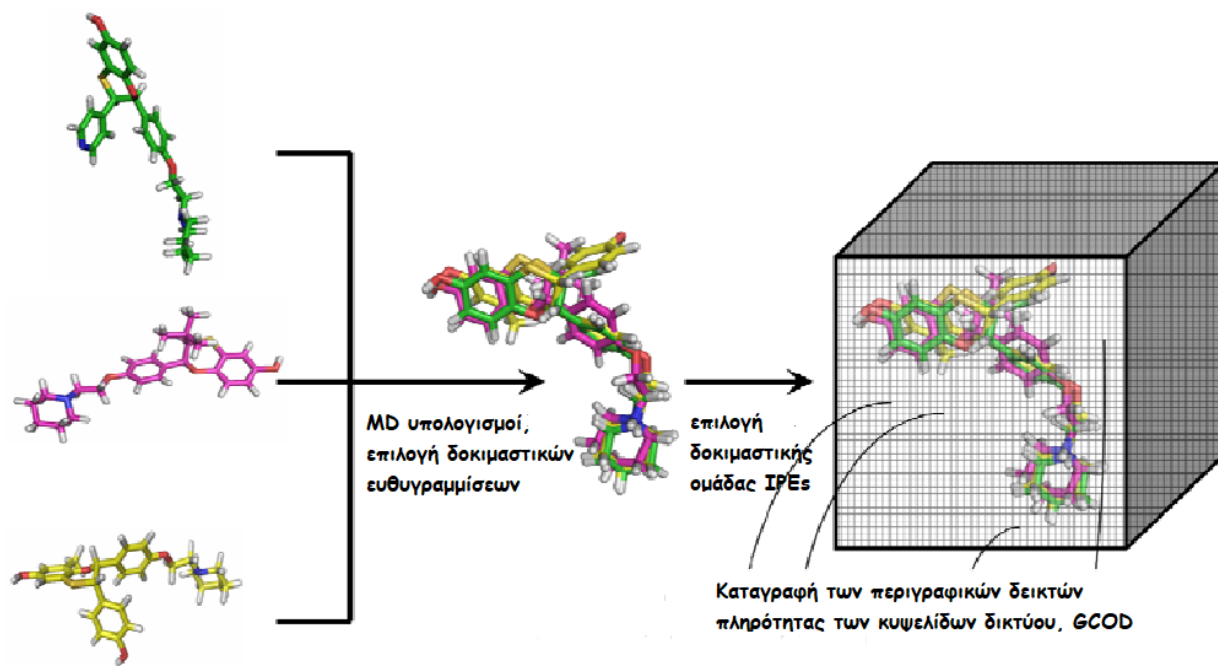
Y_{test} : η παρατηρούμενη τιμή βιολογικής δραστηριότητας της κάθε ένωσης της ομάδας ελέγχου

\bar{Y}_{train} : ο μέσος όρος των παρατηρούμενων τιμών δραστηριότητας της ομάδας εκμάθησης

Σημειώνεται ότι για να είναι ικανοποιητικό ένα μοντέλο 3D-QSAR, η τιμή του συντελεστή συσχέτισης θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 0,5.

3.5.5 Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης τεσσάρων διαστάσεων

Σε μια τυπική μελέτη QSAR υπολογίζονται διαφορετικά χαρακτηριστικά των μορίων, όπως μοριακοί αριθμοί, μοριακό βάρος, τοπολογικά χαρακτηριστικά (2D-QSAR) ή περιγραφικοί δείκτες ενεργειακού πλέγματος (3D-QSAR) με τη χρήση διαφορετικών αλγορίθμων που συσχετίζονται με τις παρατηρούμενες δραστηριότητες φαρμάκων. Ως μια εξέλιξη του 3D-QSAR, ο Hopfinger και οι συνεργάτες του πρότειναν τη μέθοδο 4D-QSAR.^{50, 57} Η κύρια διαφορά είναι ότι η προσέγγιση μέσω 4D-QSAR χρησιμοποιεί είτε την ευελιξία διαμόρφωσης μόνο του προσδέτη (Receptor Independent, RI) ή τον προσδέτη εξαρτώμενο από τον υποδοχέα (Receptor Dependent, RD) χρησιμοποιώντας μεθόδους όπως είναι οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics, MD). Τα παραγόμενα σύνολα ευθυγραμμίζονται και τοποθετούνται σε ένα κυβικό πλέγμα όπου σε κάθε κυψελίδα υπολογίζεται το μέτρο πληρότητας για τα άτομα των ευθυγραμμισμένων μορίων, το οποίο ονομάζεται δίκτυο κυψελίδων των περιγραφικών δεικτών πληρότητας (Grid Cell Occupancy Descriptors, GCODs) (Σχήμα 3.12). Οι GCODs δημιουργούνται για έναν αριθμό διαφορετικών τύπων ατόμων (θετικός πολικός, αρνητικός πολικός, αρωματικός, δέκτης δεσμού υδρογόνου, δότης δεσμού υδρογόνου), τα οποία ονομάζονται φαρμακοφόρα στοιχεία αλληλεπίδρασης (Interaction Pharmacophore Elements, IPE).^{50, 57}



Σχήμα 3.12 Τα βήματα που ακολουθούνται για την ανάπτυξη μοντέλων 4D-QSAR ⁵⁰

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η εξερεύνηση νέων αμινοαδαμαντανικών αναλόγων ώστε να μελετηθεί η δράση τους κατά του ιού της γρίπης Α καθώς και η εξαγωγή συμπερασμάτων που αφορούν στη σχέση δομής και φαρμακολογικής τους δράσης ώστε να ανακαλυφθούν καινοτόμα φαρμακομόρια με τη χρήση 3D-QSAR. Η ανάγκη ανάπτυξης νέων αναστολέων της μεμβρανικής πρωτεΐνης M2 προέκυψε από την εμφάνιση αντοχής του ιού της Influenza A έναντι στην αμανταδίνη και ριμανταδίνη.

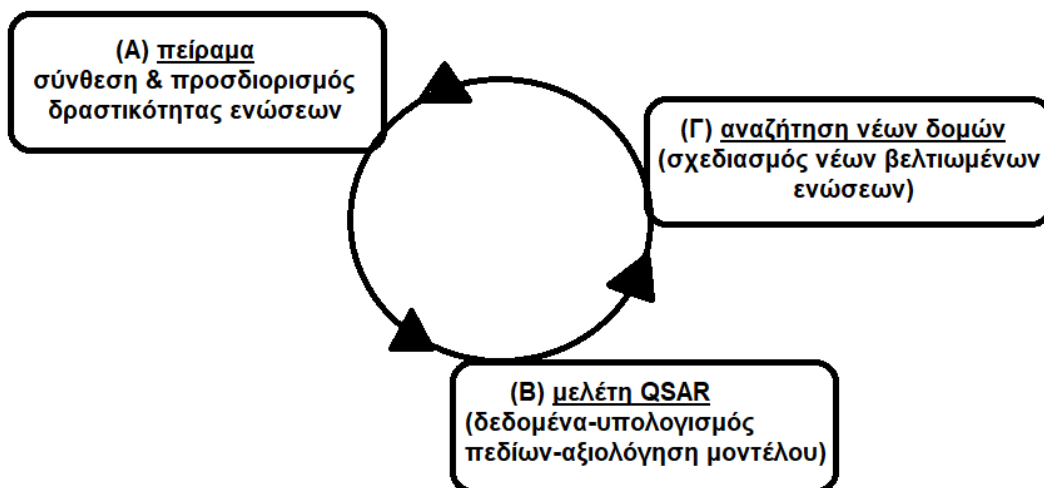
Ο σχεδιασμός φαρμάκων μέσω του *in silico* ορθολογικού σχεδιασμού (Rational Drug Design), ο οποίος είναι ένας συνεχώς αναπτυσσόμενος κλάδος, στοχεύει στην ελάττωση του χρόνου παραγωγής ενός φαρμάκου καθώς μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία ανακάλυψης χημικών δομών που μπορούν να εισέλθουν στις προκλινικές και κλινικές δοκιμές.

Η έρευνα μέσω του Ορθολογικού Σχεδιασμού ακολουθεί μια κυκλική πορεία, καθώς ξεκινά από τη σύνθεση και τον βιολογικό έλεγχο των χημικών ενώσεων και καταλήγει πάλι στη σύνθεση και βιολογικό έλεγχο νέων, βελτιωμένων χημικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση μειωμένου αριθμού ενώσεων, οι οποίες ελέγχονται για τη βιολογική τους δράση πραγματοποιείται με την ανάπτυξη μοντέλων Ποσοτικών Σχέσεων Δομής – Δράσης (Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR).

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιούνται μελέτες 3D-QSAR χρησιμοποιώντας τις μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA με σκοπό την αναζήτηση νέων βελτιωμένων ενώσεων αξιοποιώντας τα αποτελέσματα των μελετών.

Για την επίτευξη αυτού του σκοπού ήταν απαραίτητη η εκτέλεση των ακόλουθων βημάτων, όπως περιγράφονται στο παρακάτω σχήμα. Αρχικά, με δεδομένα που αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία, τα οποία περιείχαν συντεθειμένες και βιολογικά αξιολογημένες ενώσεις πραγματοποιήθηκαν μελέτες 3D-QSAR και δημιουργήθηκε μοντέλο τριών διαστάσεων. Τα παραχθέντα μοντέλα 3D-QSAR αξιολογήθηκαν για την ισχύ του με διάφορους τρόπους επικύρωση (Q^2 , R^2 κ.ά.). Τα αποτελέσματα των μελετών 3D-QSAR

οπτικοποιούνται γραφικά μέσω ισοϋψών χαρτών τριών διαστάσεων, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για τη φαρμακοφόρο δράση και αξιοποιούνται περαιτέρω. Αποτέλεσμα της ανωτέρω μελέτης που αναλύθηκε είναι η πρόταση σύνθεσης και αξιολόγησης νέων δομών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

IN SILICO* ΜΕΛΕΤΗ ΣΥΖΕΥΓΜΑΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΑΜΑΝΤΑΔΙΝΗΣ ΜΕ ΠΟΛΙΚΗ ΚΕΦΑΛΗ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ M2 ΤΟΥ ΙΟΥ *INFLUENZA A

4.1 Εισαγωγή

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο περιγράφονται αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν για να εξαχθεί μοντέλο 3D-QSAR, από το οποίο θα προκύψουν νέα βελτιωμένα συζεύγματα ανώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή που δρουν ως αναστολείς της μεμβρανικής πρωτεΐνης M2 του ιού της *Influenza A*. Αρχικά, επιχειρήθηκε ο συνδυασμός της μοριακής πρόσδεσης με τη μέθοδο του 3D-QSAR (CoMFA και CoMSIA), η οποία υπήρξε άκαρπη. Πιο συγκεκριμένα, επιχειρήθηκε μοριακή πρόσδεση μέσω Glide των 38 αδαμαντανικών αναλόγων στο διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης M2 (Wild type), τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν ότι τα περισσότερα παράγωγα δεν προσδένονται στην ίδια θέση πρόσδεσης με την αμανταδίνη, η οποία αποτελεί την ένωση οδηγό. Απόρροια του συγκεκριμένου αποτελέσματος ήταν να μην χρησιμοποιηθούν οι προσδεμένες δομές των 38 συζευγμάτων ενώσεων της αμανταδίνης με πολική κεφαλή για την ανάπτυξη του 3D-QSAR μοντέλου. Οι δομές που χρησιμοποιήθηκαν προέκυψαν μετά την ελαχιστοποίηση ενέργειας όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.3. Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής – Δράσης καθώς δεν είναι απαραίτητη η πρόσδεση στον υποδοχέα. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν περιγράφονται στο Σχήμα 4.1. Στην παράγραφο 4.6 του κεφαλαίου γίνεται χρήση της προβλεπτικής δυνατότητας των παραχθέντων *in silico* μοντέλων σε μια σειρά συζευγμάτων ενώσεων της αμανταδίνης επιβεβαιώνοντας τη βιολογική τους δραστηριότητα ή όχι κατά του ιού της *Influenza A*.



Σχήμα 4.1 Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στην συγκεκριμένη περίπτωση

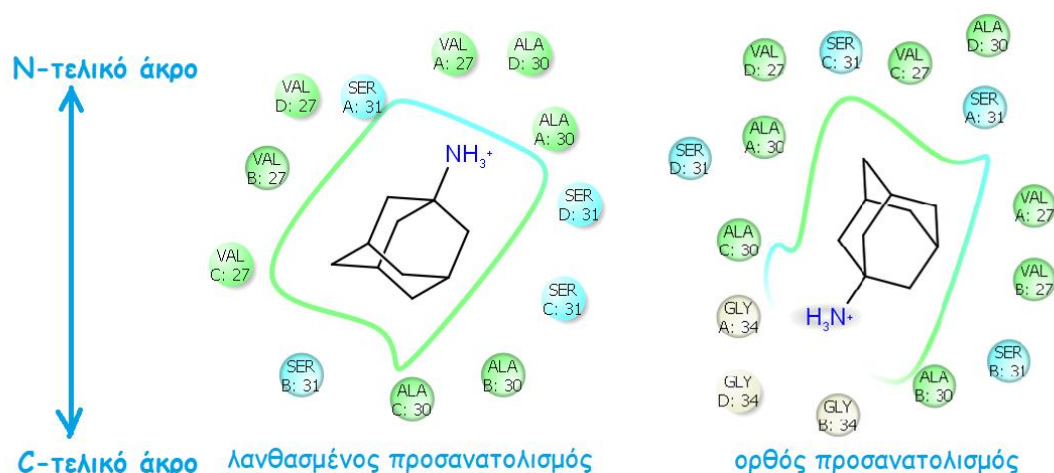
4.2 Επιλογή και προετοιμασία της πρωτεΐνης M2

Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε κατά την μοριακή πρόσδεση ήταν η (2KQT.pdb), η οποία έχει ληφθεί από μελέτες ssNMR (Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στερεής κατάστασης) σε pH 7,5.²³ Η δομή αυτή είναι συμπλοκοποιημένη με την αμανταδίνη (ένωση **1**) και αναπαριστά το διαμεμβρανικό δίαυλο της πρωτεΐνης M2 σε κλειστή κατάσταση. Χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή “Protein Preparation Wizard” από το λογισμικό Maestro της εταιρείας Schrödinger, η οποία είναι μια συλλογή από εργαλεία που προετοιμάζουν την τριδιάστατη δομή των πρωτεϊνών. Σημαντικό σημείο στην προετοιμασία της πρωτεΐνης υπήρξε η προσθήκη μορίων ύδατος εντός του πρωτεϊνικού διαύλου, η οποία προέκυψε μετά από προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (MD). Για τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής χρησιμοποιήθηκε η έκδοση του Desmond 2.4, η πρωτεΐνη τοποθετήθηκε σε λιπιδική διπλοστιβάδα DPPC και ενυδατώθηκε με το μοντέλο ύδατος TIP3P63 και εφαρμόστηκαν Περιοδικές Συνοριακές Συνθήκες (50 Å × 50 Å × 80 Å) ~ 80,000 άτομα.³ Σημειώνεται ότι οι δομές που προκύπτουν από προσομοιώσεις

MD μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες δομές στους υπολογισμούς μοριακής πρόσδεσης για την πιο αξιόπιστη μελέτη της πρόσδεσης συγκεκριμένων προσδετών.³

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας, χωρίς την προσθήκη μορίων ύδατος εντός του πόρου, οδήγησαν σε λανθασμένο προσανατολισμό της αμινομάδας της αμανταδίνης προς το N-τελικό άκρο σε αντίθεση με τον ορθό, ο οποίος είναι προς το C-τελικό άκρο. Ένα δίκτυο μορίων ύδατος σταθεροποιεί τους δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της αμινομάδας της αμανταδίνης και της ιστιδίνης στη θέση 37 (H37) με συνέπεια τον ορθό προσανατολισμό της (Σχήμα 4.2).

Επίσης, έχει αναφερθεί ότι ο αριθμός των κρυσταλλογραφικών μορίων νερού που εντοπίζεται στις δομές πρωτεϊνών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ευκρίνεια προσδιορισμού της δομής, δηλαδή με ευκρίνεια 2 Å αναμένεται ένας μέσος όρος 1,0 κρυσταλλογραφικού νερού, αλλά όταν η ευκρίνεια φτάσει το 1 Å αναμένονται 1,6 – 1,7 κρυσταλλογραφικά μόρια ύδατος ανά αμινοξύ.⁵⁹ Συνεπώς, στα κρυσταλλογραφικά αποτελέσματα παρατηρούνται μόνο τα μόρια νερού που έχουν «καλή διάταξη».



Σχήμα 4.2 Ο λανθασμένος προσανατολισμός της αμινομάδας της αδαμαντίνης προς το N-τελικό άκρο και ο ορθός προσανατολισμός αυτής προς το C-τελικό άκρο

4.3 Σχεδιασμός και προετοιμασία των αναστολέων

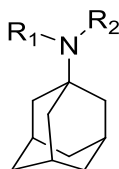
Οι μοριακές δομές πρέπει να είναι σε τριδιάστατη δομή. Αφού σχεδιαστούν σε δομή δύο διαστάσεων μετατρέπονται σε τριδιάστατη δομή όπου και βελτιστοποιείται αυτή με μεθόδους ελαχιστοποίησης της ενέργειας. Σε όλες τις μοριακές δομές πρέπει: (i) οι δεσμοί μεταξύ των ατόμων να έχουν κατάλληλο μήκος, (ii) οι γωνίες των δεσμών να είναι επίσης κατάλληλες, (iii) να φέρουν όλα τα άτομα υδρογόνου, (iv) να είναι κατάλληλα πρωτονιωμένες στο pH που εκτελούνται οι *in vitro* δοκιμές στην πρωτεΐνη. Οι τελικές δομές αποθηκεύονται στην κατάλληλη μορφή που απαιτεί το υπολογιστικό πρόγραμμα ώστε να χρησιμοποιηθούν ως αρχεία εισόδου.

Για την ανάπτυξη του μοντέλου 3D-QSAR δημιουργήθηκε μια βάση δεδομένων με ενώσεις αντλούμενες από τη βιβλιογραφία. Ξεκινώντας από εκατοντάδες ενώσεις που είχαν μελετηθεί για την αναστολή του ιοντικού διαύλου του ιού της Influenza A επιλέχθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό ενώσεων που είχε αξιολογηθεί βιολογικά με τεχνικές ηλεκτροφυσιολογίας (TEVC, Two Electrode Voltage Clamp assays). Από το σύνολο αυτό αφαιρέθηκαν όσες ενώσεις δεν είχαν καθορισμένη στερεοχημεία ή/και παρουσίαζαν μεγάλο πειραματικό σφάλμα στις μετρήσεις τους. Τελικώς, προέκυψαν 38 συζεύγματα ανώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή (Πίνακας 4.1) για την ανάπτυξη 3D-QSAR μοντέλου.^{60, 61} Τα ανάλογα αυτά έχουν ελεγχθεί πειραματικά για την αναστολή του διαμεμβρανικού τμήματος της τετραμερούς πρωτεΐνης M2 για την αλληλουχία Udorn (Wild-type) με τεχνικές ηλεκτροφυσιολογίας (TEVC) και με κοινό πρωτόκολλο.^{60, 61, 62} Οι δοκιμασίες TEVC θεωρούνται από τις καλύτερες για μελέτη της αγωγιμότητας του ιόντος και της αναστολής του φαρμάκου. Σε αυτή τη δοκιμασία ο διάλυος ιόντων εκφράστηκε στην κυτταρική μεμβράνη ωκυττάρων και ενεργοποιήθηκε με όξινο pH (pH = 5,5). Όλες οι ενώσεις ελέγχθηκαν στα 100 μM και καταγράφηκε το ρεύμα αγωγιμότητας του διαύλου στο χρονικό διάστημα δύο λεπτών μετά την εφαρμογή των ενώσεων.^{60, 61}

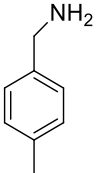
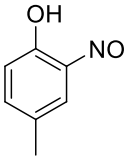
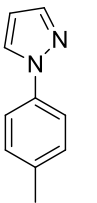
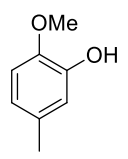
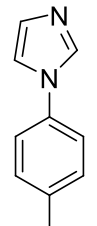
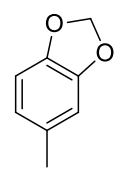
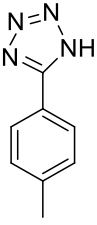
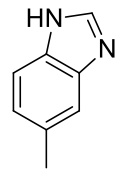
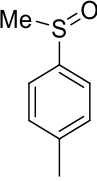
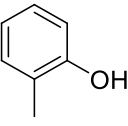
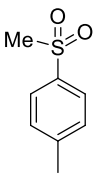
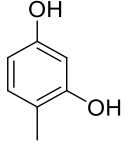
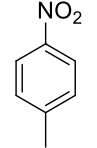
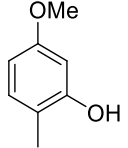
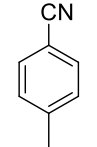
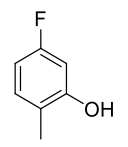
Τα συγκεκριμένα αμινο-συζεύγματα ανώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή σχεδιάστηκαν με τη χρήση ChemBioDraw Ultra 14.0⁶³ και τα SMILES αυτών χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψουν οι 3D δομές με τη χρήση Graphical User Interface (GUI) του Maestro 10.2 της εταιρείας Schrodinger.⁶⁶ Με τη χρήση της

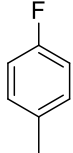
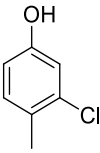
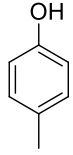
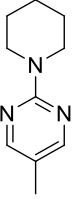
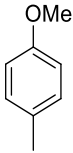
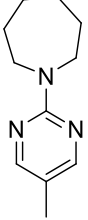
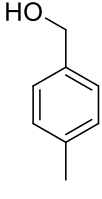
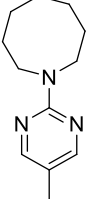
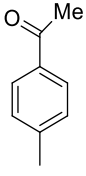
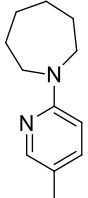

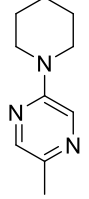
διαδικασίας ελαχιστοποίησης ενέργειας MacroModel 10.8 προστέθηκαν όλα τα άτομα υδρογόνου και τα μόρια υποβλήθηκαν σε πλήρη βελτιστοποίηση δομής.⁶⁷ Για την ελαχιστοποίηση ως διαλύτης επιλέχθηκε το ύδωρ και χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005⁶⁸ και ο αλγόριθμος Polak-Ribiere conjugated (PRCG, 1000 επαναλήψεις με βαθμίδα ελαχιστοποίησης 0.01 Kcal mol⁻¹Å⁻¹). Ακολούθως, ελέγχθηκαν οι δομές ώστε να έχουν την κατάλληλη ταυτομέρεια και ιοντισμό στο pH που εκτελούνται οι *in vitro* δοκιμές (pH 7) με την εφαρμογή του LigPrep 3.4.⁶⁹ Τελευταίο βήμα αποτέλεσε ο υπολογισμός Gasteiger-Hückel^{70, 71} των φορτίων όλων των ενώσεων με το πρόγραμμα SYBYL 8.0.⁷²

Πίνακας 4.1 Οι μοριακές δομές των 38 συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης και οι πειραματικές τιμές αναστολής της M2/WT.



Ένωση	R ₁	R ₂	% αναστολή**	Ένωση	R ₁	R ₂	% αναστολή**
1	H	H	91±3,0	20	Me		34±3,0
2	H		77±1,0	21	H		44±3,0
3	H		31±2,0	22	H		76±2,0
4	H		3±2,0	23	H		65±1,0
5	H		7±2,0	24	H		78±1,0

6	H		3±2,0	25	H		66±1,0
7	H		4±3,0	26	H		46±3,0
8	H		4±2,0	27	H		54±2,0
9	H		6±1,0	28	H		26±1,0
10	H		2±1,0	29	H		79±1,0
11	H		45±2,0	30	H		64±1,0
12	H		49±2,0	31	H		56±1,0
13	H		36±2,0	32	H		87±2,0

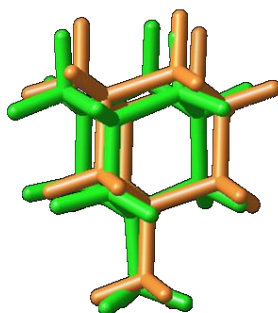
14	H		77±1,0	33	H		78±1,0
15	H		67±2,0	34	H		12±0,8
16	H		43±1,0	35	H		0,7±0,7
17	H		26±2,0	36	H		3,5±0,7
18	H		2±2,0	37	H		0,9±0,9
19	H		73±2,0	38	H		24,1±2,7

* Η δραστηκότητα των αναστολέων μετρήθηκε χρησιμοποιώντας μεθόδους ηλεκτροφυσιολογίας (TEVC assays) με πρωτεΐνη M2 πλήρους μήκους στη μεμβράνη ωκυττάρων *Xenopus*.

** Τα πειράματα Τριδιάστατων Ποσοτικών Σχέσεων Δομής – Δράσης πραγματοποιήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη τη μέση τιμή του ποσοστού αναστολής.

4.4 Μοριακή πρόσδεση με τη χρήση του αλγορίθμου GLIDE

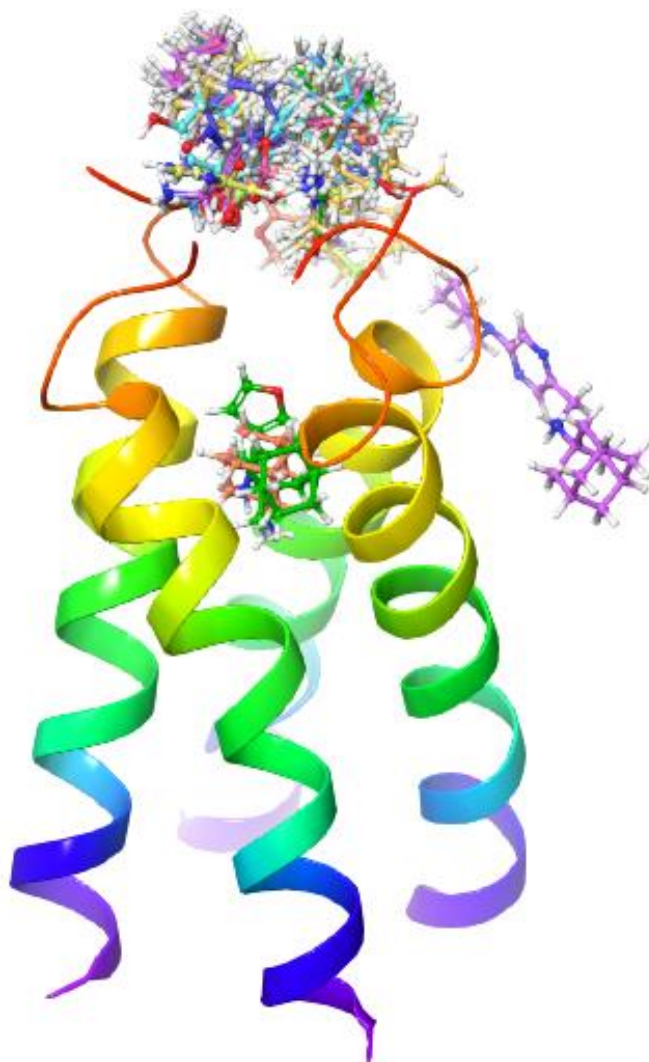
Ο αλγόριθμος GLIDE της εταιρείας Schrodinger χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης.⁷³ Ο αλγόριθμος του GLIDE έχει προταθεί στη βιβλιογραφία για την ακρίβεια που παρέχει στη μοριακή πρόσδεση αλλά και τη βαθμολόγηση.⁷⁴ Αρχικά, εφαρμόστηκε μοριακή πρόσδεση στον πιο δραστικό αναστολέα, την ένωση **1** (αμανταδίνη) (Πίνακας 4.1), η οποία έχει συμπλοκοποιηθεί στον διαμεμβρανικό χώρο της πρωτεΐνης M2. Στο Σχήμα 4.3 απεικονίζεται η υπέρθεση της συμπλοκοποιημένης και προσδεμένης με εφαρμογή του αλγορίθμου GLIDE αμανταδίνης στον ιοντικό διάυλο της M2. Η μικρή τιμή του RMSD (Root Mean Square Deviation, $RMSD = 0,03 \text{ \AA}$) που προέκυψε από την υπέρθεση, κάνει προφανές ότι η χρήση του αλγορίθμου GLIDE, η οποία χρησιμοποιείται για τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης αναπαράγει τα πειραματικά δεδομένα για δομικά παρόμοιες ενώσεις.



Σχήμα 4.3 Το αποτέλεσμα της υπέρθεσης των δύο δομών: με πράσινο χρώμα αναπαριστάται η συμπλοκοποιημένη δομή της αμανταδίνης και με πορτοκαλί η προσδεμένη ($RMSD = 0,03 \text{ \AA}$)

Κατά την πρώτη προσπάθεια μοριακής πρόσδεσης η περιοχή πρόσδεσης ορίστηκε από ένα κύβο διαστάσεων $25 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$ το κέντρο του οποίου συμπίπτει με αυτό του προσδέτη, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να προσδεθεί η πλειονότητα των ενώσεων. Για αυτό τον λόγο αυξήσαμε την περιοχή πρόσδεσης, οπότε ο κύβος τώρα φέρει διαστάσεις $35 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA}$, και όμοια το κέντρο του συμπίπτει με αυτό του προσδέτη. Οι υπόλοιπες παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι προεπιλεγμένες από το πρόγραμμα. Το επίπεδο ακρίβειας που χρησιμοποιήθηκε για την πρόσδεση

ήταν το XP (Extra Precision) και για τη βαθμολόγηση το XP GScore. Επιλέχθηκε η πόζα του κάθε προσδέτη με βάση την ευνοϊκότερη βαθμονόμηση.



Σχήμα 4.4 Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης μέσω GLIDE. Η αμανταδίνη (ένωση 1, πορτοκαλί χρώμα) και η ένωση 19 (πράσινο χρώμα) προσδένονται στην ίδια θέση, οι υπόλοιπες 35 κοντά στο N-τελικό άκρο ενώ η ένωση 34 προσδένεται στο πλάι (μωβ χρώμα).

Στη συνέχεια, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία προσδέθηκαν και τα υπόλοιπα συζεύγματα ανώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή στη μεμβρανική πρωτεΐνη M2. Στο παραπάνω σχήμα (Σχήμα 4.4) παρατηρούνται τα αποτελέσματα της Μοριακής πρόσδεσης. Από τις 38 ενώσεις που αποτελούν το σύνολο δεδομένων, μόνο η ένωση **19** προσδένεται στην ίδια περιοχή με την αμανταδίνη (ένωση **1**), οι υπόλοιπες 35 ενώσεις προσδένονται σε διαφορετική

θέση (N-τελικό άκρο) ενώ η ένωση **34** πλάγια του N-τελικού άκρου. Η πιθανότερη εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι πιθανότατα ο μεγάλος όγκος των αμινο-αδαμαντανικών αναλόγων σε σύγκριση με αυτόν της αμανταδίνης. Η διαφορετική θέση πρόσδεσης των συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης δεν επέτρεψε την χρήση των προσδεμένων διαμορφώσεων να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μοντέλων 3D-QSAR.

4.5 Ανάπτυξη μοντέλου 3D-QSAR

4.5.1 Ομάδες δεδομένων – Ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου

Οι πειραματικές τιμές των συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης έχουν εκφραστεί ως επί τοις εκατό αναστολή της μεμβρανικής πρωτεΐνης M2 της αλληλουχίας Udorn (M2 WT), με εύρος από 0,7 έως 91, οι οποίες μετατράπηκαν σε ($\times 10^{-2}$) τιμές που αποτελούν τις εξαρτημένες μεταβλητές στις αναλύσεις των μεθοδολογιών CoMFA και CoMSIA.⁷⁵ Στην συνέχεια, το σύνολο δεδομένων διαχωρίστηκε στην ομάδα εκμάθησης και στην ομάδα ελέγχου. Η ομάδα εκμάθησης περιλαμβάνει αντιπροσωπευτικό δείγμα από άποψη μοριακής δομής και βιολογικής δραστηριότητας.⁷³ Όμοια και η ομάδα ελέγχου ακολουθεί την ίδια κατανομή τιμών δραστηριότητας. Η προσέγγιση αυτή θεωρείται η πιο ορθή, σύμφωνα με τους Golbraikh και Tropsha, όπου τα αντιπροσωπευτικά σημεία της ομάδας ελέγχου πρέπει να είναι παρόμοια με εκείνα της ομάδας εκμάθησης και το αντίθετο.⁷⁷

Η ομάδα εκμάθησης αποτελείται από 28 μόρια και συνεπώς η ομάδα ελέγχου από 10 μόρια (Πίνακας 4.2). Η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) χρησιμοποιήθηκε για να εξαχθεί η σχέση μεταξύ των πεδίων CoMFA και CoMSIA και της ανασταλτικής δράσης. Τα μοντέλα, 3D-QSAR CoMFA και 3D-QSAR CoMSIA παρήχθησαν χρησιμοποιώντας την πρότυπη εφαρμογή του πακέτου μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.⁷¹

Πίνακας 4.2 Οι πειραματικές τιμές (% x 10⁻²) και οι προβλεπόμενες CoMFA & CoMSIA από το μοντέλο τιμές για τα 38 συζεύγματα ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή

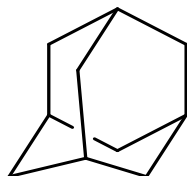
Ένωση	WT % αναστολή	Πειραματικές ρ(%)	Προβλεπόμενες CoMFA ρ(%)	Προβλεπόμενες CoMSIA ρ(%)
1	91	0,91	0,817	0,895
2*	77	0,77	0,749	0,636
3	31	0,31	0,415	0,398
4	3	0,03	-0,034	-0,019
5*	7	0,07	0,328	0,058
6	3	0,03	0,026	0,016
7	4	0,04	-0,001	0,040
8*	4	0,04	0,101	0,063
9	6	0,06	0,036	0,204
10	2	0,02	0,016	-0,016
11*	45	0,45	0,242	0,040
12	49	0,49	0,475	0,448
13	36	0,36	0,444	0,319
14	77	0,77	0,718	0,724
15	67	0,67	0,606	0,648
16*	43	0,43	0,394	0,344
17	26	0,26	0,317	0,234
18	2	0,02	0,124	-0,010
19	73	0,73	0,780	,0725
20	34	0,34	0,290	0,365
21	44	0,44	0,588	0,599
22	76	0,76	0,753	0,687
23*	65	0,65	0,593	0,669
24	78	0,78	0,623	0,775
25*	66	0,66	0,589	0,565
26	46	0,46	0,444	0,443

27	54	0,54	0,489	0,609
28	26	0,26	0,303	0,291
29	79	0,79	0,857	0,776
30*	64	0,64	0,654	0,555
31	56	0,56	0,547	0,545
32*	87	0,87	0,843	0,878
33	78	0,78	0,78	0,779
34	12	0,12	0,096	0,173
35	0,7	0,007	-0,002	-0,002
36	3,5	0,035	0,057	0,027
37*	0,9	0,009	-0,042	-0,126
38	24,1	0,241	0,238	0,244

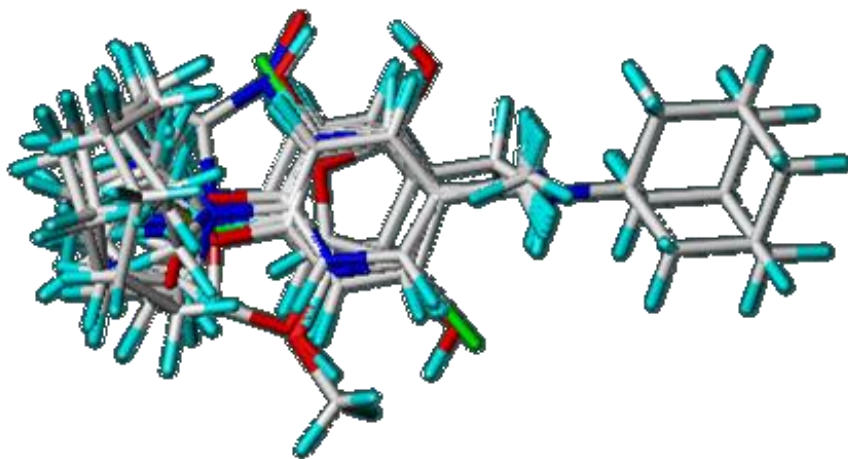
* Ομάδα ελέγχου (test set)

4.5.2 Ευθυγράμμιση της ομάδας δεδομένων

Τα τριδιάστατα μοντέλα CoMFA και CoMSIA παρήχθησαν χρησιμοποιώντας το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης της ομάδας εκμάθησης. Η δραστική ένωση **1** χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο μόριο για την ευθυγράμμιση με τη χρήση δέκα ατόμων ως ικρίωμα (Σχήμα 4.5), τα οποία είναι κοινά σε όλα τα παράγωγα που μελετώνται. Η υπέρθεση, κατά την οποία το κάθε κοινό άτομο κάθε αναλόγου τοποθετείται άκαμπτα πάνω στο αντίστοιχο άτομο της πρότυπης ένωσης διεξήχθη χρησιμοποιώντας το βοηθητικό πρόγραμμα «Ευθυγράμμιση βάσης δεδομένων» (Align database), το οποίο διατίθεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα SYBYL 8.0 (Tripos).⁷¹ Το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης απεικονίζεται στο Σχήμα 4.6.



Σχήμα 4.5 Το ικρίωμα που επιλέχθηκε με τα κοινά δέκα άτομα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ευθυγράμμιση όλων των παραγώγων



Σχήμα 4.6 Το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης των 38 ενώσεων που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του μοντέλου CoMFA και CoMSIA βασισμένο στη δραστική ένωση 1

4.5.3 Ανάλυση των μεθοδολογιών CoMFA και CoMSIA

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιείται με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Analysis, PLS), η οποία βασίζεται στη μέθοδο των προβολών και εξάγει κάποιες κύριες συνιστώσες που αποτελούν γραμμικό συνδυασμό πολλών μεταβλητών, στη μεθοδολογία CoMFA των στερικών και ηλεκτροστατικών πεδίων, στη μεθοδολογία CoMSIA των δεικτών ομοιότητας στα διάφορα σημεία του πλέγματος.⁷³ Η ανάλυση αυτών των μεθοδολογιών περιγράφεται ακολούθως.

4.5.3.1 Ανάλυση μεθοδολογίας CoMFA

Τα τριδιάστατα μοντέλα CoMFA δημιουργούνται χρησιμοποιώντας το συνδυασμό του στερικού και του ηλεκτροστατικού πεδίου.⁷³ Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών τέσσερα αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή Q^2 στα 0,847 και στο χαμηλότερο SEP στα 0,127. Ο συντελεστής συσχέτισης της μη-διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης (No validation) R^2_{train} στα 0,954, το SEE στα 0,07, και η τιμή F στα 123,383 δείχνουν μία ικανοποιητική στατιστικά συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών για τη μη-διασταυρούμενη επικύρωση του τριδιάστατου μοντέλου CoMFA (Πίνακας 4.3). Στο Σχήμα 4.7 παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών της βιολογικής δραστηριότητας. Η ανάλυση της

μεθοδολογίας CoMFA δείχνει ότι η σχετική συνεισφορά των πεδίων είναι 69,4% και 30,6% για το στερικό και το ηλεκτροστατικό πεδίο, αντίστοιχα.

Πίνακας 4.3 Τα στατιστικά αποτελέσματα του μοντέλου CoMFA

Μοντέλο CoMFA	
ONC	4
q²	0,847
SEP	0,127
R²_{train}	0,954
SEE	0,07
F τιμή	123,383
Συνεισφορά Πεδίου	Στερικό:0,694
	Ηλεκτροστατικό:0,306
R²_{test}	0,867

Όπου,

ONC: ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών που χρησιμοποιήθηκαν στην PLS ανάλυση

Q²: ο συντελεστής συσχέτισης της διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης για τις ενώσεις της ομάδας εκμάθησης

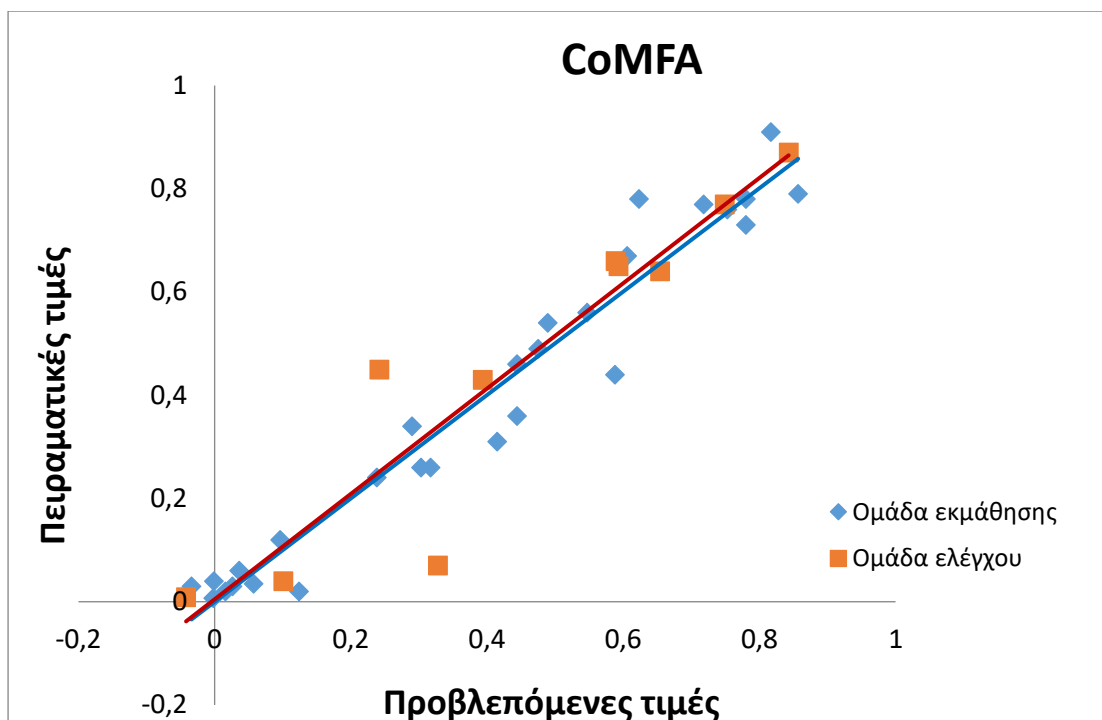
SEP: το τυπικό σφάλμα πρόβλεψης (Standard Error of Prediction)

R²_{train}: ο συντελεστής συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας εκμάθησης

SEE: το τυπικό σφάλμα εκτίμησης (Standard Error of Estimate)

F: η τιμή του Fisher test

R²_{test}: ο συντελεστής συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας ελέγχου



Σχήμα 4.7 Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών για το τριδιάστατο μοντέλο CoMFA, τόσο για την ομάδα εκμάθησης όσο και για την ομάδα ελέγχου

4.5.3.2 Ανάλυση μεθοδολογίας CoMSIA

Τα τριδιάστατα μοντέλα CoMSIA δημιουργούνται κάνοντας χρήση όλων ή κάποιου συνδυασμού από τα παρακάτω πεδία ομοιότητας: στερικό, ηλεκτροστατικό, υδρόφοβο, δότη δεσμού υδρογόνου και δέκτη δεσμού υδρογόνου.⁷³ Αυτά τα πεδία απεικονίζουν τις διάφορες ιδιότητες στις χωρικές περιοχές όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της ανασταλτικής δραστηριότητας. Στην ανάλυση της μεθοδολογίας CoMSIA, τα πέντε διαφορετικά περιγραφικά πεδία δεν είναι εντελώς ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Ο υπολογισμός των πεδίων εφαρμόζεται για τις ενώσεις της ομάδας εκμάθησης. Για την επίτευξη του σταθερότερου μοντέλου, τροποποιείται συστηματικά ο συνδυασμός των πεδίων και επιλέγεται αυτός που δίνει μεγαλύτερη τιμή του συντελεστή συσχέτισης της διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης Q^2 , το μικρότερο σφάλμα, και τη μεγαλύτερη τιμή F. Στην παρούσα μελέτη, το σταθερότερο τριδιάστατο μοντέλο CoMSIA εξάγεται χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό των στερικού, ηλεκτροστατικού και υδρόφοβου πεδίων. Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών έξι αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή Q^2 στα

0,782 και στο χαμηλότερο SEP στα 0,158. Ο συντελεστής συσχέτισης της μη-διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης (No validation) R^2_{train} στα 0,965, το SEE στα 0,063, και η τιμή F στα 100,379, επίσης δείχνουν μία επιτυχή στατιστικά συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών για τη μη-διασταυρούμενη επικύρωση του τριδιάστατου μοντέλου CoMSIA. (Πίνακας 4.7). Στο Σχήμα 4.8, παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών της βιολογικής δραστηριότητας. Η ανάλυση CoMSIA δείχνει ότι η σχετική συνεισφορά των πεδίων είναι 32,0% για το στερικό, 30,1% για το ηλεκτροστατικό πεδίο και 37,8% υδροφοβίας.

Πίνακας 4.4 Τα στατιστικά αποτελέσματα του τριδιάστατου μοντέλου CoMSIA

Μοντέλο CoMSIA	
ONC	6
q²	0,782
SEP	0,158
R²_{train}	0,965
SEE	0,063
F τιμή	100,379
Συνεισφορά Πεδίου	Στερικό:0,320
	Ηλεκτροστατικό:0,301
	Υδροφοβίας:0,379
R²_{test}	0,761

Όπου,

ONC: ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών που χρησιμοποιήθηκαν στην PLS ανάλυση

Q²: ο συντελεστής συσχέτισης της διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης για τις ενώσεις της ομάδας εκμάθησης

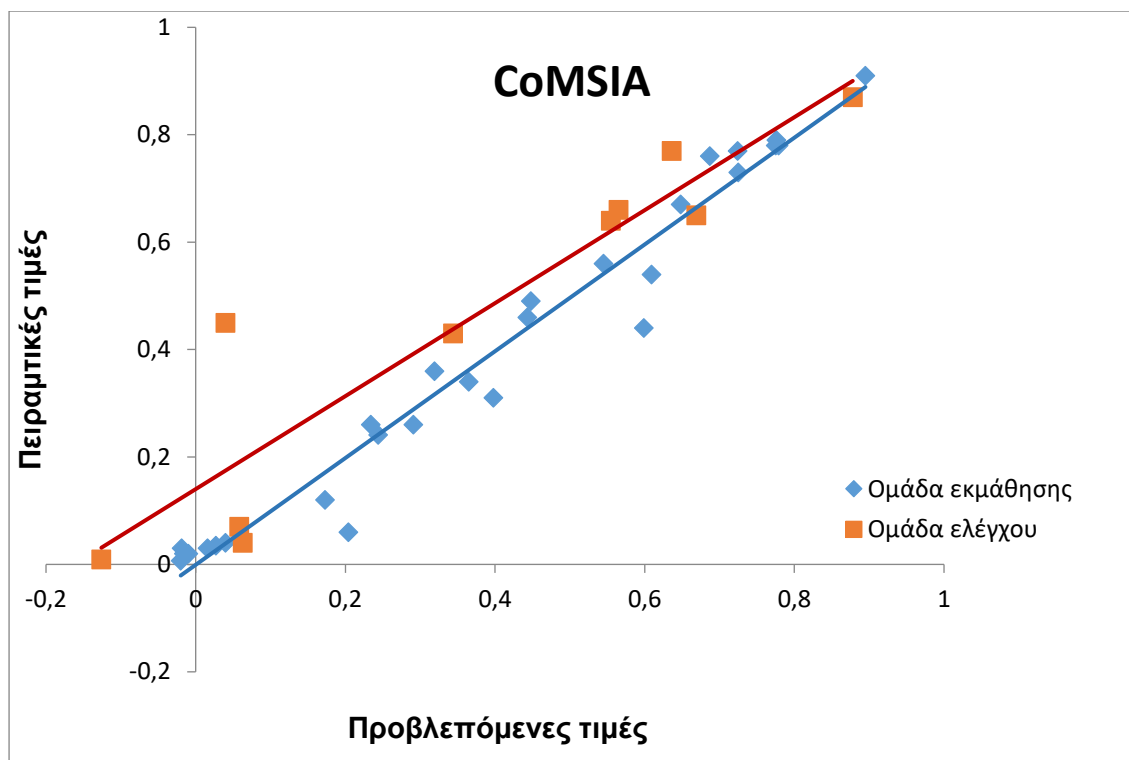
SEP: το τυπικό σφάλμα πρόβλεψης (Standard Error of Prediction)

R²_{train}: ο συντελεστής συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας εκμάθησης

SEE: το τυπικό σφάλμα εκτίμησης (Standard Error of Estimate)

F: η τιμή του Fisher test

R²_{test}: ο συντελεστής συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας ελέγχου



Σχήμα 4.8 Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών για το τριδιάστατο μοντέλο CoMSIA, τόσο για την ομάδα εκμάθησης όσο και για την ομάδα ελέγχου

4.5.4 Επικύρωση των μοντέλων 3D-QSAR CoMFA και 3D-CoMSIA

Για να εκτιμηθεί περαιτέρω η σταθερότητα και η δυνατότητα πρόβλεψης των τριδιάστατων μοντέλων CoMFA και CoMSIA πραγματοποιήθηκε η εξωτερική επικύρωση, όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο 3. Η επικύρωση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα δέκα μόρια του συνόλου δεδομένων που δεν έλαβαν μέρος στη δημιουργία του μοντέλου, αυτά της ομάδας ελέγχου. Από τα Σχήματα 4.5 και 4.6 γίνεται αντιληπτό ότι οι προβλεπόμενες τιμές βιολογικής δραστηριότητας των ενώσεων της ομάδας ελέγχου είναι σε αντιστοιχία με τις πειραματικές αυτών εντός των ορίων ανοχής σφάλματος (κόκκινη γραμμή). Για το τριδιάστατο μοντέλο 3D-QSAR CoMFA η τιμή του συντελεστή συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας ελέγχου R^2_{test} υπολογίστηκε στα 0,867, αποδεικνύοντας την καλή συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών. Για το τριδιάστατο μοντέλο 3D-QSAR CoMSIA η τιμή του συντελεστή συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας

ελέγχου R^2_{test} υπολογίστηκε στα 0,761, αποδεικνύοντας μια σχετικά καλή συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών.

Τα δύο μοντέλα επικυρώθηκαν και με την εφαρμογή του κόμβου ENALOS KNIME (Enalos Model Acceptability Criteria KNIME node). Οι προτεινόμενες δομές πληρούσαν τα κριτήρια του Δρ. Tropsha για τη δυνατότητα πρόβλεψης ενός μοντέλου (Πίνακες 4.5 και 4.6). Πιο συγκεκριμένα, οι Golbraikh και Tropsha πρότειναν ένα σύνολο παραμέτρων για τον καθορισμό της ικανότητας πρόβλεψης ενός μοντέλου QSAR.^{76, 77, 78, 79} Σύμφωνα με τους ερευνητές, ένα μοντέλο μπορεί να θεωρηθεί αποδεκτό, όταν ικανοποιούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις για την ομάδα ελέγχου (test set):

- $R^2 > 0,6$
- $R_{\text{ext}}^2 > 0,5$
- $(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0,1$ και $0,85 \leq k \leq 1,15$ ή
- $(R^2 - R'^2_0) / R^2 < 0,1$ και $0,85 \leq k' \leq 1,15$
- $|(R_0^2 - R'^2_0)| < 0.3$

Όπου,

R^2 : το τετράγωνο του συντελεστή της συσχέτισης των προβλεπόμενων έναντι των πειραματικών τιμών δραστηκότητας της ομάδας ελέγχου για τη γραμμική παλινδρόμηση

R_{ext}^2 : ο συντελεστής συσχέτισης της ομάδας ελέγχου (R^2_{test})

R_0^2 : ο συντελεστής συσχέτισης των προβλεπόμενων έναντι των πειραματικών τιμών δραστηκότητας της ομάδας ελέγχου για τις γραμμές παλινδρόμησης μέσω την αρχή των αξόνων

R'^2_0 : ο συντελεστής συσχέτισης των πειραματικών έναντι των προβλεπόμενων τιμών δραστηκότητας της ομάδας ελέγχου για τις γραμμές παλινδρόμησης μέσω την αρχή των αξόνων

k και k': οι κλίσεις των αντίστοιχων γραμμών παλινδρόμησης μέσω της αρχής των αξόνων.

Πίνακας 4.5 Κριτήρια αποδοχής τριδιάστατου μοντέλου για τη μεθοδολογία CoMFA με χρήση του κόμβου Enalos KNIME

CoMFA		
Κριτήριο	Εκτίμηση	Αποτέλεσμα
$R^2 > 0,6$	ΘΕΤΙΚΗ	$R^2 = 0,862$
$R_{ext}^2 > 0,5$	ΘΕΤΙΚΗ	$R_{ext}^2 = 0,867$
$(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R_0^2) / R^2 = 0,015$
ή $(R^2 - R'_{o^2}) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R'_{o^2}) / R^2 = 0,0$
$ (R_0^2 - R'_{o^2}) < 0,3$	ΘΕΤΙΚΗ	$ (R_0^2 - R'_{o^2}) = 0,013$
$0,85 \leq k \leq 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 1,028$
ή $0,85 \leq k' \leq 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 0,932$
<u>ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ</u>		

Πίνακας 4.6 Κριτήρια αποδοχής τριδιάστατου μοντέλου για τη μεθοδολογία CoMSIA με χρήση του κόμβου Enalos KNIME

CoMSIA		
Κριτήριο	Εκτίμηση	Αποτέλεσμα
$R^2 > 0,6$	ΘΕΤΙΚΗ	$R^2 = 0,859$
$R_{ext}^2 > 0,5$	ΘΕΤΙΚΗ	$R_{ext}^2 = 0,76$
$(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R_0^2) / R^2 = 0,026$
ή $(R^2 - R'_{o^2}) / R^2 < 0,1$	ΑΡΝΗΤΙΚΗ	$(R^2 - R'_{o^2}) / R^2 = 0,11$
$ (R_0^2 - R'_{o^2}) < 0,3$	ΘΕΤΙΚΗ	$ (R_0^2 - R'_{o^2}) = 0,072$
$0,85 \leq k \leq 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 1,081$
ή $0,85 \leq k' \leq 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 0,859$
<u>ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ</u>		

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα δύο μοντέλα 3D-QSAR CoMFA και 3D-QSAR CoMSIA είναι αξιόπιστα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σχεδιασμό νέων αναστολέων του ιοντικού διαύλου της πρωτεΐνης M2 του ιού *Influenza A*.

4.5.5 Ισοϋψείς χάρτες CoMFA και CoMSIA

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων των μεθοδολογιών CoMFA και CoMSIA μπορούν να παρουσιαστούν γραφικά με τη χρήση των ισοϋψών χαρτών πεδίων. Σε αυτούς τους χάρτες περιγράφεται η στατιστική σχέση μεταξύ των πεδίων CoMFA και CoMSIA αντίστοιχα, καθώς και της πειραματικής τιμής δραστηριότητας των ενώσεων έναντι της αναστολής του ιοντικού διαύλου της μεμβρανικής πρωτεΐνης M2 κατά του ιού της *Influenza A*. Οι τιμές των πεδίων εξάγονται από το γινόμενο $StDev * Coeff$ που προκύπτει με τον πολλαπλασιασμό του συντελεστή περιγραφής του πεδίου (descriptor coefficient) και της αντίστοιχης τυπικής απόκλισης (standard deviation).

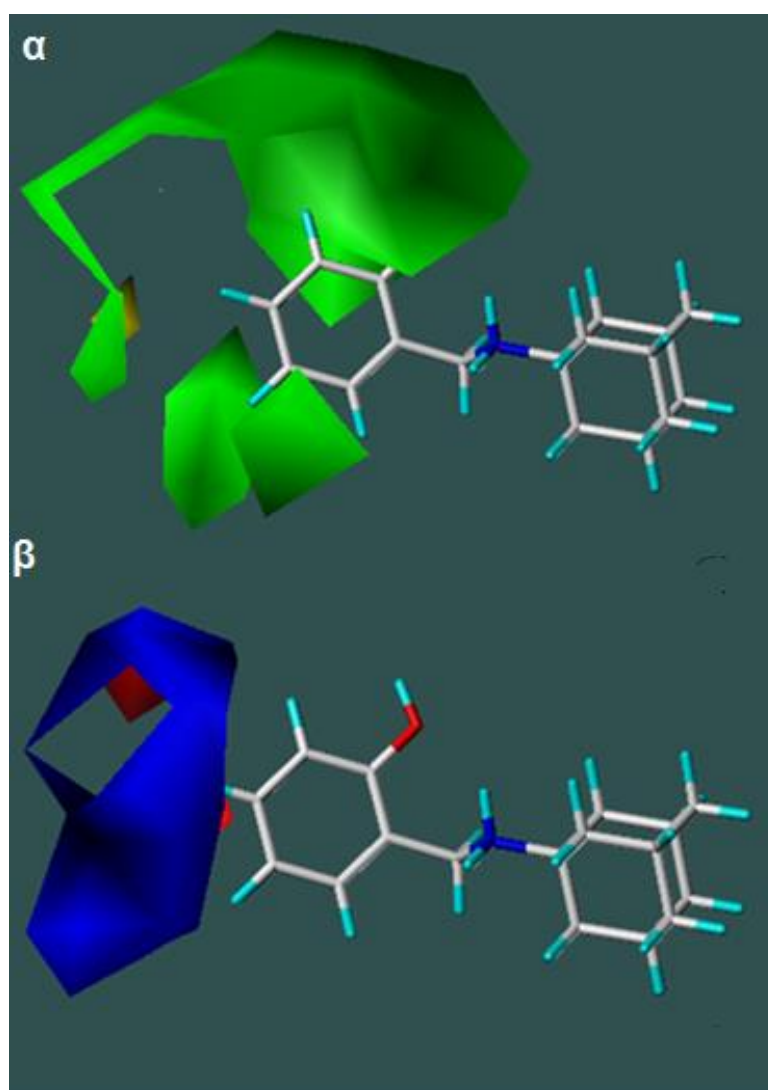
Σε αυτούς τους χάρτες γίνονται ορατές οι περιοχές γύρω από την ένωση, οι οποίες αλληλεπιδρούν θετικά ή αρνητικά με τον υποδοχέα. Οι χάρτες χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν τα δομικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη βιολογική δραστηριότητα των παραγώγων και λαμβάνονται πληροφορίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω σχεδιασμό ως αναστολείς του ιού *Influenza A*. Οι ισοϋψείς χάρτες με τα πεδία CoMFA και CoMSIA για μια δραστική ένωση (ένωση **29**) παριστάνονται στα Σχήματα 4.9 και 4.10 αντίστοιχα.

4.5.5.1 Ισοϋψείς χάρτες CoMFA

Στην περίπτωση της μεθοδολογίας CoMFA μπορούν να αναλυθούν μόνο οι στεरिकές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της ένωσης με τον υποδοχέα. Τα πεδία CoMFA γύρω από τη δραστική ένωση **29** εμφανίζονται στο Σχήμα 4.9. Οι στερικές (στερεοχημικές) αλληλεπιδράσεις αναπαρίστανται με πράσινο και κίτρινο χρώμα (Σχήμα 4.9α), όπου ογκώδεις ομάδες πλησίον στις πράσινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση ενώ αν βρεθούν στις κίτρινες περιοχές τη μειώνουν. Η παρουσία φθορίου στην ένωση **23**, ως υποκατάστατης στη μετα-θέση παρουσιάζει χαμηλότερη δραστηριότητα (65%) από ό,τι η

παρουσία χλωρίου σε ορθο- ή μετα-θέση (ενώσεις **24** και **33** με αναστολή 78%). Ως εκ τούτου, όσο αυξάνεται η ιοντική ακτίνα του αλογόνου προβλέπεται να αυξάνεται η ανασταλτική δράση του προσδέτη.

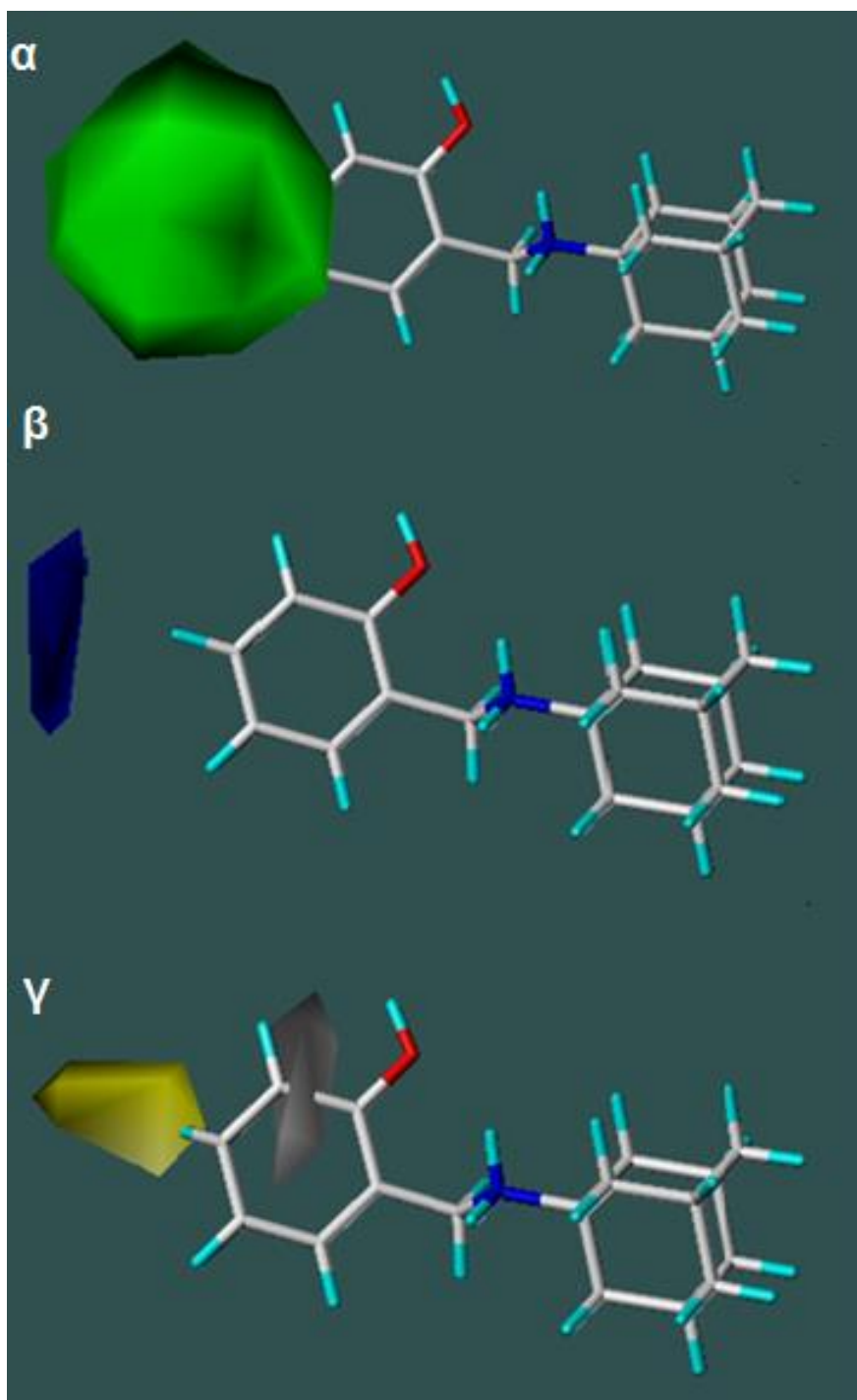
Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με κόκκινο και μπλε χρώμα (Σχήμα 4.9β), όπου ομάδες αρνητικά φορτισμένες κοντά στις κόκκινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση ενώ τη μειώνουν κοντά στις μπλε περιοχές, όπου αντίθετα ευνοείται η παρουσία των ηλεκτροθετικών ομάδων.



Σχήμα 4.9 Οι ισοϋψείς χάρτες StDev*Coeff των πεδίων CoMFA για την δραστική ένωση **29**: (α) συμπαγείς για το στεरिकό πεδίο (πράσινο: προτιμώνται οι ογκώδεις ομάδες, κίτρινο: δεν προτιμώνται οι ογκώδεις ομάδες), (β) συμπαγείς για το ηλεκτροστατικό πεδίο (μπλε: προτιμώνται οι ηλεκτροθετικές ομάδες, κόκκινο: προτιμώνται οι ηλεκτραρνητικές ομάδες).

4.5.5.2 Ισοϋψείς χάρτες CoMSIA

Στην παρούσα ανάλυση της μεθοδολογίας CoMSIA αναλύονται οι στερικές, ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οι ισοϋψείς χάρτες με τα πεδία CoMSIA για τη δραστική ένωση **29** παριστάνονται στο Σχήμα 4.10. Οι στερικές αλληλεπιδράσεις παριστάνονται με τις πράσινες και κίτρινες περιοχές ισοϋψών χαρτών (Σχήμα 4.10α), όπου ογκώδεις ομάδες κοντά στις πράσινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση, το αντίθετο αποτέλεσμα προκαλείται κοντά στις κίτρινες περιοχές. Παρατηρείται ότι η υποκατάσταση σε μετα- ή παρα-θέση στον βενζολικό δακτύλιο προβλέπεται να αυξήσει τη βιολογική δράση. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με κόκκινο και μπλε χρώμα (Σχήμα 4.10β), όπου ομάδες αρνητικά φορτισμένες κοντά στις κόκκινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση ενώ τη μειώνουν κοντά στις μπλε περιοχές, όπου αντίθετα ευνοείται η παρουσία των ηλεκτροθετικών ομάδων. Τέλος, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με κίτρινες και λευκές περιοχές ισοϋψών χαρτών (Σχήμα 4.10γ), όπου υδρόφοβες ομάδες κοντά στις κίτρινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση, ενώ τη μειώνουν κοντά στις λευκές περιοχές.



Σχήμα 4.10 Οι ισοϋψείς χάρτες StDev*Coeff των πεδίων CoMSIA για τη δραστική ένωση 29: (α) συμπαγείς για το στερικό πεδίο (πράσινο: προτιμώνται οι ογκώδεις ομάδες, κίτρινο: δεν προτιμώνται οι ογκώδεις ομάδες), (β) συμπαγείς για το ηλεκτροστατικό πεδίο (μπλε: προτιμώνται οι ηλεκτροθετικές ομάδες, κόκκινο: προτιμώνται οι ηλεκτραρνητικές ομάδες), (γ) συμπαγείς για το πεδίο υδροφοβίας (κίτρινο: προτιμώνται οι υδρόφοβες ομάδες, γκρι ανοιχτό: δεν προτιμώνται οι υδρόφοβες ομάδες, προτιμώνται οι υδρόφιλες).

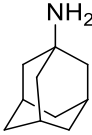
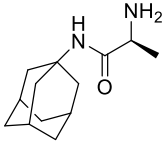
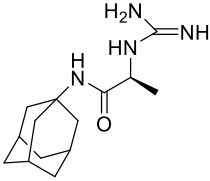
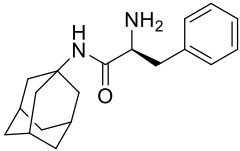
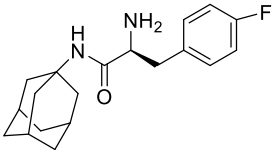
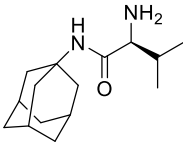
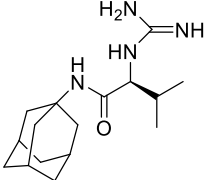
4.6 Έλεγχος δραστηριότητας νέων αδαμαντανικών αναλόγων με τη χρήση των μοντέλων 3D-QSAR (CoMFA & CoMSIA)

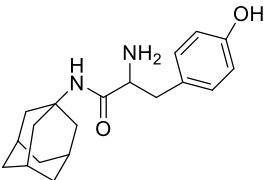
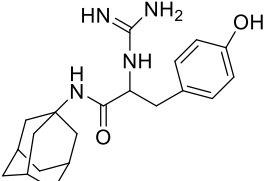
Η αμανταδίνη ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του 1960, όπως έχει ήδη αναφερθεί, και αποτελεί το πρώτο αδαμαντανικό ανάλογο, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την αντιμετώπιση του ιού της *Influenza A* ως αναστολέας του ιοντικού διαύλου της πρωτεΐνης M2. Η ριμανταδίνη άρχισε να χρησιμοποιείται τη δεκαετία του 1980. Ο αρκετά μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων ήταν η βασική αιτία εμφάνισης ανοχής στα συγκεκριμένα φάρμακα, γεγονός που καθιστά την έρευνα νέων αδαμαντανικών αναλόγων αναγκαία.

Οι ερευνητές Δρ. Radoslav Chayron, Δρα. Mikaela Schmidtke, Δρ. Ανδρέας Τζάκος συνέθεσαν, αξιολόγησαν και ανέλυσαν μια σειρά αδαμαντανικών αναλόγων σκεπτόμενοι ότι ένας τρόπος να αυξηθεί η αντιική δραστηριότητα αυτής της κατηγορίας ενώσεων είναι να προστεθούν δραστικές λειτουργικές ομάδες που είναι ικανές να διαταράξουν τη ροή πρωτονίων με αποτέλεσμα την αναστολή του ιοντικού διαύλου της M2. Πηγή τέτοιων λειτουργικών ομάδων αποτέλεσαν αμινοξέα και πεπτιδία, τα οποία ενσωματώθηκαν στην αμανταδίνη και ριμανταδίνη χρησιμοποιώντας τεχνικές σύνθεσης πεπτιδίων. Για τον λόγο αυτό συντέθηκαν αυτά τα ανάλογα της αμανταδίνης και ριμανταδίνης που φέρουν τα αμινοξέα: γλυκίνη, αλανίνη, β-αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, φαινυλαλανίνη, φαινυλαλανίνη (4-F), τυροσίνη και στην πορεία ελέγχθηκε η βιολογική τους δραστηριότητα *in vitro* κατά του ιού *Influenza A* (ίδη Παράρτημα I). Ορισμένα από τα παράγωγα υπέστησαν «γουανιδοποίηση» στην αμινομάδα του αμινοξέος.

Στην παρούσα εργασία προβλέφθηκε η ανασταλτική δράση των συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή, Πίνακας 4.7, από τα παραχθέντα μοντέλα 3D-QSAR, CoMFA και CoMSIA.

Πίνακας 4.7 Οι μοριακές δομές των οκτώ συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή που αξιολογήθηκαν με τη χρήση των μοντέλων 3D-QSAR.

Ένωση	Δομή	IC ₅₀ (μM)
1		0,39
39		1,41
40		18,37
41		0,75
42		0,81
43		1,32
44		17,13

45		3,93
46		59,71

Για να προβλεφθεί η βιολογική δραστηριότητα των ενώσεων ακολουθήθηκαν όλα τα βήματα που απαιτούνται για την μελέτη των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης. Πιο συγκεκριμένα, τα συζεύγματα ανώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή σχεδιάστηκαν με τη χρήση ChemBioDraw Ultra 14.0⁶¹ και τα SMILES αυτών χρησιμοποιήθηκαν για να προκύψουν οι 3D δομές με τη χρήση του Maestro 10.2.⁷⁷ Στην πορεία, η αμανταδίνη (ένωση 1) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο μόριο για την ευθυγράμμιση με τη χρήση δέκα ατόμων ως ικρίωμα, τα οποία είναι κοινά σε όλα τα παράγωγα που μελετώνται. Τέλος, ελήφθησαν οι προβλεπόμενες τιμές χρησιμοποιώντας τα μοντέλα 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA που αναλύθηκαν στην παράγραφο 4.4. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην συγκεκριμένη ανάλυση έγινε πρόβλεψη και για τα δύο εναντιομερή (*R*, *S*) των οκτώ συζευγμάτων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.8 Οι προβλεπόμενες τιμές των συζευγμάτων αμανταδίνης με πολική κεφαλή λαμβάνοντας υπόψη τη στερεοχημεία, με χρήση των μοντέλων 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA

ID	Προβλεπόμενες τιμές CoMFA ρ(%)	Προβλεπόμενες τιμές CoMSIA ρ(%)	IC ₅₀ (μM)	*Δραστική	Εκτίμηση (δραστική)
1	0,820	0,895	0,39	Ναι	Ναι
39(R)	0,817	1.032			Ναι
39(S)	0,736	0.995	1,41	Ναι	Ναι
40(R)	0,855	0.880			Ναι
40(S)	0,713	0,828	18,37	Ναι	Ναι
41(R)	0,918	1,100			Ναι
41(S)	0,745	0,973	0,75	Ναι	Ναι
42(R)	0,903	1,080			Ναι
42(S)	0,735	0,974	0,81	Ναι	Ναι
43(R)	0.904	1,056			Ναι
43(S)	0,645	0,937	1,32	Ναι	Ναι
44(R)	0,887	0,869			Ναι
44(S)	0,668	0,752	17,13	Ναι	Ναι
45(R)	0,929	1,070			Ναι
45(S)	0,645	0,970	3,93	Ναι	Ναι
46(R)	0,516	0,552			Όχι
46(S)	-0,057	0,413	59,71	Όχι	Όχι

*Θεωρήσαμε μια ένωση δραστική όταν IC₅₀ < 30 μM.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι η δραστικότητα ή μη των αναλόγων επιβεβαιώνεται από τα μοντέλα 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA. Η

ένωση **46** είναι μη δραστική. Ακόμη από την ανάλυση προτείνεται η σύνθεση των αναλόγων που εμφανίζουν *R* στερεοχημεία καθώς αναμένεται μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι στον ιό της *Influenza A*.

4.7 Σύγκριση μοντέλων 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA

Συγκρίνοντας τα δύο μοντέλα 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA που προέκυψαν, διαπιστώνεται ότι το μοντέλο CoMFA υπερτερεί του μοντέλου CoMSIA καθώς τα στατιστικά αποτελέσματα του πρώτου χαρακτηρίζουν ένα πιο επιτυχημένο μοντέλο 3D-QSAR. Στο τριδιάστατο μοντέλο CoMFA, ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών τέσσερα αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή Q^2 στα 0,847 και στο χαμηλότερο SEP στα 0,127 ενώ στο τριδιάστατο μοντέλο CoMSIA, ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών έξι αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή Q^2 στα 0,782 και στο χαμηλότερο SEP στα 0,158. Υπενθυμίζεται ότι ένα ικανοποιητικό μοντέλο 3D-QSAR πρέπει: (i) η τιμή του R^2 (ή q^2), που υπολογίστηκε από την πρώτη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, να είναι όσο το δυνατό μεγαλύτερη του 0,5 ώστε να υπάρχει σημαντική ικανότητα πρόβλεψης και (ii) το SEP να είναι όσο το δυνατό χαμηλότερο. Επιπλέον, στο διάγραμμα συσχέτισης της μεθοδολογίας CoMSIA παρατηρείται ένα σημείο που αποκλίνει σημαντικά από την ευθεία γραμμή του διαγράμματος δικαιολογώντας τον μικρότερο συντελεστή συσχέτισης για την ομάδα ελέγχου και για το λόγο αυτό το μοντέλο CoMFA προτιμάται έναντι του CoMSIA.

Μια άλλη παράμετρος σύγκρισης των δύο μοντέλων είναι τα αποτελέσματα που προέκυψαν από κριτήρια αποδοχής μοντέλων για τις μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA με τη χρήση του κόμβου Enalos KNIME. Και τα δύο μοντέλα εμφανίζουν ικανότητα πρόβλεψης με τη διαφορά ότι το μοντέλο 3D-QSAR CoMFA είναι θετικό σε όλα τα κριτήρια και με εγκυρότερα στατιστικά αποτελέσματα.

Τέλος, συγκρίνοντας τους ισοϋψείς χάρτες των μοντέλων 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA προκύπτουν τα ακόλουθα. Παρατηρείται ότι στη μεθοδολογία CoMFA οι στερικές αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Το ίδιο αναμένεται και με την παρουσία του ογκώδους αλογόνου, Cl, ενώσεις **24**, **33**. Όσον αφορά τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις προτιμώνται θετικά φορτισμένες ομάδες (μπλε περιοχή στους ισοϋψείς χάρτες). Στη μεθοδολογία

CoMSIA λαμβάνονται υπόψη και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (κίτρινο χρώμα), οι οποίες παρατηρώντας τους ισοϋψείς χάρτες φαίνεται να προτιμώνται στη παρα-θέση του βενζολικού δακτυλίου ενώ σε μετα-θέση παρατηρείται να προτιμώνται υδρόφιλες (περιοχή ανοιχτό γκρι). Οι στερικές αλληλεπιδράσεις παρατηρείται να προτιμώνται σε μετα- ή παρα-θέση του βενζολικού δακτυλίου και οι ηλεκτροστατικές σε παρα-θέση. Αξιολογώντας τα παραπάνω παρατηρείται τελικά ότι το μοντέλο 3D-QSAR CoMFA υπερτερεί καθώς δίνει στατιστικά εγκυρότερες τις πληροφορίες για τις στερικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

4.8 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο εφαρμόστηκε μια υπολογιστική ροή εργασίας για την ανάπτυξη μοντέλου τριών διαστάσεων QSAR με σκοπό τον εντοπισμό και την αξιολόγηση νέων βελτιωμένων συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης που δρουν κατά του ιού της *Influenza A*, ως αναστολείς του ιοντικού διαύλου της πρωτεΐνης M2. Από τη σύγκριση των δύο μοντέλων 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA προτιμάται το μοντέλο 3D-QSAR CoMFA καθώς τα στατιστικά του αποτελέσματα παρέχουν πιο εύρωστο μοντέλο. Από την ανάλυση αυτού προτείνεται τα αμινο-συζεύγματα ανώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή που φέρουν βενζολικό δακτύλιο συνδεδεμένο με την αμινομάδα να περιέχουν ογκώδη υποκαταστάτη σε ορθο- ή μετα-θέση ως προς τον βενζολικό δακτύλιο καθώς αναμένεται να αυξηθεί η βιολογική δραστηριότητά τους. Επιπρόσθετα, προτείνεται σε παρα-θέση στον βενζολικό δακτύλιο να έχει μικρό ηλεκτραρνητικό υποκαταστάτη. Με την εφαρμογή των επικυρωμένων μοντέλων 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA σε οκτώ συζεύγματα ανώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή επαληθεύεται η προβλεπτική ικανότητά τους καθώς τα αποτελέσματα των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής – Δράσης επαληθεύουν τις *in vitro* μετρήσεις βιολογικής δραστηριότητας.

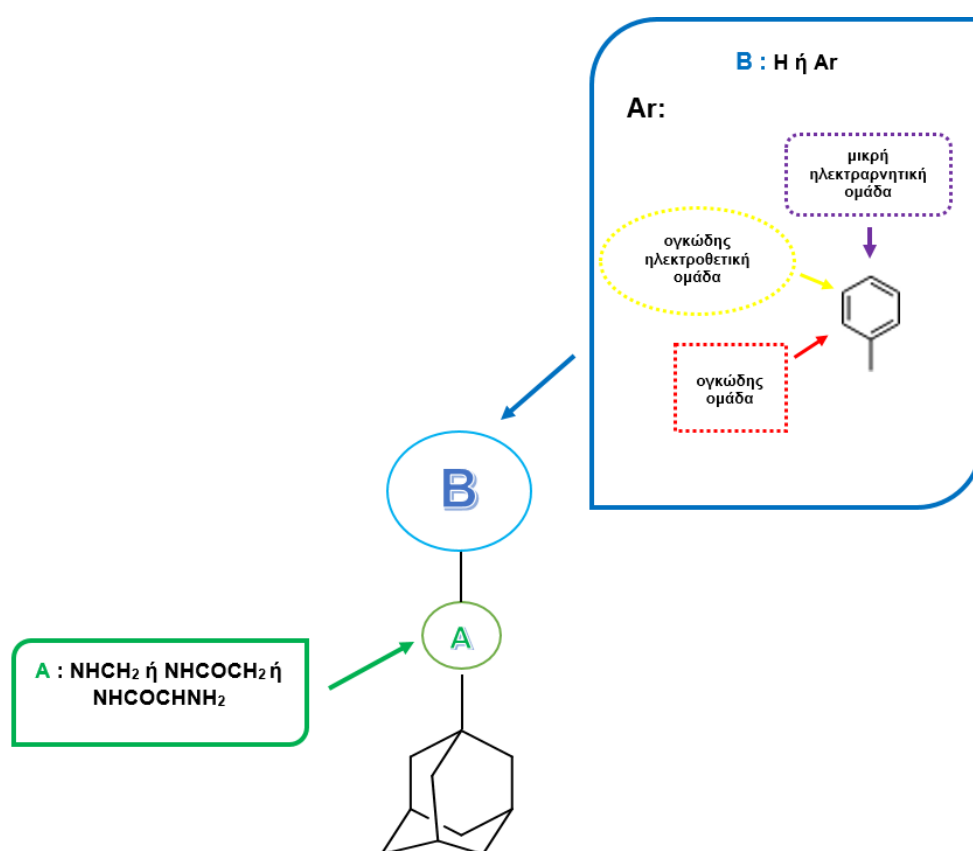
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως είναι γνωστό ο Ορθολογικός Σχεδιασμός φαρμάκων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμακευτικών ενώσεων καθώς μέσω των *in silico* υπολογιστικών πειραμάτων μειώνονται σημαντικά ο απαιτούμενος χρόνος και το κόστος. Η έρευνα μέσω του Ορθολογικού Σχεδιασμού ακολουθεί μια κυκλική πορεία, καθώς ξεκινά από τη σύνθεση και τον βιολογικό έλεγχο των χημικών ενώσεων και καταλήγει πάλι στη σύνθεση και βιολογικό έλεγχο νέων ή καινοτόμων χημικών ενώσεων.

Τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης αδυνατούν να εξηγήσουν τη βιολογική δραστηριότητα ενώσεων, για αυτό συνδυάζονται τέλεια με τις ποσοτικές σχέσεις δομής – δράσης (QSAR). Ένας προφανής λόγος είναι η ευελιξία του πρωτεϊνικού στόχου. Ένας δεύτερος λόγος είναι ο ρόλος των μορίων ύδατος κατά την πρόσδεση, ο οποίος δεν είναι ακόμη εξακριβωμένος σε όλα τα υπό μελέτη συστήματα, τα οποία βασίζονται σε στατικές πόζες κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Προς άρση της δυσκολίας αυτής εφαρμόζονται ποσοτικές σχέσεις δομής – δράσης (QSAR). Οι αναλύσεις τριδιάστατων ποσοτικών σχέσεων δομής – δράσης (3D-QSAR) αποτελούν ένα αξιόλογο «εργαλείο» καθώς δίνουν πληροφορίες για την βιολογική δράση ενώσεων χωρίς να είναι απαραίτητος ο τρόπος πρόσδεσης στον αντίστοιχο υποδοχέα. Οι τριδιάστατοι ισοϋψείς χάρτες επικυρωμένων μοντέλων 3D-QSAR παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων που είναι υπεύθυνα για την αυξημένη βιολογική δράση.

Στη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία οι μελέτες μοριακής πρόσδεσης δεν έδωσαν χρήσιμα ερευνητικά αποτελέσματα καθώς η πρόσδεση των υπό μελέτη μορίων κατευθυνόταν σε διάφορα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Προς τούτο εφαρμόστηκε η ανάπτυξη μοντέλων 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA. Τα αποτελέσματα των τριδιάστατων ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης έδωσαν σημαντικές κατευθύνσεις για τη σύνθεση και αξιολόγηση καινοτόμων ενώσεων που αναστέλλουν τη δράση του ιοντικού διαύλου της πρωτεΐνης M2 του ιού της *Influenza A*.

Στο παρακάτω σχήμα προτείνονται οι προβλεπόμενες υποκαταστάσεις σύμφωνα με το μοντέλο 3D-QSAR CoMFA που εξήχθη. Αναλυτικά, για την αύξηση της ανασταλτικής δράσης των συζευγμάτων ενώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή προτιμάται να φέρουν δύο ομάδες, όπου η ομάδα A μπορεί να είναι NHCH_2 ή NHCOCH_2 ή NHCOCHNH_2 και η ομάδα B μπορεί να είναι ένα υδρογόνο ή ένα αρύλιο (Ar) που θα φέρει σε παρα-θέση μικρή ηλεκτραρνητική ομάδα ή/και σε μετα-θέση ογκώδη ηλεκτροθετική ομάδα ή/και σε ορθο-θέση ογκώδη ομάδα.



Οι μελέτες τριδιάστατων ποσοτικών σχέσεων δομής – δράσης που πραγματοποιήθηκαν σε συζεύγματα ανώσεων αμανταδίνης με πολική κεφαλή που συντέθηκαν και αξιολογήθηκαν βιολογικά από τους ερευνητές Δρ. Radoslav Chayron, Δρα. Mikaela Schmidtke και Δρ. Ανδρέα Τζάκο επιβεβαίωσαν τη βιολογική τους δραστηριότητα. Προτείνεται η σύνθεση των αναλόγων που εμφανίζουν *R* στερεοχημεία καθώς αναμένεται να αυξηθεί η βιολογική δραστηριότητα αυτών.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
2D	Δύο διαστάσεων
3D	Τριών διαστάσεων
4D	Τεσσάρων διαστάσεων
Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Toxicity	Απορρόφηση-Κατανομή-Μεταβολισμός-Απέκκριση-Τοξικότητα
Alignment	Ευθυγράμμιση
Amantadine	Αμανταδίνη
Comparative Molecular Field Analysis	Συγκριτική Ανάλυση Μοριακών Πεδίων
Comparative Molecular Similarity Indices Analysis	Συγκριτική Ανάλυση Δεικτών Μοριακής Ομοιότητας
Contour maps	Ισοϋψείς χάρτες
Core	Πυρήνας
Cross validation	Διασταυρούμενη επικύρωση
Dataset alignment	Ευθυγράμμιση ομάδας δεδομένων
Delete waters	Διαγραφή νερών
Descriptor coefficient	Συντελεστής περιγραφικής μεταβλητής
Descriptors	Περιγραφικές μεταβλητές
Energy minimization	Ελαχιστοποίηση ενέργειας
Extra Precision	Υψηλή Ακρίβεια
False positives	Ψευδώς θετικά
flu	γρίπη

Food and Drug Administration	(Οργανισμός) Διαχείρισης Τροφίμων και Φαρμάκων
Formal charge	Τυπικό φορτίο
Genetic Algorithms	Γενετικοί Αλγόριθμοι
Grid Cell Occupancy Descriptors	Δίκτυο Κυψελίδων περιγραφικών δεικτών πληρότητας
Grid/lattice	Πλέγμα
gripan	αρπάζω απότομα
gripe	αρπάζω απότομα
High Throughput Virtual Screening	Διαλογή Υψηλής Απόδοσης
<i>In silico</i>	Υπολογιστικά
<i>In vitro</i>	Μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα
influentia	επιρροή
<i>influenza</i>	Γρίπη
<i>Influenza virus A</i>	Ιός της γρίπης τύπου A
<i>Influenza virus B</i>	Ιός της γρίπης τύπου B
<i>Influenza virus C</i>	Ιός της γρίπης τύπου C
<i>Influenza virus D</i>	Ιός της γρίπης τύπου D
Interaction Pharmacophore Elements	Φαρμακοφόρα στοιχεία αλληλεπίδρασης
Internal predictive ability	Εσωτερική ικανότητα πρόβλεψης
ligand	Προσδέτης
Ligand preparation (LigPrep)	Προετοιμασία προσδέτη
Matrix	Μητρική
Molecular Docking	Μοριακή πρόσδεση
Molecular Dynamics	Μοριακή δυναμική
mRNA	Αγγελιοφόρο RNA
No validation	Μη διασταυρούμενη επικύρωση

Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
Optimum Number of Components	Βέλτιστος αριθμός συνιστωσών
<i>Orthomyxoviridae</i>	Ορθοβλεννοϊοί
Partial Least Square Analysis	Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων
Probe atoms	Άτομα αισθητήρες
Protein Preparation Wizard	Εφαρμογή προετοιμασίας πρωτεϊνών
Quantitative Structure – Activity Relationships	Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης
Rational Drug Design	Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων
Receptor Dependent	Εξαρτώμενος υποδοχέας
Receptor Independent	Μη εξαρτώμενος υποδοχέας
Refinement	τελειοποίηση
Region core	Περιοχή του πυρήνα
Rimantadine	Ριμανταδίνη
Rotamer group	Περιστρεφόμενες ομάδες
Site	τοποθεσία
Standard deviation	Τυπική απόκλιση
Standard Error of Estimate	Τυπικό Σφάλμα Εκτίμησης
Standard Error of Prediction	Τυπικό σφάλμα εκτίμησης
Standard Precision	Τυπική Ακρίβεια
Structure-based alignment	Ευθυγράμμιση βασισμένη στη δομή του υποδοχέα
Template molecule	Μόριο οδηγός
Test set	Ομάδα ελέγχου
Training set	Ομάδα εκπαίδευσης ή εκμάθησης
Two Electrode Voltage Clamp	Δύο Ηλεκτρόδια Σφικτήρων Τάσης

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

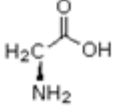
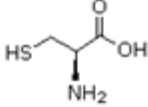
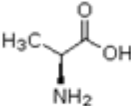
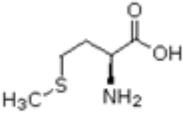
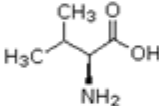
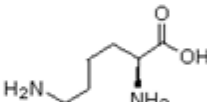
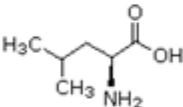
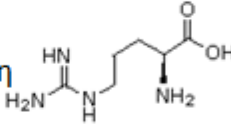
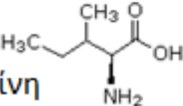
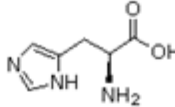
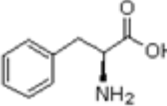
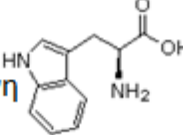
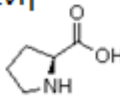
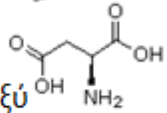
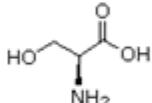
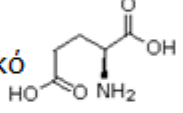
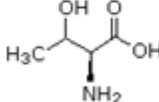
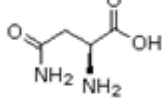
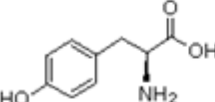
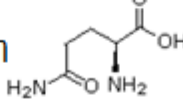
2D	Two dimensional
2D-QSAR	Two dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship
3D	Three dimensional
3D-QSAR	Three dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship
4D	Four dimensional
4D-QSAR	Four dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship
ADMET	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity
Am	Αμανταδίνη
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
CoMSIA	Comparative Molecular Similarity Indices Analysis
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine (1,2-διπαλμιτοϋλο- <i>sn</i> -γλυκερο-3-φωσφοχολίνη)
EC ₅₀	Half maximal Effective Concentration
FDA	Food and Drugs Administration
GA	Genetic Algorithms
GCODs	Grid Cells Occupancy Descriptors
GLIDE	Grid-based Ligand Docking with Energetics
GOLD	Genetic Optimization for Ligand Docking
GS	GLIDE Score
H1, H2, H3	Διαφορετικά μόρια αιμοσυγκολλητίνης
H1N1	Υπότυπος του ιού της Influenza A
H2N2	Υπότυπος του ιού της Influenza A
H3N2	Υπότυπος του ιού της Influenza A
H5N1	Υπότυπος του ιού της Influenza A
HA	Αιμοσυγκολλητίνη

HA1	Υπομονάδα 1 της αιμοσυγκολλητίνης
HA2	Υπομονάδα 2 της αιμοσυγκολλητίνης
HTVS	High-Throughput Virtual Screening
IC ₅₀	Half maximal Inhibitory Concentration
IPE	Interaction Pharmacophore Elements
KNIME	Konstanz Information Miner
LOO	Leave One Out
M1	Μεμβρανική ή μητρική πρωτεΐνη 1
M2	Μεμβρανική ή μητρική πρωτεΐνη 2
MC	Monte Carlo
N1, N2, N3	Διαφορετικά μόρια νευραμινιδάσης
NA	Νευραμινιδάση
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP	Νουκλεοπρωτεΐνη
ONC	Optimum Number of Components
OPLS	Optimized Potentials for Liquid Simulations
PA	Όξινη πρωτεΐνη πολυμεράσης
PB1	Βασική πρωτεΐνη πολυμεράσης 1
PB2	Βασική πρωτεΐνη πολυμεράσης 2
PLS	Partial Least Squares, Projection to Latent Structures
Q ² ή r ² _{cv}	Cross-validated correlation coefficient
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
R ² _{ncv} ή R ² _{train}	Non-validated correlation coefficient
R ² _{test} ή R ²	correlation coefficient for test set
RD	Receptor Dependent
RI	Receptor Independent
Rim	Ριμανταδίνη
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNA	Ribonucleic acid
RNP	Ριβονουκλεοπρωτεΐνη
SEE	Standard Error of Estimate
SEP	Standard Error of Prediction

SMILES	Simplified Molecular-Input Line-Entry System
SP	Standard Precision
ssNMR	Solid state Nuclear Magnetic Resonance
TEVC	Two Electrodes Voltage Clamp
WT	Wild Type
XP	Extra Precision
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
μM	Micromolar
ΜΣΑΦ	Μη Στερεοειδή Αντιφλεγμονώδη Φάρμακα

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Α. ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Γλυκίνη		Gly	G	Κυστεΐνη		Cys	C
Αλανίνη		Ala	A	Μεθειονίνη		Met	M
Βαλίνη		Val	V	Λυσίνη		Lys	K
Λευκίνη		Leu	L	Αργινίνη		Arg	R
Ισολευκίνη		Ile	I	Ιστιδίνη		His	H
Φαινυλαλανίνη		Phe	F	Θρυπτοφάνη		Trp	W
Προλίνη		Pro	P	Ασπαρτικό οξύ		Asp	D
Σερίνη		Ser	S	Γλουταμινικό οξύ		Glu	E
Θρεονίνη		Thr	T	Ασπαραγίνη		Asn	N
Τυροσίνη		Tyr	Y	Γλουταμίνη		Gln	Q

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Κούρτη Αφροδίτη, *Ανίχνευση και Τυποποίηση Ιών Γρίπης σε λοιμώξεις του Αναπνευστικού συστήματος*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016.
2. Ζωίδης Γρηγόριος, *Νέα αζωτούχα παράγωγα του αδαμαντανίου με φαρμακολογική δράση*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2006.
3. Ιωαννίδης Χαράλαμπος, *Πειραματική και υπολογιστική μελέτη της αλληλεπίδρασης αμινοαδαμαντανικών προσδετών με τον διαμεμβρανικό πόρο του ιοντικού διαύλου της πρωτεΐνης του ιού της influenza A/M2 (Udorn, Weybridge)*, Διπλωματική Εργασία, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.4
4. S. D. Cady, W. Luo, F. Hu and M. Hong, Structure and Function of the Influenza A M2 Proton Channel, *Biochemistry*, vol. 48, no. 31, Aug. 2011, pp. 7356-7364.
5. J. L. Thomaston, W. L. DeGrado, Crystal structure of the drug-resistant S31N influenza M2 proton channel, *Protein Sci.*, vol. 25, no. 8, Aug, 2016, pp. 1551-1554.
6. E. Tognotti, Influenza pandemics: a historical retrospect, *J. Infect. Dev. Ctries.*, vol. 3, no. 5, Jun. 2009, pp.331-334.
7. R. G. Webster and W. G. Laver, The origin of pandemic influenza, *Bull World Health Organ.*, vol. 47, no. 4, 1972, pp. 449–452.
8. Y. C. Hsieh, T. Z. Wu, D.P. Liu, P. L. Shao, L. Y. Chang, C. Y. Lu, C. Y. Lee, F. Y Huang, L. M. Huang, Influenza pandemics: past, present and future, *J. Formos. Med. Assoc.*, vol. 105, no. 1, Jan. 2016, pp. 1-6.
9. <https://virus.stanford.edu/uda/>, *The Influenza Pandemic of 1918*.
10. K. S. Li, Y. Guan, J. Wang, G. J. Smith, K. M. Xu, L. Duan, A. P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. T. Estoepangestie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H. T. Long, N. T. Hanh, R. J. Webby, L. L.

- Poon, H. Chen, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, R. G. Webster, J. S. Peiris, Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia, *Nature*, vol. 430, no. 6996, Jul. 2004, pp. 209-213.
11. J. A. Cordova, M. Hernandez, P. R. Chavez, H. L. Gatel, Update: novel influenza A (H1N1) virus infection-Mexico, *MMWR*, vol. 58, no. 21, March-May 2009, pp. 585-589.
 12. <https://en.wikipedia.org/wiki/Orthomyxoviridae>_Orthomyxoviridae.
 13. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy:2017Release> International Committee on Taxonomy of Viruses.
 14. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum, *Bull World Health Organ.*, vol. 58, no. 4, 1980, pp. 585-591.
 15. R. A. Lamb and R. M. King, Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication, *In Fields Virology*, vol. 1, pp. 1487-1531.
 16. B. Perales, J. Ortín, The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA, *J. Virol.*, vol. 71, 1997, pp. 1381-1385.
 17. Y. Nakagawa, N. Kimura, T. Toyoda, K. Mizumoto, A. Ishihama, K. Oda, S. Nakada, The RNA polymerase PB2 subunit is not required for replication of the influenza virus genome but is involved in capped mRNA synthesis, *J Virol.*, vol. 69, no. 2, Feb. 1995, pp.728-733.
 18. P. Digard, V. C. Blok, S. C. Inglis, Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes, *Virology*, vol. 171, no. 1, Jul. 1989, pp. 162-169.
 19. B. Perales, S. DeLaLuna, I. Palacios, J. Ortín, Mutational analysis identifies functional domains in the influenza A virus PB2 polymerase subunit, *J. Virol.*, vol. 70, no. 3, Mar. 1996, pp. 1678-1686.
 20. S. G. Lazarowitz, P. W. Choppin, Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide, *Virology*, vol. 68, no. 2, December 1975, pp. 440-454.

21. K. Martin, A. Helenius, Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import, *Cell*, vol. 67, no. 1, Oct. 1991, pp. 117-130.
22. R. E. O'Neill, R. Jaskunas, G. Blobel, P. Palese, J. Moroianu, Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import, *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 39, Sep. 1995, pp.22701-22704.
23. T. Liu, J. Muller, Z. Yez, Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins may control viral growth and morphology, *Virology*, vol.304, no.1, Dec. 2002, pp. 89-96.
24. P. Gómez Puertas, C. Albo, E. Pérez Pastrana, A. Vivo and A. Portela, Influenza Virus Matrix Protein Is the Major Driving Force in Virus Budding, *J. Virol.*, vol, 74, no. 24, Dec. 2000, pp. 11538–11547.
25. X. Huang, T. Liu, J. Muller, R. A. Levandowski, Z. Ye, Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export, *Virology*, vol. 287, no. 2, Sep. 2011 pp.405-416.
26. R. A. Lamb, S. L. Zebedee, C. D. Richardson, Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface, *Cell*, vol. 40, no 3, Mar. 1985, pp. 627-633.
27. P. C. Roberts, R. A. Lamb, R. W. Compans, The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation, *Virology*, vol. 240, no. 1, Jan. 1998, pp.127-137.
28. J. Pendergrass, Canine Influenza A Virus Outbreak in the United States, *American Veterinarian*, Dec. 2017, <https://www.americanveterinarian.com/news/canine-influenza-a-virus-outbreak-in-the-united-states>.
29. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Influenza_nomenclature.svg, Ονοματολογία του ιού της γρίπης.
30. <http://www.isg.org.au/index.php/about-influenza/influenza-viruses/> Ο ιός της γρίπης τύπου A.

31. <http://www.virology.ws/2009/04/30/structure-of-influenza-virus/> Η δομή του ιού της γρίπης.
32. F.Arias, M. Escalera-Zamudio, L. Soto-Del Río Mde, A. G. Cobián-Güemes, P. Isa, S. López, Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1), *Arch. Med. Res.*, vol. 40, no. 8, Nov. 2009, pp. 643-654.
33. European Centre for Disease Prevention and Control, Experimental Infectivity Of H3N8 In Swine, *J. Virol.*, Aug. 2015, https://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/documents/0905_pandemic_influenza_pandemics_of_influenza.pdf.
34. https://en.wikipedia.org/wiki/Ion_channel Ιοντικός δίαυλος.
35. Ion Channel Stable Cell Lines, Creative Biogen, <https://www.creative-biogene.com/Product/Ion-Channel-Stable-Cell-Lines.html> .
36. P. Venkataraman, R. A. Lamb, L. H. Pinto LH, Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus, *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 22, Jun. 2005, pp. 21463-21467.
37. Y. Wu, B. Canturk, H. Jo, C. Ma, E. Gianti, M. L. Klein, L. H. Pinto, R. A. Lamb, G. Fiorin, J. Wang, W. F. DeGrado, Flipping in the pore: discovery of dual inhibitors that bind in different orientations to the wild-type versus the amantadine-resistant S31N mutant of the influenza A virus M2 proton channel, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, no. 52, Dec. 2014, pp. 17987-17995.
38. Καλαμαράς Ιωάννης, *Ανάπτυξη και Μελέτη Γραμμικών Σουλφονωμένων και θερμικά διασυνδεδεμένων πολυμερικών ηλεκτρολυτών*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2011.
39. H. Takeuchi, A. Okada, T. Miura, Roles of the histidine and tryptophan side chains in the M2 proton channel from influenza A virus, *FEBS Lett.*, vol. 552, no. 1, Sep. 2003, pp.35-38.
40. A. Okada, T. Miura, H. Takeuchi, Protonation of histidine and histidine-tryptophan interaction in the activation of the M2 ion channel from influenza a virus, *Biochemistry*, vol. 40, no. 20, May 2001, pp. 6053-6060.

41. G. Stiver, The treatment of influenza with antiviral drug, *CMAJ*, vol. 168, no. 1, Jan. 2003, pp. 49-56.
42. R. Liang, J. M. J. Swanson, J. J. Madsen, M. Hong, W. F. DeGrado, and G. A. Voth, Acid activation mechanism of the influenza A M2 proton channel, *PNAS*, vol. 113, no. 45, Nov. 2016, pp. 6955-6964.
43. A. J. Hay, A. J. Wolstenholme, J. J. Skehel, M. H. Smith, The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine, *EMBO J.*, vol. 4, no. 11, Nov. 1985, pp 3021-3024.
44. Μ. Μαρσέλος, Μ. Κωνσταντή, Π. Παππάς, Κ. Αντωνίου, Φαρμακολογία II –Χημειοθεραπεία , Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, http://ecourse.uoi.gr/pluginfile.php/89440/mod_resource/content/1/iostatika_foititwn.pdf .
45. Β. Μαγκριώτη, *Ενώσεις με Φαρμακολογικό Ενδιαφέρον*, 2017 Σημειώσεις Μεταπτυχιακού Προγράμματος, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, pp. 27-36.
46. Θ. Μαυρομούστακος και Π. Ζουμπουλάκης, *Μοριακή Μοντελοποίηση, Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία*, Ιατρικές Εκδόσεις Γ. Β Παρισιάνος, 2008, pp. 32-126.
47. Βροντάκη Ελένη, *Εικονικός Βιολογικός Έλεγχος Βάσεων Δεδομένων Χημικών Μορίων με Τριδιάστατα Μοντέλα Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (3D-QSAR): Εξερεύνηση Καινοτόμων Φαρμακευτικών Μορίων για τη Θεραπεία της Ηπατίτιδας C και της Μεσογειακής Αναιμίας*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016.
48. Μόσχοβου Καλλιόπη και Τζίβα Μαρία, *Μοριακή Πρόσδεση Αναλόγων του ε- ουροκανικού οξέος στον AT1 υποδοχέα*, Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2014.
49. Β. Δημόπουλος και Α. Τσαντίλη-Κακουλίδου, *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων*, Ελληνικά Ακαδημαϊκά Συγγράμματα και Βοηθήματα, 2015, pp. 109-129.

50. C. H. Andreade, K. F. Pasqualoto, E. I. Ferreira and A. J. Hopfinger, 4D-QSAR: Perspectives in Drug Design, *Molecules*, vol.15, 2010, pp. 3281-3294.
51. A. Avdeef, Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state), *Curr. Top. Med. Chem*, vol. 1, no. 4, Sep. 2001, pp. 277-351.
52. R.D. Cramer, D.E. Patterson, and J.D. Bunce, Comparative Molecular-Field Analysis (Comfa) .1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 18, Aug. 1988, pp. 5959-5967.
53. K.H. Kim, G. Greco, and E. Novellino, A critical review of recent CoMFA applications, *Perspect. Drug Discovery Des.*, vol. 12-14, Jan. 1998, pp. 257-315.
54. S. Wold, A. Ruhe, H. Wold, and W.J. Dunn, The collinearity problem in linear regression: The partial least squares approach to generalized inverses, *SIAM J. Sci. Stat. Comput.*, vol. 5, 1984, p. 735-743.
55. R.D. Cramer III, J.D. Bunce, D.E. Patterson, and I.E. Frank, Crossvalidation, bootstrapping, and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, vol. 7, no. 1, 1988, pp. 18-25.
56. D.M. Hawkins, S.C. Basak, and D. Mills, Assessing model fit by cross-validation, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 43, no. 2, Mar-Apr. 2003, pp. 579-586.
57. R. P. Kumar, N. Kulkarni, A receptor dependent-4D QSAR approach to predict the activity of mutated enzymes, *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Jul. 2017, pp. 6273.
58. S. D. Cady, K. Schmidt-Rohr, J. Wang, C. S. Soto, W. F. DeGrado, M. Hong, Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers, *Nature*, vol. 463, no. 7281, Feb, 2010, pp.689-92.
59. O. Carugo, D. Bordo, How Many Water Molecules Can Be Detected by Protein Crystallography?, *Acta Cryst.*, vol. 55, 1999, pp. 479–483.

60. F. Li, C. Ma, Y. Hu, Y. Wang, J. Wang, Discovery of Potent Antivirals against Amantadine-Resistant Influenza A Viruses by Targeting the M2-S31N Proton Channel, *ACS*, vol. 2, no. 10, Oct. 2016, pp. 726-733.
61. J. Wang, C. Ma, J. Wang, H. Jo, B. Canturk, G. Fiorin, L. H. Pinto, R. A. Lamb, M. L. Klein, W. F. DeGrado, Discovery of novel dual inhibitors of the wild-type and the most prevalent drug-resistant mutant, S31N, of the M2 proton channel from influenza A virus, *Med, Chem.*, vol. 56, no. 7, Apr. 2013, pp.2804-2812.
62. C. A. Wagner, B. Friedrich, I. Setiawan, F. Lang, S. Bröer, The Use of *Xenopus laevis* Oocytes for the Functional Characterization of Heterologously Expressed Membrane Proteins, *Cell Physiol. Biochem.*, vol. 10, 2000, pp. 1-12.
63. ChemBioDraw Ultra 14.0, ChemBioOffice 2014, PerkinElmer.
64. J. Gasteiger, and M. Marsili, Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges, *Tetrahedron*, vol. 36, no. 22, Mar. 1980, pp. 3219-3228.
65. W.P. Purcell, and J.A. Singer, A brief review and table of semiempirical parameters used in the Hueckel molecular orbital method, *J. Chem. Eng. Data*, vol. 12, 1967, pp. 235-246.
66. Maestro 10.2, Graphical User Interface, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
67. MacroModel, version 10.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
68. G.A. Kaminski, R.A. Friesner, J. Tirado-Rives, and W.L. Jorgensen, Evaluation and reparameterization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides, *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, no. 28, 2001, pp. 6474-6487.
69. LigPrep, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015
70. J. Gasteiger, and M. Marsili, Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges, *Tetrahedron*, vol. 36, no. 22, Mar. 1980, pp. 3219-3228.

71. W.P. Purcell, and J.A. Singer, A brief review and table of semiempirical parameters used in the Hueckel molecular orbital method, *J. Chem. Eng. Data*, vol. 12, 1967, pp. 235-246.
72. SYBYL/QSAR and COMFA, version 8.0, Tripos Inc, St Louis, MO, 2007.
73. Glide, version 6.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
74. M. Kontoyianni, L.M. McClellan, and G.S. Sokol, Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms, *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 3, Jan. 2004, pp. 558-565.
75. G. Klebe, U. Abraham, and T. Mietzner, Molecular similarity indexes in a comparative-analysis (Comsia) of drug molecules to correlate and predict their biological activity, *J. Med. Chem.*, vol. 37, no. 24, Nov. 1994, pp. 4130-4146.
76. G. Melagraki, and A. Afantitis, Enalos KNIME nodes: Exploring corrosion inhibition of steel in acidic medium, *Chem. Intel. Lab. Syst.*, vol. 123, Apr. 2013, pp. 9-14.
77. A. Tropsha, Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation, *Mol. Inf.*, vol. 29, no. 6-7, Jul. 2010, pp. 476-488.
78. A. Golbraikh, and A. Tropsha, Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection, *Mol. Divers.*, vol. 5, no. 4, 2002, pp. 231-243.
79. G. Melagraki, A. Afantitis, H. Sarimveis, O. Igglessi-Markopoulou, and A. Alexandridis, A novel RBF neural network training methodology to predict toxicity to *Vibrio Fischeri*, *Mol. Divers.*, vol. 10, no. 2, May 2006, pp. 213-221.