



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

***In silico* μελέτες βιοδραστικών μορίων που δρουν σε  
κυτταρικό επίπεδο ή πρωτεϊνικούς υποδοχείς**

**ΜΟΣΧΟΒΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**Οκτώβριος 2023**

## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*In silico* μελέτες βιοδραστικών μορίων που δρουν σε κυτταρικό επίπεδο ή πρωτεϊνικούς υποδοχείς

ΜΟΣΧΟΒΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

A.M.: 001803

### ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Μαυρομούστακος Θωμάς, Καθηγητής Χημείας ΕΚΠΑ

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

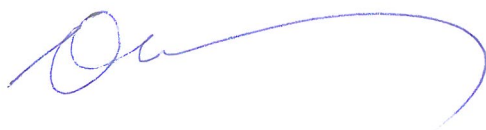
Μαυρομούστακος Θωμάς, Καθηγητής Χημείας ΕΚΠΑ

Μελαγράκη Γεωργία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Στρατιωτικής Σχολής Ευελπίδων

Τζάκος Ανδρέας, Καθηγητής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

### ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

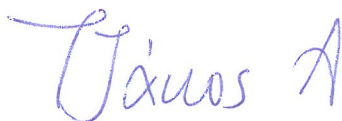
Μαυρομούστακος Θωμάς  
Καθηγητής Χημείας ΕΚΠΑ



Μελαγράκη Γεωργία  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια  
Στρατιωτικής Σχολής Ευελπίδων



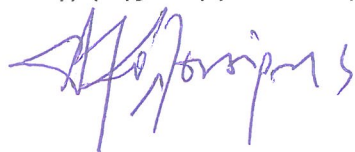
Τζάκος Ανδρέας  
Καθηγητής Χημείας Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων



Τζέλη Δήμητρα,  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας  
ΕΚΠΑ



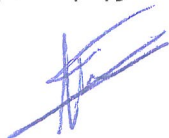
Κολοκούρης Αντώνιος  
Καθηγητής Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ



Ευθυμιάδου Ελένη  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας  
ΕΚΠΑ



Νεοφύτου Παναγιώτης  
Ερευνητής Α' Δημόκριτος



ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 30/10/2023



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήσαμε μια εκτεταμένη έρευνα σχετικά με τις δυνατότητες των φυσικών προϊόντων και των αντιυπερτασικών μορίων ως αναστολέων που στοχεύουν στις βασικές πρωτεΐνες του ιού SARS-CoV-2, συγκεκριμένα την Κύρια Πρωτεάση (Mpro) και την Πρωτεΐνη Ακίδα (S). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης αξιολογήσαμε τη δεσμευτική ικανότητα τους με τη Mpro (σε μια περιοχή πρόσδεσης) και την πρωτεΐνη S ενωμένη με το Μετατρεπτικό Ένζυμο της Αγγειοτασίνης II (ACE2) (τρεις διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης). Για να αποκτήσουμε βαθύτερες γνώσεις σχετικά με τη σταθερότητα και τις μοριακές αλληλεπιδράσεις των συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης-προσδέτη», τα οποία προέκυψαν από τις μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης, πραγματοποιήσαμε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής. Αυτές οι προσομοιώσεις μπορεί να διαλευκάνουν στους μοριακούς μηχανισμούς που αποτελούν τη βάση των πιθανών υποψηφίων φαρμάκων για τη θεραπεία της COVID-19.

Επιπλέον, πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς MM-GBSA σε όλα τα συμπλέγματα «πρωτεΐνης-προσδέτη», τονίζοντας τις ισχυρές ικανότητες δέσμευσης του ροσμαρινικού οξέος, της κουρκουμίνης και της κερκετίνης κατά της Mpro και του σαλβιανολικού οξέος β, του ροσμαρινικού οξέος και της κερκετίνης έναντι της πρωτεΐνης S. Για να επεκτείνουμε περαιτέρω την αναζήτησή μας για ισχυρούς αναστολείς, πραγματοποιήσαμε αναζήτηση δομικής ομοιότητας με βάση τα μόρια που απέδωσαν τα πιο ευνοϊκά αποτελέσματα στις *in silico* μελέτες μας, χρησιμοποιώντας το Enalos Suite της εταιρείας NovaMechanics Ltd Enalos. Το Enalos Suite εντόπισε 115 ενώσεις, οι οποίες εμφάνιζαν δομικές ομοιότητες με το σαλβιανολικό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και την κερκετίνη. Αυτές οι ενώσεις στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε υπολογισμούς Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης, που οδήγησαν στην ταυτοποίηση δύο αναλόγων σαλβιανολικού οξέος, τα οποία παρουσίασα ισχυρή πρόσδεση σε όλες τις εξεταζόμενες περιοχές πρόσδεσης και στις δύο πρωτεΐνες. Αυτή η ανακάλυψη υπογραμμίζει τις δυνατότητές τους ως αναστολείς πολλαπλών στόχων.

Τα ευρήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής ανοίγουν υποσχόμενες δυνατότητες για την ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών παραγόντων που στοχεύουν στη διακοπή του κύκλου ζωής του ιού SARS-CoV-2 και στην αποτελεσματική παρεμπόδιση της είσοδός του στα ανθρώπινα κύτταρα.



**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** COVID-19, SARS-CoV-2, Κύρια Πρωτεάση, Πρωτεΐνη Ακίδα, Μοριακή Μοντελοποίηση, Μοριακή Πρόσδεση, Μοριακή Δυναμική, Αναζήτηση δομικής ομοιότητας

## ABSTRACT

In this dissertation, we conducted an extensive investigation into the potential of natural products and anti-hypertensive molecules as inhibitors targeting key proteins of the SARS-CoV-2 virus, specifically the main protease (Mpro) and the spike (S) protein. Employing Induced Fit Docking (IFD), we assessed how well these molecules bound to these critical viral components. To gain deeper insights into the stability and molecular interactions of the resulting "protein-ligand" complexes from our docking studies, we conducted Molecular Dynamics (MD) simulations. These simulations shed light on the molecular mechanisms that underlie potential drug candidates for COVID-19 treatment. Additionally, we utilized MM-GBSA calculations on all "protein-ligand" complexes, highlighting the strong binding capabilities of rosmarinic acid, curcumin, and quercetin against Mpro, and salvianolic acid B, rosmarinic acid, and quercetin against the S protein. To further expand our search for potent inhibitors, we conducted a structural similarity analysis based on the molecules that yielded the most promising results in our *in silico* studies, using the Enalos Suite. The Enalos Suite identified 115 compounds that shared structural similarities with salvianolic acid, rosmarinic acid, and quercetin. These compounds then underwent IFD calculations, leading to the identification of two salvianolic acid analogues that demonstrated strong binding to all examined binding sites in both proteins. This discovery underscores their potential as multi-target inhibitors. These findings open up potential possibilities for the development of innovative therapeutic agents aimed at disrupting the SARS-CoV-2 virus lifecycle and effectively blocking its entry into human cells.

**SUBJECT AREA:** Rational Drug Design

**KEYWORDS:** COVID-19, SARS-CoV-2, Main protease, Spike protein, Molecular Docking, Molecular Dynamics simulations, Similarity search



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Θωμά Μαυρομούστακο για την υποστήριξή του και την πολύτιμη βοήθειά του σ' επιστημονικά θέματα καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Οι επιστημονικές συμβουλές του και οι εύστοχες παρατηρήσεις του συνέβαλαν σημαντικά στην ολοκλήρωσή της. Ιδιαίτερα, τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας, η οποία μετρά αρκετά χρόνια καθώς μαζί έχουμε διεκπεραιώσει και την πτυχιακή και την μεταπτυχιακή μου εργασία.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Γεωργία Μελαγράκη για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθειά της, καθώς και για τις εύστοχες επιστημονικές προτάσεις της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της της διδακτορικής μου διατριβής. Χωρίς τη συμβολή της η διδακτορική διατριβή δεν θα είχε το ίδιο αποτέλεσμα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τζάκο Ανδρέα για τη βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που αποδέχτηκαν την πρόταση να αποτελέσουν μέλη της.

Πιο συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Τζέλη Δήμητρα για την πολύτιμη βοήθειά της στα επιστημονικά ερωτήματα που κατά καιρούς ερχόμουν αντιμέτωπη. Είναι πάντα διαθέσιμη να βοηθήσει.

Ευχαριστώ την Επίκουρη Καθηγήτρια κα Ευθυμιάδου Ελένη, η οποία από την πρώτη στιγμή της συνεργασίας μας μου έδειξε εμπιστοσύνη και πάντα με καλή διάθεση ήταν παρούσα να βοηθήσει.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Διευθυντή Ερευνών ΘΕΑΠΟΡ του Δημόκριτου Δρ. Νεοφύτου Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη και την ομαλή συνεργασία που είχαμε.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Κολοκούρη Αντώνιο, χάρη στον οποίο οφείλεται η πρώτη μου επαφή με τους RNA ιούς, καθώς το θέμα της μεταπτυχιακής μου εργασίας σχετιζόταν με ερευνητική δραστηριότητα, η οποία διεξάγεται στο εργαστήριο του.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω την εταιρεία NovaMechanics Ltd, και πιο συγκεκριμένα τους συνεργάτες Δρ. Ανδρέα Αφαντίτη και την υποψήφια διδάκτωρ Μαρία Αντωνίου για τα πειράματα αναζήτησης ενώσεων με βάση τη δομή και τη ζεστή φιλοξενία. Θερμά ευχαριστώ τον Ερευνητή Δρ. Παπαβασιλείου Δ. Κωσταντίνο για την καθοδήγηση,

τις πολύτιμες συμβουλές και προτάσεις του σε όλα τα θέματα που αφορούσαν τη Μοριακή Δυναμική.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Δρ. Λεώνη Γεώργιο και Δρ. Ανδρεαδέλη Ιωάννη για την πολύτιμη βοήθειά τους στην εκμάθηση των προγραμμάτων Μοριακής Δυναμικής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στις φίλες μου και υποψήφιες διδάκτορες Νικολέττα Ζουπάνου και Ελένη Χοντζοπούλου για τη συνεργασία τόσων χρόνων, τη συμπαράσταση, τη βοήθεια, και τις καρποφόρες επιστημονικές μας συζητήσεις. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους/στις υποψήφιους διδάκτορες και στους/στις μεταπτυχιακούς φοιτητές του Εργαστηρίου μας για το ευχάριστο κλίμα, το οποίο έκανε ξεχωριστά τα χρόνια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τους γονείς μου, Κωνσταντίνο και Βασιλική, για τα εφόδια που μου προσέφεραν. Θερμά ευχαριστώ την αδερφή μου και τον γαμπρό μου, Δήμητρα και Δημήτρη για την αγάπη, τη βοήθεια, τη συμπαράσταση και την κατανόηση που απλόχερα μου προσφέρουν τόσα χρόνια. Τέλος, ευχαριστώ όλους μου τους φίλους που είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>10</b>
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>21</b>
<b>Κεφάλαιο 1</b> .....	<b>23</b>
<b>Ο ιός SARS-CoV-2</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1 Ιστορική Αναδρομή στις πανδημίες γρίπης του 20<sup>ου</sup> αιώνα μέχρι και σήμερα</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2 Η πανδημία COVID-19</b> .....	<b>26</b>
<b>1.3 Η δομή του ιού SARS-COV-2</b> .....	<b>28</b>
<b>1.3.1 Το γονιδίωμα ssRNA (+)</b> .....	<b>30</b>
1.3.2 Νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη .....	31
1.3.3 Η Πρωτεΐνη Ακίδα.....	32
1.3.4 Η Πρωτεΐνη Φάκελος.....	33
1.3.5 Η Μεμβρανική Πρωτεΐνη .....	34
1.3.6 Η Λιπιδική Διπλοστοιβάδα .....	35
1.3.7 Η RNA πολυμεράση .....	36
1.3.8 Η Κύρια Πρωτεάση .....	37
<b>1.4 Τα συμπτώματα της COVID-19</b> .....	<b>38</b>
<b>1.5 Η θεραπεία της COVID-19</b> .....	<b>40</b>
<b>1.6 Η πρόληψη της COVID-19</b> .....	<b>41</b>
<b>Κεφάλαιο 2</b> .....	<b>44</b>
<b>Η Κύρια Πρωτεάση και η Πρωτεΐνη Ακίδα του ιού SARS-CoV-2</b> .....	<b>44</b>
<b>2.1 Εισαγωγή</b> .....	<b>44</b>
<b>2.2 Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού SARS-CoV-2</b> .....	<b>44</b>
<b>2.3 Η Κύρια Πρωτεάση</b> .....	<b>45</b>
2.3.2 Η δομή της Κύριας Πρωτεάσης .....	46
2.3.1 Η λειτουργία της Κύριας Πρωτεάσης .....	48
2.3.3 Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή της Κύριας Πρωτεάσης.....	50
<b>2.4 Η Πρωτεΐνη Ακίδα</b> .....	<b>55</b>
2.4.1 Η δομή της Πρωτεΐνης Ακίδας.....	56
2.4.2 Η λειτουργία της Πρωτεΐνης Ακίδας.....	60

2.4.3 Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή Πρωτεΐνης Ακίδας .....	64
<b>Κεφάλαιο 3 .....</b>	<b>70</b>
<b><i>O in silico</i> σχεδιασμός φαρμάκων .....</b>	<b>70</b>
<b>3.1 Ο σχεδιασμός φαρμάκων .....</b>	<b>70</b>
3.1.1 Μέθοδοι σχεδιασμού φαρμάκων .....	72
<b>3.2 Ο <i>in silico</i> σχεδιασμός φαρμάκων .....</b>	<b>74</b>
3.2.1 Εφαρμογές του <i>in silico</i> σχεδιασμού φαρμάκων .....	75
<b>3.3 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας .....</b>	<b>77</b>
3.3.1 Κατηγορίες Αλγορίθμων Ελαχιστοποίησης Ενέργειας .....	79
3.3.2 Πεδία Δυνάμεων .....	80
<b>3.4 Διαμορφωτική Ανάλυση .....</b>	<b>84</b>
<b>3.5 Μοριακή Πρόσδεση.....</b>	<b>86</b>
3.5.1 Ο αλγόριθμος Μοριακής Πρόσδεσης GLIDE .....	89
3.5.2 Ο αλγόριθμος της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης (IFD) .....	94
<b>3.6 Μοριακή Δυναμική.....</b>	<b>97</b>
3.6.1 Βασικά σημεία της θεωρίας της Μοριακής Δυναμικής .....	98
3.6.2 Διάφορα λογισμικά προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμική .....	101
3.6.3 Το λογισμικό προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής Desmond .....	102
3.6.4 Η μέθοδος Prime MM-GBSA .....	105
<b>Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής .....</b>	<b>108</b>
<b>Κεφάλαιο 4 .....</b>	<b>109</b>
<b><i>In silico</i> μελέτες φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών κατά της Κύριας Πρωτεΐνης και της Πρωτεΐνης Ακίδας του ιού SARS-CoV-2 .....</b>	<b>109</b>
<b>4.1 Εισαγωγή .....</b>	<b>109</b>
<b>4.2 Επιλογή και προετοιμασία των αναστολέων .....</b>	<b>112</b>
4.2.1 Τα φυσικά προϊόντα .....	112
4.2.2 Τα αντιυπερτασικά .....	117
4.2.3 Προετοιμασία των φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών .....	118
<b>4.3 Προετοιμασία των κρυσταλλογραφικών δομών της Mpro και της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2 .....</b>	<b>119</b>
<b>4.4 Πειράματα Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης .....</b>	<b>119</b>
4.4.1 Αποτελέσματα πειραμάτων Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης στην Mpro του ιού SARS-CoV-2 .....	121

4.4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης στην πρωτεΐνη S του ιού SARS-CoV-2 .....	125
<b>4.5 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής.....</b>	<b>129</b>
<b>4.6 Υπολογισμοί MM-GBSA .....</b>	<b>132</b>
<b>4.7 Αποτελέσματα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής .....</b>	<b>133</b>
4.7.1 Ανάλυση Μοριακής Δυναμικής συμπλεγμάτων «Mpro – φυσικών προϊόντων» .....	135
4.7.2 Ανάλυση Μοριακής Δυναμικής συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης S – φυσικών προϊόντων» .....	140
<b>4.8. Αναζήτηση ενώσεων με βάση τη δομική ομοιότητα .....</b>	<b>155</b>
4.8.1 Αποτελέσματα αναζήτησης ενώσεων με βάση τη δομή.....	156
<b>ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>160</b>
<b>Παράρτημα I.....</b>	<b>163</b>
<b>Παράρτημα II.....</b>	<b>174</b>
<b>Παράρτημα III.....</b>	<b>176</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....</b>	<b>179</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....</b>	<b>182</b>
<b>Αναφορές.....</b>	<b>184</b>



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Ιστορική αναδρομή στις πανδημίες γρίπης από το 1889 έως σήμερα.....	26
Σχήμα 2: Το γονιδίωμα του ιού SARS-CoV-2 περιλαμβάνει τα Ανοιχτά Πλαίσια Ανάγνωσης, ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-ORF6-ORF7 (7a και 7b)-ORF8-ORF9b-N κατά σειρά. Δεκαέξι μη δομικές πρωτεΐνες (nsp1-11 και nsp12-16) που κωδικοποιούνται από τα ORF1a και ORF1b αντίστοιχα, και έξι βοηθητικές πρωτεΐνες που οριοθετήθηκαν. Η πρωτεάση παπαΐνης (Plpro), η Κύρια πρωτεάση (Mpro), καθώς και οι τέσσερις δομικές πρωτεΐνες του ιού (ακίδα (S), φάκελος (E), μεμβράνη (M) και νουκλεοκαψιδική (N) [21].....	30
Σχήμα 3: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου αναπαραγωγής του ιού SARS-CoV-2 .....	45
Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση των δύο πολυπρωτεϊνών pp1a και pp1ab του ιού SARS-CoV-2. Αυτές οι πολυπρωτεΐνες διασπώνται από μία ή δύο πρωτεάσες, την PLpro και την Mpro. Στο σχήμα με ιώδες τριγωνικό σύμβολο υποδεικνύονται οι θέσεις διάσπασης της PLpro και με σκούρο λιλά αυτές της Mpro αντίστοιχα.....	49
Σχήμα 5: Διαδικασία ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκου.....	71
Σχήμα 6: Η πορεία του Ορθολογικού Σχεδιασμού Φαρμακευτικών μορίων.....	75
Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας ελαχιστοποίησης ενέργειας για ένα σύστημα N ατόμων που περιγράφεται από 3N συντεταγμένες. Κάθε σημείο της επιφάνειας αντιπροσωπεύει μια διαμόρφωση του μορίου, με συγκεκριμένη δυναμική ενέργεια. Υποδεικνύονται η διαμόρφωση υψηλής ενέργειας, το τοπικό και ολικό ελάχιστο.....	78
Σχήμα 8: Στάδια μελέτης μορίων που λαμβάνουν μέρος στη Μοριακή Πρόσδεση.....	89
Σχήμα 9: Προσδιορισμός περιοχών πυρήνα (core region) και διαμορφωμερών (rotamer groups).....	91
Σχήμα 10: Τα φίλτρα αξιολόγησης που εφαρμόζονται με τη χρήση του αλγορίθμου Glide.....	92
Σχήμα 11: Τα βασικά βήματα μιας προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής.....	105
Σχήμα 12: Ο θερμοδυναμικός κύκλος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συνολικής ελεύθερης ενέργειας δέσμευσης του συστήματος λαμβάνοντας υπόψη τον διαλύτη.....	106

Σχήμα 13: Η υπολογιστική ροή εργασίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τον εντοπισμό νέων ενώσεων για τη θεραπεία της COVID-19. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μελέτες IFD για να αξιολογηθεί η δεσμευτική ικανότητα των μελετώμενων μορίων με τις πρωτεΐνες Mpro και S του ιού SARS-CoV-2. Ακολούθως, μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής μελετήθηκαν ενδελεχώς οι αλληλεπιδράσεις του συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης – προσδέτη» που εμφάνισαν την ευνοϊκότερη πρόσδεση σύμφωνα με τα αποτελέσματα του IFD. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί MM-GBSA για τη σαφέστερη αξιολόγηση της δεσμευτικής τους ικανότητας. Τέλος, μέσω προγράμματος Enalios διενεργήθηκε αναζήτηση δομικής ομοιότητας, έχοντας ως βάση τα τρία φυσικά προϊόντα που εμφάνισαν ισχυρή πρόσδεση με τις πρωτεΐνες Mpro και S του ιού SARS-CoV-2, όπου παρήχθησαν 115 ενώσεις. Τέλος, αυτές οι ενώσεις μελετήθηκαν με πειράματα IFD.....111

Σχήμα 14: Η σχηματική αναπαράσταση της υπόθεσης που βασιστήκαμε για τη μελέτη των σαρτανών ως πιθανά αντιικά φάρμακα κατά του ιού SARS-CoV-2.....118

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1: Τα βασικά δομικά συστατικά του ιού SARS-CoV-2..... 29
- Εικόνα 2: Η τριδιάστατη δομή της Πρωτεΐνης Φακέλου (pdb id: 7K3G) [30].....33
- Εικόνα 3: Το RNA, η λιπιδική διπλοστοιβάδα και οι τέσσερις δομικές πρωτεΐνες (Ακίδα, Φάκελος, Μεμβρανική και Νουκλεοπρωτεΐνη) του ιού SARS-CoV-2.....34
- Εικόνα 4: Η δομή του κάθε μονομερούς της Mpro του ιού SARS-CoV-2 εμφανίζει διακριτούς τομείς. Ο τομέας I (αμινοξέα 8–101) απεικονίζεται με πράσινο, ο τομέας II (αμινοξέα 102–184) απεικονίζεται με φούξια και ο τομέας III (αμινοξέα 201–303) απεικονίζεται με γαλάζιο. Η καταλυτική δυάδα της Mpro (His14 και Cys145) αναπαρίστανται σε μορφή ραβδιού, που υποδεικνύεται με τον γκρι κύκλο.....47
- Εικόνα 5: Η διμερής δομή της Mpro. Αριστερά: απεικονίζονται οι τομείς I, II και III, καθώς και το ενεργό κέντρο. Δεξιά: απεικονίζονται οι δυο αλλοστερικές περιοχές [78].....48
- Εικόνα 6: Αριστερά: Οι χημικές δομές των αναστολέων α-κετοαμιδίου 11r, 13a, 13b και 14b, οι έγχρωμοι κύκλοι επισημαίνουν τις δομικές τροποποιήσεις από το ένα βήμα ανάπτυξης στο επόμενο. Δεξιά: Η ένωση 13b στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος, το οποίο εντοπίζεται μεταξύ των τομέων I και II της Mpro. Στον αναστολέα 13b, τα άτομα άνθρακα απεικονίζονται με μωβ απόχρωση, εκτός από εκείνα εντός του δακτυλίου πυριδόνης, τα οποία αναπαρίστανται με μαύρο χρώμα. Τα άτομα οξυγόνου έχουν κόκκινο χρώμα, τα άτομα αζώτου μπλε και τα άτομα θείου κίτρινο. Με ανοιχτό πράσινο συμβολίζονται τα S1, S2, S3 και S4, που δηλώνουν τους κανονικούς θύλακες δέσμευσης που αντιστοιχούν στα τμήματα P1, P2, P3 και P4 (που εμφανίζονται με ανοιχτά μπλε σύμβολα) του πεπτιδομιμητικού αναστολέα. Οι δεσμοί υδρογόνου αντιπροσωπεύονται οπτικά με διακεκομμένες κόκκινες γραμμές.....51
- Εικόνα 7: Α. Απεικονίζεται η επιφάνεια της ομοδιμερούς Mpro, με το μονομερές A να παριστάνεται με μπλε και το μονομερές B με κόκκινο. Η δομή του αναστολέα N3 απεικονίζεται με πράσινο χρώμα. Β. Μια πιο προσεκτική εξέταση του θύλακα που δεσμεύει το υπόστρωμα αποκαλύπτει σημαντικά αμινοξέα του θύλακα σύνδεσης, οι δύο κόκκινες σφαίρες υποδηλώνουν δυο μόρια ύδατος (W1 και W2). Υποδεικνύονται οι θέσεις των περιοχών P1, P1', P2, P3, P4 και P5 του N3. Η πρόσδεση του αναστολέα ενισχύεται από δεσμούς υδρογόνου, που απεικονίζονται με μαύρες διακεκομμένες γραμμές. Γ. Ο ομοιοπολικός δεσμός C–S [47].....53

Εικόνα 8: Α. Η σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης Ακίδα. Β. Η πρωτεΐνη Ακίδα συνδέεται με το ACE2 ώστε να εισέλθει ο ιός SARS-CoV-2 στο κύτταρο του ξενιστή.....	57
Εικόνα 9: Η πρωτεΐνη S διασπάται σε δύο θέσεις, S1/S2 και S2', ώστε να πυροδοτηθεί η σύντηξη ιικών και κυτταρικών μεμβρανών κατά την είσοδο του ιού για την απελευθέρωση του γονιδιώματός του στο κύτταρο ξενιστή. Η διάσπαση της πρωτεΐνης S πιστεύεται ότι συμβαίνει διαδοχικά, με τη διάσπαση στη θέση S1/S2 να εμφανίζεται πρώτη και την ακολουθεί η διάσπαση στη θέση S2'. Η φουρίνη ευθύνεται για τη διάσπαση στη θέση S1/S2, ενώ η TMPRSS2 για τη διάσπαση στη θέση S2'.....	63
Εικόνα 10: Τα μονοκλωνικά αντισώματα Casirivimab (πετρόλ χρώμα) και Imdevimab (πορτοκαλί χρώμα) προσδεδεμένα στην πρωτεΐνη ακίδα του ιού SARS-CoV-2. Το Casirivimab προσδέεται στην RBD της πρωτεΐνης ακίδα, ενώ το Imdevimab, σε μια παράπλευρη περιοχή της RBD.....	65
Εικόνα 11: Η προσδεμένη διαμόρφωση του TS984 με την πρωτεΐνη ακίδα, η οποία αλληλεπιδρά με το ACE2. Επίσης, απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται με τα σημαντικότερα αμινοξέα εντός 5 Å από την περιοχή πρόσδεσης. Η διακεκομμένη κόκκινη γραμμή αναπαριστά τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του προσδέτη και της πρωτεΐνης S [140].....	67
Εικόνα 12: Η πρόσδεση πεπτιδικού αναστολέα (κόκκινο χρώμα) με βάση το ACE2 (γκρι χρώμα) στην RBD περιοχή της πρωτεΐνης S (μπλε χρώμα) του ιού SARS-CoV-2 [143].....	68
Εικόνα 13: Η μοντελοποίηση της Δυναμικής Ενέργειας στη Μοριακή Δυναμική.....	100
Εικόνα 14: Οι 2D δομές των φυσικών προϊόντων της παρούσας μελέτης.....	112
Εικόνα 15: Οι 2D δομές των σαρτανών που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	117
Εικόνα 16: Η τριδιάστατη (3D) δομή της Mpro (PDB id: 6LU7), με διακεκομμένο κύκλο προσδιορίζονται τα αμινοξέα που απαρτίζουν την περιοχή πρόσδεσης για τα πειράματα IFD.....	122
Εικόνα 17: Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύχθηκαν από τα πειράματα IFD για τα τρία φυσικά προϊόντα που εμφάνισαν τις ευνοϊκότερες προσδέσεις με τη Mpro.....	124
Εικόνα 18: Η τριδιάστατη (3D) δομή της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2 (PDB id 6M0J), με διακεκομμένο κύκλο προσδιορίζονται τα αμινοξέα που απαρτίζουν τις εκάστοτε περιοχές πρόσδεσης για τα πειράματα IFD.....	125

Εικόνα 19: Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύχθηκαν από τα πειράματα IFD για τα τρία φυσικά προϊόντα που εμφάνισαν τις ευνοϊκότερες προσδέσεις με την πρωτεΐνη S για καθεμία από τις τρεις μελετώμενες περιοχές πρόσδεσης.....	129
Εικόνα 20: Το διάγραμμα RMSD της από-πρωτεΐνης Mpro, τα σύμπλοκα «Mpro-φυσικά προϊόντα» και το RMSF είναι ευθυγραμμισμένα με τα άτομα Ca της πρωτεΐνης. Το RMSD των προσδετών (ροσμαρινικό οξύ, κουρκουμίνη και κερκετίνη) ευθυγραμμίζεται με τις αρχικές τους συντεταγμένες του προσδέτη. Τα σκιασμένα πράσινα, ροζ και γαλάζια χρώματα υποδεικνύουν τις πρωτεϊνικές περιοχές I, II και III, αντίστοιχα, ενώ οι κίτρινες γραμμές ορίζουν τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης.....	137
Εικόνα 21: Η ανάλυση αλληλεπιδράσεων για τα συμπλέγματα «Mpro – προσδέτη» κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. (α) Οι αλληλεπιδράσεις «Mpro – προσδέτη» κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους: Δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα), υδρόφοβες (μωβ χρώμα), ιοντικές (ματζέντα χρώμα) και γέφυρες ύδατος(μπλε χρώμα). (β) Το 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων των προσδετών με τα αμινοξέα της Mpro. Εικονογραφούνται μόνο οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται περισσότερο από το 15,0% του χρόνου προσομοίωσης που αναλύθηκε.....	138
Εικόνα 22: Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης της αρχικής (πράσινο χρώμα) και επικρατέστερης διαμόρφωσης (μπλε χρώμα) των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής των δυο φυσικών προϊόντων, του ροσμαρινικού οξέος και της κουρκουμίνης, τα οποία εμφάνισαν τιμή RMSD μεγαλύτερη των 2 Å.....	139
Εικόνα 23: Το διάγραμμα RMSD της από-πρωτεΐνης ακίδας, τα σύμπλοκα «πρωτεΐνη S-φυσικά προϊόντα» και το RMSF είναι ευθυγραμμισμένα με τα άτομα Ca της πρωτεΐνης. Το RMSD των προσδετών (ροσμαρινικό οξύ και σαλβιανολικό οξύ β) ευθυγραμμίζεται με τις αρχικές τους συντεταγμένες του προσδέτη. Οι κίτρινες γραμμές ορίζουν τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης.....	143
Εικόνα 24: (α) Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων για τα συμπλέγματα «πρωτεΐνης S – προσδέτη» για την πρώτη περιοχή πρόσδεσης κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης S-προσδέτη κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους: Δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα), υδρόφοβοι (μωβ χρώμα), ιοντικοί (ματζέντα χρώμα) και γέφυρες νερού (μπλε χρώμα). (β) Το 2D διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων του προσδέτη με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης S. Απεικονίζονται μόνο οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν περισσότερο από το 15,0% του χρόνου προσομοίωσης.....	144

Εικόνα 25: Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης της αρχικής (πράσινο χρώμα) και επικρατέστερης διαμόρφωσης (μπλε χρώμα) των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής των δυο φυσικών προϊόντων, του σαλβιανολικού οξέος β και του ροσμαρινικού, τα οποία εμφάνισαν τιμή RMSD μεγαλύτερη των 2 Å.....146

Εικόνα 26: Το διάγραμμα RMSD της από-πρωτεΐνης ακίδας, των συμπλόκων «ACE2-φυσικών προϊόντων» και το RMSF είναι ευθυγραμμισμένα με τα άτομα Ca της πρωτεΐνης. Το RMSD των προσδετών (ροσμαρινικό οξύ, σαλβιανολικό οξύ β και η κερκεΐνη) ευθυγραμμίζεται με τις αρχικές τους συντεταγμένες του προσδέτη. Οι κίτρινες γραμμές ορίζουν τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης.....147

Εικόνα 27: (α) Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων για τα συμπλέγματα «ACE2 – προσδέτη» για τη δεύτερη περιοχή πρόσδεσης κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – προσδέτη κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους: Δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα), υδρόφοβοι (μωβ χρώμα), ιοντικοί (ματζέντα χρώμα) και γέφυρες νερού (μπλε χρώμα). (β) Το 2D διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων του προσδέτη με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2. Απεικονίζονται μόνο οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν περισσότερο από το 15,0% του χρόνου προσομοίωσης.....149

Εικόνα 28: Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης της αρχικής (πράσινο χρώμα) και επικρατέστερης διαμόρφωσης (μπλε χρώμα) των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής του σαλβιανολικού οξέος β, το οποίο εμφάνισε τιμή RMSD μεγαλύτερη των 2 Å.....150

Εικόνα 29: Το διάγραμμα RMSD της από-πρωτεΐνης ακίδας, των συμπλόκων «πρωτεΐνης S-φυσικών προϊόντων» και το RMSF είναι ευθυγραμμισμένα με τα άτομα Ca της πρωτεΐνης. Το RMSD των προσδετών (ροσμαρινικό οξύ και σαλβιανολικό οξύ β) ευθυγραμμίζεται με τις αρχικές τους συντεταγμένες του προσδέτη. Οι κίτρινες γραμμές ορίζουν τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης.....152

Εικόνα 30: (α) Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων για τα συμπλέγματα «πρωτεΐνη S – προσδέτη» για την τρίτη περιοχή πρόσδεσης κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – προσδέτη κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους: Δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα), υδρόφοβοι (μωβ χρώμα), ιοντικοί (ματζέντα χρώμα) και γέφυρες νερού (μπλε χρώμα). (β) Το 2D διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων του προσδέτη με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2. Απεικονίζονται μόνο οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν περισσότερο από το 15,0% του χρόνου προσομοίωσης.....154

Εικόνα 31: Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης της αρχικής (πράσινο χρώμα) και επικρατέστερης διαμόρφωσης (μπλε χρώμα) των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής των δυο φυσικών προϊόντων, του σαλβιανολικού οξέος β και του ροσμαρινικού, τα οποία εμφάνισαν τιμή RMSD μεγαλύτερη των 2 Å.....155

Εικόνα 32: Οι 2D δομές των δύο αναστολέων πολλαπλών στόχων για το SARS-CoV-2 και τα εναντιομερή τους.....157

Εικόνα 32: Οπτικοποίηση των τριδιάστατων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων εντός των συμπλεγμάτων πρωτεΐνης Mpro/S - 131676018 και πρωτεΐνης Mpro/S -125990, που προέκυψαν από τα πειράματα IFD για κάθε περιοχή πρόσδεσης. Οι δεσμοί υδρογόνου αντιπροσωπεύονται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές, ενώ οι αλληλεπιδράσεις π - κατιόντων απεικονίζονται με πράσινο χρώμα.....159

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Οι συγγένειες δέσμησης που προέκυψαν από τα πειράματα IFD των φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών στην Mpro του ιού SARS-CoV-2.....	121
Πίνακας 2: Τα αποτελέσματα του IFD για τις τρεις διακριτές περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2 του ιού SARS-CoV-2 (PDB id: 6M0J). Οι συγγένειες δέσμησης εκφράζονται σε μονάδες kcal mol <sup>-1</sup> .....	126
Πίνακας 3: Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας ΔG των μελετώμενων συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης – φυσικού προϊόντος».....	132
Πίνακας 4: Οι υπολογισμένες συγγένειες δέσμησης (σε kcal mol <sup>-1</sup> ) μέσω πειραμάτων IFD των επιλεγμένων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν από αναζήτηση ομοιότητας στις περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης Mpro και S.....	158



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα, τα *in silico* πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μοριακής Μοντελοποίησης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακου.

Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας.



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση  
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Στο σημείο αυτό, κρίνεται απαραίτητο να αναφερθεί ότι το στάδιο της αναζήτησης ομοιότητας που εφαρμόζεται στη ροή εργασίας, η οποία αναλύεται στο Κεφάλαιο 4 του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε από μέσω του Enalos Suite της εταιρείας NovaMechanics Ltd.

Στη διδακτορική διατριβή ακολουθείται η εξής δομή: Στο πρώτο μέρος της, το οποίο περιλαμβάνει τα τρία πρώτα κεφάλαια, εισάγεται το θεωρητικό υπόβαθρο προς κατανόηση των *in silico* αποτελεσμάτων που ακολουθούν. Ειδικότερα, στο Κεφάλαιο 1 πραγματοποιείται μία βιβλιογραφική ανασκόπηση της COVID-19 και των προσπαθειών αντιμετώπισής της μέχρι σήμερα. Στο Κεφάλαιο 2, επικεντρώνεται στις δυο βασικές πρωτεΐνες του ιού SARS-CoV-2 Κύρια Πρωτεάση και Πρωτεΐνης Ακίδας που ευθύνονται για την αναπαραγωγή και την είσοδό του στα κύτταρα ξενιστές. Στο Κεφάλαιο 3, πραγματοποιείται εκτενής παρουσίαση των μεθόδων μοντελοποίησης που εφαρμόζονται στα πειράματα Μοριακής Μοντελοποίησης και Μοριακής Δυναμικής της παρούσας διατριβής.

Το επόμενο κεφάλαιο αποτελεί το πειραματικό μέρος της διδακτορικής διατριβής. Στην αρχή του συγκεκριμένου κεφαλαίου περιγράφεται η ροή εργασίας πολλαπλών βημάτων της μελέτης, στην οποία συνδυάζονται η Επαγόμενη Μοριακή Πρόσδεση. Η Μοριακή Δυναμική και η αναζήτηση δομών ομοιότητας. Επίσης, αναλύονται τα φυσικά προϊόντα και τα αντιυπερτασικά, τα οποία αποτέλεσαν τους υποψήφιους αναστολείς κατά των προαναφερθέντων πρωτεϊνών του ιού SARS-CoV2. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας

οδήγησαν στην πρόταση δύο αναλόγων του σαλβιανολικού οξέος ως πολλαπλός αναστολέας, της Κύριας Πρωτεάσης κα της Πρωτεΐνης Ακίδας του ιού SARS-CoV-2.

## Κεφάλαιο 1

### Ο ιός SARS-CoV-2

#### 1.1 Ιστορική Αναδρομή στις πανδημίες γρίπης του 20<sup>ου</sup> αιώνα μέχρι και σήμερα

Οι πανδημίες γρίπης είναι σπάνια και σημαντικά παγκόσμια γεγονότα υγείας, τα οποία χαρακτηρίζονται από το εκτεταμένο ξέσπασμα μιας μεταδοτικής νόσου που επηρεάζει υψηλό ποσοστό παγκόσμιου πληθυσμού σε διαφορετικές περιοχές. Για να χαρακτηριστεί μια επιδημία ως πανδημία πρέπει να πληρούνται δύο προϋποθέσεις. Πρώτον, το κύμα γρίπης πρέπει να ξεκινά από μια συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή και να εξαπλώνεται σε όλο τον κόσμο προσβάλλοντας υψηλό ποσοστό του πληθυσμού και αυξάνοντας τον δείκτη θνησιμότητας. Δεύτερον, η νόσος πρέπει να έχει προκληθεί από έναν καινούριο ιό ή καινούριο στέλεχος αυτού, το οποίο δεν έχει εμφανιστεί μέχρι στιγμής [1]. Η γρίπη είναι μια μεταδοτική ιογενής ασθένεια του αναπνευστικού συστήματος, προκαλούμενη από τους ιούς της γρίπης. Επηρεάζει κυρίως τη μύτη, τον λαιμό και κάποιες φορές τους πνεύμονες. Ενδέχεται να κυμαίνεται από ήπια έως σοβαρή, οδηγώντας σε επιπλοκές, ιδιαίτερα σε ευπαθείς ομάδες όπως είναι οι ηλικιωμένοι, τα νήπια καθώς και άτομα με υποκείμενες ιατρικές παθήσεις. Ο όρος «γρίπη» προέρχεται από το γαλλικό ρήμα «grippe» που σημαίνει αδράχνω (αρπάζω, πιάνω βίαια) για να περιγράψει την αιφνίδια έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου [2]. Ο διεθνής όρος *influenza* προέρχεται από το λατινικό «*influentia*» (επιρροή), που χρησιμοποιήθηκε για να αποδώσει την επιρροή των άστρων στην εξέλιξη των λοιμωδών νοσημάτων, στο τότε πλαίσιο της επικρατούσας αστρολογικής ιατρικής. Επίσης, στ' αγγλικά χρησιμοποιείται ο όρος flu [3].

Το 1889 – 1890 εμφανίζεται η Πανδημία «Ασιατικής γρίπης» ή «Ρωσική γρίπης», η οποία οφείλεται σε ιό της γρίπης A (*influenza A*). Η νόσος εικάζεται ότι ξεκίνησε από την Κεντρική Ασία ή τη Ρωσική αυτοκρατορία και γρήγορα

εξαπλώθηκε σε άλλα μέρη του κόσμου, συμπεριλαμβανομένης της Ευρώπης, της Βόρειας Αμερικής και της Αφρικής [4].

Στις αρχές του 20ου αιώνα και λίγο μετά το τέλος του Α' Παγκοσμίου Πολέμου, εμφανίζεται μια εξαιρετικά λοιμογόνος πανδημία γρίπης που πλήττει το 50% του πληθυσμού παγκοσμίως. Από τα δεδομένα της εποχής προκύπτει ότι, το 25% του παγκόσμιου πληθυσμού εμφάνισε κλινική νόσο ενώ η θνησιμότητα υπολογίζεται σε περισσότερο από 50 εκατομμύρια με νεαρά άτομα ηλικίας 20-40 ετών να πλήττονται περισσότερο. Αυτό το μοτίβο νοσηρότητας ήταν ασυνήθιστο για τη γρίπη, η οποία συνήθως ευθύνεται για τον θάνατο ηλικιωμένων και μικρών παιδιών [2]. Η νόσος εικάζεται ότι ξεκίνησε από την Άπω Ανατολή και οφείλεται σε ιό της γρίπης *A Influenza A / H1N1*, ωστόσο τα πρώτα κρούσματα εμφανίστηκαν τον Απρίλιο του 1918 στον βρετανικό στρατό που βρισκόταν στα βόρεια της Γαλλίας και από εκεί εξαπλώθηκε στα συμμαχικά στρατεύματα στην Ευρώπη και στις ΗΠΑ. Οι ανθυγιεινές συνθήκες υγιεινής που επικρατούσαν στα χαρακώματα, καθώς και ο μαζικός επαναπατρισμός των στρατευμάτων συνέβαλαν στη γρήγορη διάδοσή της. Επιδημικές εστίες εμφανίστηκαν στην Ινδία, στη Νέα Ζηλανδία και στη Νότια Αφρική, την περίοδο που η νόσος φαινόταν να υποχωρεί από την Ευρώπη. Επιπρόσθετα, επικρατούσε αυστηρή λογοκρισία στον έντυπο Τύπο των εμπλεκόμενων κρατών στον πόλεμο, σε μια προσπάθεια να κρατήσουν υψηλό το ηθικό του στρατεύματος και ως εκ τούτου οι πρώτες αναφορές για τη γρίπη πραγματοποιούνται από τις εφημερίδες της ουδέτερης Ισπανίας. Έκτοτε, η συγκεκριμένη πανδημία γρίπης φέρει την ονομασία «Ισπανική Γρίπη». Έπειτα, ένα δεύτερο κύμα εμφανίζεται το φθινόπωρο του 1918 και εξαπλώνεται σε ολόκληρο τον κόσμο εκτός από την Αυστραλία, η οποία θα πληγεί ένα χρόνο μετά. Τα ποσοστά θνησιμότητας είναι εξίσου σημαντικά με αυτά του πρώτου κύματος [5]. Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύματος της επιδημίας καταρρίπτεται η υπόθεση του βακίλου της γρίπης ως αιτιολογικού παράγοντα της νόσου και κατοχυρώνεται για πρώτη φορά η ιογενής της προέλευση χάρη στο εξαιρετικό έργο του Richard Edwin Shope (1901-1966). Ωστόσο, θα περάσει λίγο περισσότερο από μια δεκαετία για να αποδειχθεί επιστημονικά. Οι εν λόγω μελέτες διεξήχθησαν από κορυφαίους επιστήμονες της εποχής, χαρακτηριστικά αναφέρονται ο Νομπελίστας Charles Nicolle (1866-1936), ο ακαδημαϊκός René Dujarric de la Rivière (1885-1969) κ.ά. Το 1933 οι

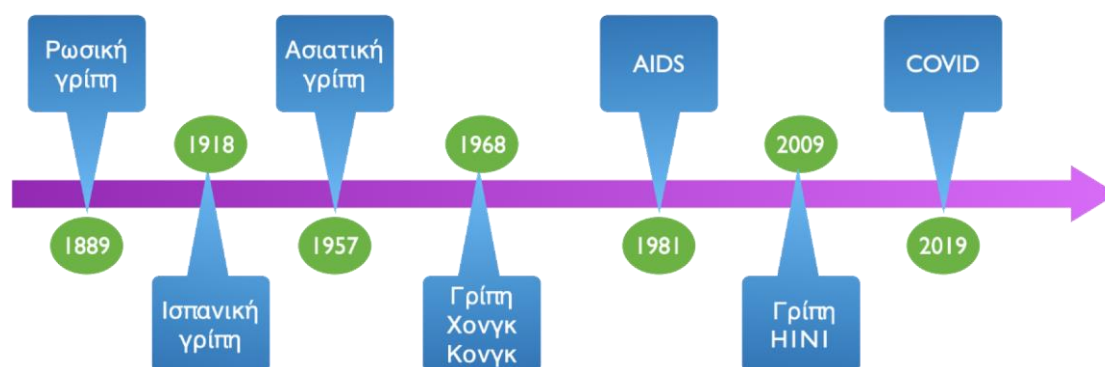
Βρετανοί ιατροί Wilson Smith (1897-1965), Sir Christopher Andrewes (1896-1988) και Sir Patrick Laidlaw (1881-1940) από το Εθνικό Κέντρο Ερευνών του Λονδίνου, σε δημοσίευσή τους στο επιστημονικό περιοδικό The Lancet αναφέρουν ότι κατόρθωσαν για πρώτη φορά να απομονώνουν τον ιό, γεγονός που κέντρισε το ενδιαφέρον της Επιστημονικής Κοινότητας και έδωσε ώθηση για περαιτέρω μελέτη των ιών [6].

Κατά τη διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα ακόμα δυο πανδημίες γρίπης θα πλήξουν την ανθρωπότητα, η Ασιατική γρίπη το 1957 και η γρίπη του Χονγκ Κονγκ το 1968 [7]. Στις αρχές του 1957, μια νέα επιδημία γρίπης ξεκινά από την επαρχία Γκουϊτζόου (Guizhou) της Κίνας, πρόκειται για γρίπη τύπου Α με υπότυπο H2N2 (ο υπότυπος H2N2 αναφέρεται στις πρωτεΐνες της αιμοσυγκολλητίνης (Hemagglutinin, H) και της νευραμινιδάσης (Neuraminidase, N) που βρίσκονται στην επιφάνεια του ιού), η οποία φαίνεται πως προέκυψε από μετάλλαξη του στελέχους του ιού της γρίπης. Η συγκεκριμένη πανδημία είχε διάρκεια περίπου δέκα μήνες και πραγματοποιήθηκε πολύ γρήγορα η εξάπλωσή της σε ολόκληρο τον κόσμο. Προσβλήθηκε το 50% του παγκόσμιου πληθυσμού, κυρίως νέοι και ηλικιωμένοι, και προκάλεσε δυο εκατομμύρια θανάτους. Η εμφάνιση των πρώτων αντιγριπικών εμβολίων και η ύπαρξη αντιβιοτικών φαίνεται πως συνέβαλε σημαντικά στη μείωση της εξάπλωσής της, αλλά και στη θεραπεία της δευτεροπαθούς βακτηριακής πνευμονίας [7]. Το καλοκαίρι του 1968, στο Χονγκ Κονγκ κάνει την εμφάνισή της η «γρίπη του Χονγκ Κονγκ», η οποία προκλήθηκε από τον υπότυπο H3N2 που δημιουργήθηκε από αντιγονική μετατόπιση του υποτύπου της H2N2. Η πανδημία διήρκησε ένα έτος, έπληξε ιδιαίτερα τους ηλικιωμένους, και προκάλεσε τον θάνατο σε περίπου ένα εκατομμύριο ανθρώπους [7].

Μετά από πολλές δεκαετίες, και πιο συγκεκριμένα το 1981 μέχρι και σήμερα, παρατηρείται το ξέσπασμα του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus, HIV), το οποίο οδήγησε στο Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) και την πανδημία HIV/AIDS [8]. Από την αρχή της επιδημίας, πάνω από εβδομήντα πέντε εκατομμύρια άνθρωποι έχουν μολυνθεί και περίπου τριάντα δυο εκατομμύρια έχουν πεθάνει.

Το 2009 κάνει την εμφάνισή της η «γρίπη H1N1», γνωστή και ως «γρίπη των χοίρων», για την οποία ευθύνεται ο νέος ιός της γρίπης Α με υπότυπο H1N1, ο οποίος μέχρι τότε δεν είχε προσβάλει τους ανθρώπους. Με καταγωγή από το Μεξικό, αυτή η πανδημία εξαπλώθηκε σε πολλές χώρες και είχε ως αποτέλεσμα πολλές ασθένειες και θανάτους [9].

Τον Δεκέμβριο του 2019, η πανδημία COVID-19 (Coronavirus disease) εμφανίζεται για πρώτη φορά στην πόλη Γουχάν στην Κίνα όπου αναφέρθηκαν συστάδες κρουσμάτων πνευμονίας άγνωστης αιτίας και τάχιστα ο ιός εξαπλώθηκε παγκοσμίως. Ο ιός αργότερα αναγνωρίστηκε ως νέος κορονοϊός SARS-CoV-2, γενετικά συγγενής με τον ιό SARS. Θεωρείται ότι προήλθε από νυχτερίδες και πιθανώς μεταδόθηκε στους ανθρώπους μέσω ενός ενδιάμεσου ζώου ξενιστή, αν και η ακριβής πηγή εξακολουθεί να διερευνάται [10].



Σχήμα 1. Ιστορική αναδρομή στις πανδημίες γρίπης από το 1889 έως σήμερα.

## 1.2 Η πανδημία COVID-19

Η νόσος του κορονοϊού 2019 (COVID-19) έχει αναδειχθεί ως μία από τις πιο σημαντικές παγκόσμιες κρίσεις υγείας στη σύγχρονη ιστορία. Προκαλούμενη από το σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο κορονοϊού 2 (SARS-CoV-2), αυτή η μολυσματική, ιογενής ασθένεια εντοπίστηκε για πρώτη φορά τον Δεκέμβριο του 2019 στη Γουχάν της Κίνας και έκτοτε εξαπλώθηκε τάχιστα σε σχεδόν κάθε γωνιά του κόσμου με εκατομμύρια επιβεβαιωμένα κρούσματα και θανάτους [10]. Η COVID-19 αποτελεί μια νέα πρόκληση για τη δημόσια υγεία, τις κυβερνήσεις και τις κοινωνίες παγκοσμίως. Οι ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις της, που κυμαίνονται από ήπια συμπτώματα γρίπης έως σοβαρή αναπνευστική

δυσχέρεια, έχουν συμβάλει στην πολυπλοκότητα της διαχείρισης της πανδημίας.

Η προέλευση του SARS-CoV-2 πιστεύεται ότι είναι ζωονοσογόνος, με τον ιό πιθανότατα να προέρχεται από νυχτερίδες και πιθανώς να μεταδίδεται στους ανθρώπους μέσω ενός ενδιάμεσου ζώου ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, με βάση τα ευρήματα γονιδιακών ερευνών και την παρουσία ορισμένων νυχτερίδων και ζώντων ζώων στην αγορά της Γουχάν, ο SARS-CoV-2 εικάζεται ότι μπορεί να προήλθε από νυχτερίδες ή τα περιττώματα αυτών, τα οποία μόλυναν τρόφιμα [11][12]. Η ικανότητά του να μεταδίδεται από άτομο σε άτομο μέσω αναπνευστικών σταγονιδίων, στενής επαφής και επαφής με μολυσμένες επιφάνειες οδήγησε στην ταχεία διάδοσή του.

Η COVID-19 εκδηλώνεται με ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων, με πυρετό, βήχα και δύσπνοια να αποτελούν τα συνηθέστερα συμπτώματα. Άλλα αναφερόμενα συμπτώματα περιλαμβάνουν κόπωση, πόνους στο σώμα, απώλεια γεύσης ή όσφρησης, πονόλαιμο και γαστρεντερικά προβλήματα. Σε σοβαρές περιπτώσεις, η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια, πνευμονία, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (Acute Respiratory Distress Syndrome ARDS), ανεπάρκεια οργάνων και τελικά τον θάνατο. Ορισμένες ομάδες, όπως οι ηλικιωμένοι και τα άτομα με υποκείμενα νοσήματα, διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν σοβαρότερα την ασθένεια. Η πανδημία COVID-19 είχε εκτεταμένες συνέπειες στη δημόσια υγεία, τις οικονομίες και τις κοινωνίες. Έχει καταπονήσει τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης, έχει κατακλύσει τα νοσοκομεία και έχει θέσει σημαντικές προκλήσεις για τους εργαζόμενους στον τομέα της Υγείας στην πρώτη γραμμή. Ως απάντηση στην πανδημία, οι Κυβερνήσεις και οι Υγειονομικές Αρχές παγκοσμίως έχουν εφαρμόσει διάφορα μέτρα για τον έλεγχο της εξάπλωσης του ιού. Αυτά τα μέτρα περιλαμβάνουν εκτεταμένες διαγνωστικές δοκιμές, ιχνηλάτηση επαφών, πρωτόκολλα καραντίνας (lockdown), οδηγίες κοινωνικής απόστασης, ταξιδιωτικούς περιορισμούς, ταχεία ανάπτυξη και διανομή εμβολίων. Φυσικό επακόλουθο ήταν να πληγούν οι οικονομίες καθώς τα προαναφερθέντα μέτρα μείωσαν την καταναλωτική δραστηριότητα, οδηγώντας σε εκτεταμένη ανεργία και οικονομική αστάθεια.

Οι προσπάθειες για την καταπολέμηση της COVID-19 συνεχίζονται μέσω διεθνών συνεργασιών στην επιστημονική έρευνα, την ανάπτυξη εμβολίων και τις καινοτόμες θεραπείες. Εκστρατείες εμβολιασμού βρίσκονται σε εξέλιξη παγκοσμίως για την επίτευξη εκτεταμένης ανοσοποίησης και την επίτευξη «ανοσίας της αγέλης».

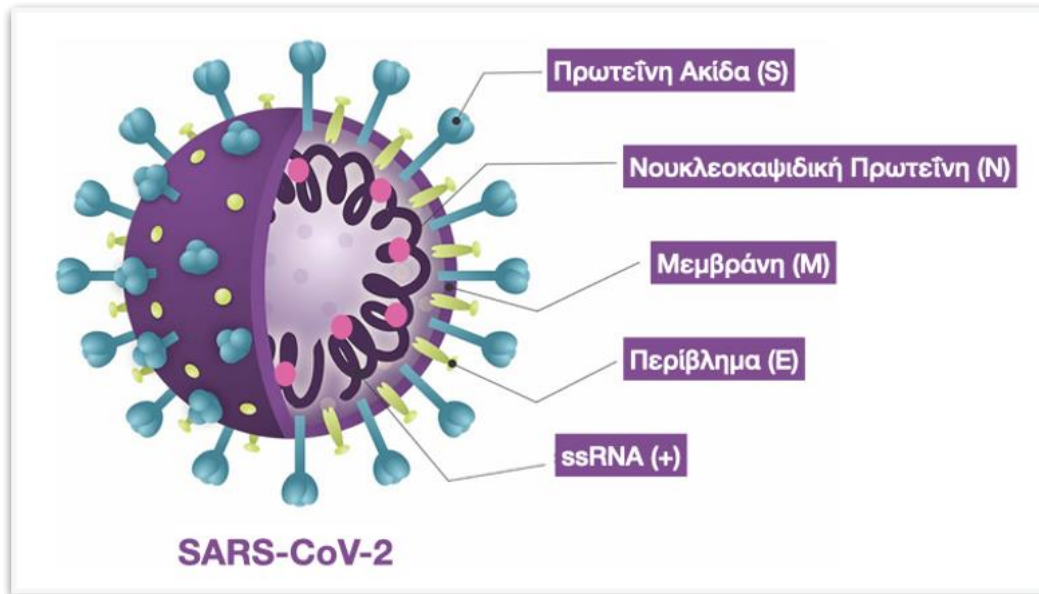
Εν κατακλείδι, η πανδημία COVID-19 εξακολουθεί να είναι μια δυναμική και εξελισσόμενη παγκόσμια κρίση υγείας, με νέες προκλήσεις και ανακαλύψεις να ξεδιπλώνονται τακτικά. Η παγκόσμια ανταπόκριση σε αυτή την άνευ προηγουμένου κατάσταση απαιτεί συνεχή συνεργασία, τεκμηριωμένη λήψη αποφάσεων και πρόσβαση σε πόρους υγειονομικής περίθαλψης. Καθώς οι επιστήμονες, οι επαγγελματίες υγείας και οι κοινότητες συνεργάζονται, η συλλογική προσπάθεια παραμένει επικεντρωμένη στην υπέρβαση αυτής της πανδημίας και στην οικοδόμηση ανθεκτικών συστημάτων υγείας για την προετοιμασία και αντιμετώπιση μελλοντικών προκλήσεων δημόσιας υγείας.

### **1.3 Η δομή του ιού SARS-COV-2**

Βιοπληροφορικές αναλύσεις έδειξαν ότι ο SARS-CoV-2, που ευθύνεται για την COVID-19, είναι ένας θετικά φορτισμένος μονόκλωνος ιός RNA, ο οποίος ανήκει στην υποοικογένεια Coronavirinae της οικογένειας Coronaviridae [13] [14]. Η υποοικογένεια Coronavirinae περιέχει τέσσερα γένη: το γένος Alpha coronavirus, το γένος Beta coronavirus, το γένος Gamma coronavirus, και τέλος το γένος Delta coronavirus. Ο SARS-CoV-2 είναι μέλος του γένους Beta coronavirus και σχετίζεται στενά με άλλους κορονοϊούς όπως ο SARS-CoV που ήταν υπεύθυνος για την έξαρση του SARS το 2002-2003 καθώς και με τον MERS-CoV που ήταν υπεύθυνος για το ξέσπασμα του αναπνευστικού συνδρόμου της Μέσης Ανατολής το 2012 [15].

Ο ιός SARS-CoV-2, παρουσιάζει μια πολύπλοκη δομή αποτελούμενη από διάφορα συστατικά, τα οποία του επιτρέπουν να μολύνει και να αναπαράγεται εντός των κυττάρων-ξενιστών (Εικόνα 1).





Εικόνα 1. Τα βασικά δομικά συστατικά του ιού SARS-CoV-2 [16].

Κάθε σωματίδιο του ιού έχει διάμετρο 50-200 nm, και αποτελείται από το γονιδίωμα (ssRNA (+)), το οποίο είναι το μεγαλύτερο από οποιονδήποτε άλλο ιό RNA. Περιμετρικά του γονιδιώματος παρατηρείται το καψίδιο, το οποίο σχηματίζεται από την νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη (Nucleocapsid, N). Στην επιφάνεια του καψιδίου εντοπίζονται οι υπόλοιπες τρεις δομικές πρωτεΐνες του ιού: η πρωτεΐνη ακίδα (Spike, S), το περίβλημα ή πρωτεΐνη φακέλου (Envelope, E), και η μεμβρανική πρωτεΐνη (Membrane, M). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι ζωτικής σημασίας καθώς είναι υπεύθυνες για την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, την αναπαραγωγή και τη συναρμολόγηση νέων σωματιδίων του ιού. Επιπρόσθετα, η δομή του ιού περιλαμβάνει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα καθώς και την RNA πολυμεράση (RNA replicase) [13][17]. Τέλος, η Κύρια Πρωτεάση (M<sub>pro</sub>) ή Πρωτεάση 3CL (3CL<sub>pro</sub>) και η Πρωτεάση τύπου παπαΐνης (Papain like protease, PL<sub>pro</sub>), είναι δυο βασικά ένζυμα που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του SARS-CoV-2, με κρίσιμο ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού, καθώς διασπούν τις ιικές πρωτεΐνες, που παράγονται κατά την αντιγραφή του ιού, σε μεμονωμένες λειτουργικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό των νέων σωματιδίων του ιού [18].

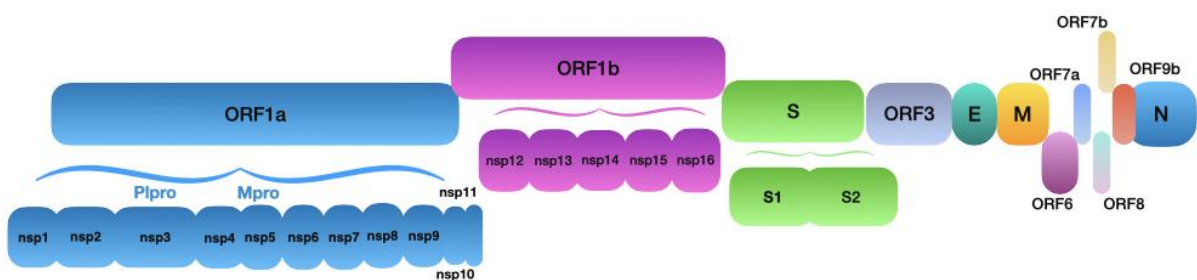
### 1.3.1 Το γονιδίωμα ssRNA (+)

Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 είναι ένα θετικά φορτισμένο μονόκλωνο μόριο RNA και περιέχει όλες τις γενετικές πληροφορίες, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη μόλυνση των κυττάρων ξενιστή, την αντιγραφή και την παραγωγή νέων ιικών σωματιδίων. Έχει μήκος περίπου 30.000 νουκλεοτίδια και είναι οργανωμένο σε διάφορες λειτουργικές περιοχές (Σχήμα 2):

(α) την 5' μη Μεταφρασμένη Περιοχή (5' Untranslated Region, 5' UTR???) , η οποία εντοπίζεται στην αρχή του γονιδιώματος, και περιέχει βασικά στοιχεία για την αντιγραφή και μετάφραση ιικού RNA [19].

(β) τα Ανοικτά Πλαίσια Ανάγνωσης (Open Reading Frames, ORFs). Τα Ανοικτά Πλαίσια Ανάγνωσης, 14 στο σύνολο, είναι μέρη της ακολουθίας RNA που περιέχουν συνεχόμενα κωδικόνια (τριπλέτες) που το καθένα κωδικοποιεί ένα αμινοξύ. Το γονιδίωμα περιέχει πολλά ORFs, καθένα από τα οποία κωδικοποιεί μια συγκεκριμένη βοηθητική ιική πρωτεΐνη [20] και αρκετές βοηθητικές πρωτεΐνες, όπως ORF3a, ORF6, ORF7a και ORF8. Αυτές οι πρωτεΐνες φαίνεται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του ιού και στην ανοσολογική διαφυγή [20].

(γ) την 3' μη Μεταφρασμένη Περιοχή (3' Untranslated Region, 3' UTR), η οποία βρίσκεται στο τέλος του γονιδιώματος, έχοντας σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και στη σταθερότητα του RNA [19].



**Σχήμα 2.** Το γονιδίωμα του ιού SARS-CoV-2 περιλαμβάνει τα Ανοικτά Πλαίσια Ανάγνωσης, ORF1a-ORF1b-S-ORF3-E-M-ORF6-ORF7 (7a και 7b)-ORF8-ORF9b-N κατά σειρά. Δεκαέξι μη δομικές πρωτεΐνες (nsp1-11 και nsp12-16) που κωδικοποιούνται από τα ORF1a και ORF1b αντίστοιχα, και έξι βοηθητικές πρωτεΐνες που οριοθετήθηκαν. Η πρωτεάση παπαΐνης (P1pro), η Κύρια πρωτεάση (M1pro), καθώς και οι τέσσερις δομικές πρωτεΐνες του ιού (ακίδα (S), φάκελος (E), μεμβράνη (M) και νουκλεοκαψιδική (N) [21].

### 1.3.2 Νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη

Η Νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη (Nucleocapsid, N) είναι μια αρθρωτή, πολύ-λειτουργική φωσφοπρωτεΐνη, η οποία μπορεί να χωριστεί σε δύο περιοχές:

(α) την N-τερματική περιοχή δέσμευσης RNA, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με RNA του ιού και εμπλέκεται στον σχηματισμό νουκλεοκαψιδίων, και

(β) την περιοχή διμερισμού C-τερματικού, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών του νουκλεοκαψιδίου, επιτρέποντάς τους τον σχηματισμό διμερών.

Η κύρια λειτουργία της πρωτεΐνης νουκλεοκαψιδίου είναι να πακετάρει και να προστατεύει το ιικό γονιδιωματικό RNA. Συνδέεται στο γονιδίωμα του RNA, σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα ριβονουκλεοπρωτεϊνών γνωστό ως νουκλεοκαψίδιο. Αυτό το σύμπλεγμα είναι ο πυρήνας του ιού και είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ακεραιότητας του ιικού RNA κατά την αντιγραφή και τη συναρμολόγηση νέων σωματιδίων του ιού.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη μπορεί να αλληλεπιδράσει με διάφορες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Συνεπώς, αυτές οι αλληλεπιδράσεις θα μπορούσαν να έχουν επιπτώσεις στην αντιγραφή και την παθογένεση του ιού. Η αναστολή της λειτουργίας της θα μπορούσε να επηρεάσει την αντιγραφή του ιού και ενδεχομένως να οδηγήσει στην ανάπτυξη αντιιικών θεραπειών καθιστώντας την ως ένα πιθανό θεραπευτικό στόχο.

Επιπρόσθετα, η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη έχει χρησιμοποιηθεί σε ορισμένες διαγνωστικές δοκιμές για την COVID-19. Για παράδειγμα, ορισμένες δοκιμές αντιγόνου ανιχνεύουν την παρουσία της σε αναπνευστικά δείγματα για τον εντοπισμό ενεργών ιογενών λοιμώξεων.

Συμπερασματικά, η νουκλεοκαψιδική πρωτεΐνη είναι συστατικό ζωτικής σημασίας του SARS-CoV-2, επιτρέποντας στον ιό να προστατεύει και να οργανώνει το γενετικό του υλικό για αποτελεσματική αντιγραφή και μετάδοση. Η μελέτη της καθίσταται σημαντική για την κατανόηση του κύκλου ζωής του ιού καθώς και για την ανάπτυξη πιθανών θεραπειών καθώς και διαγνωστικών δοκιμών για την COVID-19.

### 1.3.3 Η Πρωτεΐνη Ακίδα

Η Πρωτεΐνη Ακίδα (Spike protein, S) είναι μια από τις τέσσερις βασικές δομικές πρωτεΐνες του κορονοϊού (SARS-CoV-2) που ευθύνεται για την πρόκληση της COVID-19, και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα του ιού να μολύνει ανθρώπινα κύτταρα [22]. Η πρωτεΐνη ακίδα είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία προεξέχει από την επιφάνεια του κορονοϊού ως τριμερές, σχηματίζοντας τρεις διακριτές μονάδες (Εικόνα 1) [23].

Η βασική λειτουργία της πρωτεΐνης ακίδας είναι να διευκολύνει την είσοδο του ιού στα ανθρώπινα κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται δεσμεύοντας σε συγκεκριμένους υποδοχείς στην επιφάνεια των ανθρώπινων κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, συνδέεται στο Μετατρεπτικό Ένζυμο της Αγγειοτασίνης 2 (Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE2), το οποίο εντοπίζεται κυρίως στην αναπνευστική και γαστρεντερική οδό [23][24]. Όταν η πρωτεΐνη ακίδα δεσμεύεται στο ACE2 στην επιφάνεια ενός ανθρώπινου κυττάρου, υφίσταται μια διαμορφωτική αλλαγή, η οποία επιτρέπει στον ιό να συγχωνευθεί με τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, επιτρέποντας την απελευθέρωση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) στο κύτταρο [25]. Μόλις εισχωρήσει εντός του κυττάρου, ο ιός διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο του ξενιστή προκειμένου να αναπαραχθεί και να εξαπλωθεί περαιτέρω [24].

Ως εκ τούτου, η πρωτεΐνη ακίδα είναι ένας κρίσιμος στόχος για τα εμβόλια της COVID-19. Πολλά εμβόλια, συμπεριλαμβανομένων των εμβολίων mRNA των φαρμακευτικών εταιρειών Pfizer-BioNTech και Moderna, καθώς και εμβόλια ιικών φορέων όπως αυτά των εταιρειών Oxford-AstraZeneca και Johnson & Johnson, έχουν σχεδιαστεί ώστε το ανοσοποιητικό σύστημα να αναγνωρίσει και να παράγει αντισώματα κατά της πρωτεΐνης ακίδας [26][27][28]. Δημιουργώντας μια ανοσολογική απόκριση κατά της πρωτεΐνης ακίδας, αυτά τα εμβόλια στοχεύουν στην πρόληψη σοβαρών ασθενειών και στη μείωση της μετάδοσης του ιού. Είναι ιδιαίτερως σημαντική η κατανόηση του ρόλου της πρωτεΐνης ακίδας στη διαδικασία μόλυνσης του ιού για την ανάπτυξη αποτελεσματικών εμβολίων όπως και θεραπειών κατά του COVID-19.

Στο επόμενο Κεφάλαιο θα ενσωματωθούν ειδικές πληροφορίες που αφορούν τη δομή καθώς και τις περιοχές πρόσδεσης, οι οποίες προέκυψαν από Υπολογιστικές Μελέτες.

#### 1.3.4 Η Πρωτεΐνη Φάκελος

Η πρωτεΐνη Φάκελος (Envelope, E) είναι μία από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες του ιού SARS-CoV-2. Πρόκειται για μια μικρή διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η οποία διαδραματίζει αρκετούς και σημαντικούς ρόλους στον κύκλο ζωής του ιού [29] [30][31]. Αποτελείται από 75 έως 76 αμινοξέα και περιέχει μια μικρή υδρόφοβη περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την αγκυροβόλησή της στον ιικό φάκελο (Εικόνα 2) [30].



**Εικόνα 2. Η τριδιάστατη δομή της Πρωτεΐνης Φακέλου (pdb id: 7K3G) [30].**

Η πρωτεΐνη Φάκελος εμπλέκεται σε διάφορες φάσεις του κύκλου ζωής του ιού, συμπεριλαμβανομένης της συναρμολόγησης, της εκβλάστησης και της απελευθέρωσης νέων ιικών σωματιδίων [32].

Κατά τη διαδικασία αντιγραφής του ιού, αλληλεπιδρά με άλλες ιικές δομικές πρωτεΐνες, όπως τη μεμβρανική πρωτεΐνη (M) και τη πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N), για να διευκολύνει τη συναρμολόγηση νέων ιοσωμάτων. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες μαζί σχηματίζουν το ιικό περίβλημα που περιβάλλει το ιικό RNA και άλλα συστατικά [33].

Όπως αναφέρθηκε, η πρωτεΐνη Φάκελος είναι ζωτικής σημασίας για τη διαδικασία εκβλάστησης, κατά την οποία απελευθερώνονται νέα ιικά σωματίδια από το μολυσμένο κύτταρο ξενιστή. Αλληλεπιδρά με τη μεμβρανική πρωτεΐνη για να διευκολύνει την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στα

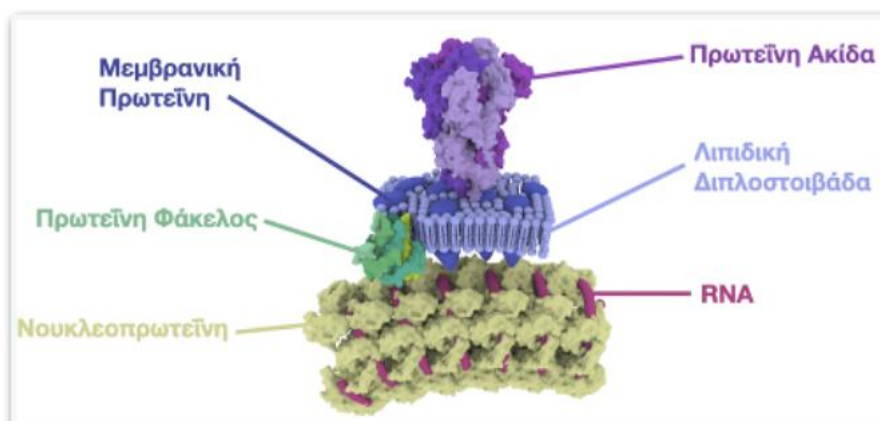
νεοσχηματιζόμενα ιοσωμάτια, αλλά και για να διαμορφώσει το ιικό περίβλημα κατά τη διαδικασία εκβλάστησης [29][30][31] .

Επιπλέον, η πρωτεΐνη Φάκελος έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να δράσει ως διάλυος ιόντων, δηλαδή μπορεί να σχηματίσει μικρούς πόρους στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή ώστε μέσω αυτών των πόρων να καθίσταται δυνατή η απελευθέρωση ιικών σωματιδίων από το μολυσμένο κύτταρο, και να ρυθμίζεται η απόκριση του κυττάρου ξενιστή στη μόλυνση [30].

Τέλος, μπορεί να προκαλέσει ανοσοαπόκριση σε μολυσμένα άτομα, καθώς αντισώματα κατά της πρωτεΐνης E έχουν ανιχνευθεί σε ασθενείς με COVID-19. Ωστόσο, ο ρόλος τους στην ανοσία και την προστασία δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός.

### 1.3.5 Η Μεμβρανική Πρωτεΐνη

Η Μεμβρανική Πρωτεΐνη (Membrane, M) είναι η τελευταία από τις τέσσερις δομικές του ιού SARS-CoV-2 που θα αναλυθεί. Διαδραματίζει κρίσιμους ρόλους στη συναρμολόγηση, το σχήμα καθώς και στην ενδοκυτταρική διακίνηση του ιού [34]. Η Μεμβρανική Πρωτεΐνη είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου III με τρεις τομείς: μια N-τερματική εξωτερική επιφάνεια, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια C-τερματική εσωτερική επιφάνεια. Εντοπίζεται εντός του περιβλήματος του ιού, σχηματίζοντας μια μήτρα, η οποία αλληλεπιδρά με άλλες δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες [34] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Το RNA, η λιπιδική διπλοστοιβάδα και οι τέσσερις δομικές πρωτεΐνες (Ακίδα, Φάκελος, Μεμβρανική και Νουκλεοπρωτεΐνη) του ιού SARS-CoV-2.

Η Μεμβρανική Πρωτεΐνη είναι κρίσιμη για τη συναρμολόγηση και την απελευθέρωση του ιού. Αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη φακέλου (E) και την πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου (N) για να φέρει σε επαφή το ιικό RNA και τα δομικά συστατικά, οδηγώντας στον σχηματισμό νέων ισωματίων. Στη συνέχεια, αυτά τα συναρμολογημένα ισωμάτια βλασταίνουν από το κύτταρο ξενιστή, αποκτώντας τον ιικό φάκελο με τη βοήθεια της πρωτεΐνης M [35].

Μια ακόμα λειτουργία της είναι να συμβάλλει στο συνολικό σχήμα και τη σταθερότητα του ιικού σωματιδίου. Διαδραματίζει ρόλο στον προσδιορισμό του μεγέθους και της μορφολογίας του ιού και επηρεάζει την ικανότητά του να μολύνει κύτταρα και να αποφεύγει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή [36]. Η Μεμβρανική Πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με διάφορες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και της συναρμολόγησης του ιού, μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορούν να επηρεαστούν η παθογένεση του ιού και η αντιική απόκριση του ξενιστή [36].

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να προκαλέσει ανοσοαπόκριση σε μολυσμένα άτομα, οδηγώντας στην παραγωγή αντισωμάτων [37]. Ωστόσο, σε σύγκριση με άλλες δοκιμές πρωτεΐνες (όπως η πρωτεΐνη ακίδα), η προκαλούμενη ανοσογονικότητα είναι σχετικά χαμηλότερη.

### **1.3.6 Η Λιπιδική Διπλοστοιβάδα**

Ως λιπιδική Διπλοστοιβάδα (Lipid Membrane ή Lipid Bilayer) του ιού SARS-CoV-2 αναφέρεται το περίβλημα που περιβάλλει το ιικό σωματίδιο, παρέχοντάς του ένα προστατευτικό εξωτερικό στρώμα [38]. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα είναι απαραίτητη για την επιβίωση, τη μολυσματικότητα και την αλληλεπίδραση του ιού με τα κύτταρα-ξενιστές [38]. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα παρέχει σταθερότητα στον ιό, προστατεύοντας το γενετικό υλικό (RNA) και τις δομικές πρωτεΐνες του από την αποικοδόμηση από τα ένζυμα του περιβάλλοντος. Επίσης, βοηθά τον ιό να επιβιώσει έξω από το κύτταρο ξενιστή για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη μετάδοσή του μεταξύ των ατόμων.

Η λιπιδική διπλοστοιβάδα είναι ζωτικής σημασίας για την είσοδο του ιού στα κύτταρα ξενιστές. Η Πρωτεΐνη Ακίδα, που βρίσκεται στην επιφάνεια του ιού, αλληλεπιδρά με συγκεκριμένους υποδοχείς (Angiotensin Converting Enzyme 2, ACE2) στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή [39]. Αυτή η αλληλεπίδραση πυροδοτεί τη σύντηξη μεταξύ των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου ξενιστή, επιτρέποντας στο ιικό γενετικό υλικό να εισέλθει στο κύτταρο.

Μια επιπλέον λειτουργία της λιπιδικής διπλοστοιβάδας είναι η εμπλοκή της στη συναρμολόγηση και εκβλάστηση νέων ιικών σωματιδίων. Οι δομικές πρωτεΐνες του ιού, όπως η μεμβρανική πρωτεΐνη και η πρωτεΐνη φακέλου, αλληλεπιδρούν με τη λιπιδική μεμβράνη κατά τη συναρμολόγηση του ιού [29][34]. Τα νέα ιοσωμάτια εκβλαστώνουν από το κύτταρο ξενιστή, αποκτώντας το λιπιδικό περίβλημα καθώς φεύγουν για να μολύνουν άλλα κύτταρα.

Η λιπιδική διπλοστοιβάδα καθώς και τα συστατικά της μπορούν να βοηθήσουν τον ιό να αποφύγει την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή. Ορισμένα μόρια λιπιδίων στην επιφάνεια του ιού μπορεί να προστατεύουν κρίσιμες ιικές πρωτεΐνες από την ανίχνευση από το ανοσοποιητικό σύστημα, καθιστώντας δυσκολότερο για τον ξενιστή να αναπτύξει μια αποτελεσματική άμυνα.

Καθώς η λιπιδική διπλοστοιβάδα είναι απαραίτητη για την ιογενή μολυσματικότητα, αποτελεί στόχο για ορισμένες αντιικές θεραπείες. Ορισμένα φάρμακα στοχεύουν στο να διαταράξουν την ακεραιότητα του περιβλήματος του ιού, αναστέλλοντας την είσοδο ή ακόμα και την αναπαραγωγή του ιού.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η κατανόηση της λιπιδικής διπλοστοιβάδας του SARS-CoV-2 είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη αντιικών στρατηγικών, συμπεριλαμβανομένων των εμβολίων και των θεραπευτικών σκευασμάτων, για την αποτελεσματική καταπολέμηση της COVID-19.

### **1.3.7 Η RNA πολυμεράση**

Η RNA πολυμεράση (RNA replicase ή RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) του SARS-CoV-2, γνωστή και ως RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), είναι ένα κρίσιμο ένζυμο, το οποίο διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες αντιγραφής και μεταγραφής του ιού [40]. Η RNA πολυμεράση είναι ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα



πολλαπλών υπομονάδων [20]. Αποτελείται από 16 μη δομικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των nsp12, nsp7 και nsp8. Το nsp12 είναι η καταλυτική υπομονάδα, στην οποία οφείλεται η δραστηριότητα πολυμεράσης, ενώ οι υπομονάδες nsp7 και nsp8 χρησιμεύουν ως συμπαραγόντες για την ενίσχυση της δραστηριότητάς της [41][42].

Κατά τη διαδικασία αντιγραφής του γενετικού υλικού, η RNA πολυμεράση «διαβάζει» το ιικό RNA και συνθέτει νέους κλώνους RNA συμπληρωματικούς προς το αρχικό πρότυπο. Αυτοί οι νεοσυντιθέμενοι κλώνοι RNA χρησιμεύουν ως πρότυπα για την παραγωγή περισσότερου ιικού RNA [43].

Καθώς τα αντίγραφα RNA, συμπεριλαμβανομένου αυτού του SARS-CoV-2, δεν διαθέτουν μηχανισμούς επιδιόρθωσης έχουν υψηλότερο ρυθμό μετάλλαξης σε σύγκριση με τις πολυμεράσες που βασίζονται στο DNA. Αυτό το υψηλό ποσοστό μετάλλαξης συμβάλλει στη γενετική ποικιλότητα και την εξέλιξη του ιού, οδηγώντας στην εμφάνιση νέων παραλλαγών με την πάροδο του χρόνου.

Η αναστολή της δραστηριότητας της RNA πολυμεράση μπορεί να διαταράξει την αναπαραγωγή του ιού και να μειώσει το ιικό φορτίο, περιορίζοντας ενδεχομένως τη σοβαρότητα και τη διάρκεια της μόλυνσης [41][43], λόγοι που την καθιστούν ως ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων.

### **1.3.8 Η Κύρια Πρωτεάση**

Η Κύρια πρωτεάση (Main Protease, Mpro) του SARS-CoV-2, επίσης γνωστή ως πρωτεάση τύπου 3C (3CLpro), είναι ένα κρίσιμο ένζυμο, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση των ιικών πολυπρωτεϊνών κατά τη διαδικασία αντιγραφής του ιού [44][45][46]. Λόγω του σημαντικού του ρόλου στον κύκλο ζωής του ιού αποτελεί ελκυστικό στόχο για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων.

Η Mpro είναι μια ιική πρωτεάση με πολύπλοκη τριδιάστατη δομή. Η ενεργή της θέση είναι ζωτικής σημασίας για την αναγνώριση και τη διάσπαση του υποστρώματος. Η κατανόηση της δομής της συγκεκριμένης πρωτεάσης είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό συγκεκριμένων αναστολέων με στόχο την αναστολή της δραστηριότητάς της [46].

Η Mpro είναι μια πρωτεάση που διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην επεξεργασία των μεγάλων πολυπρωτεϊνών που μεταφράζονται από το ιικό RNA. Το ιικό

RNA κωδικοποιεί τις πολυπρωτεΐνες, οι οποίες είναι μακριές αλυσίδες αμινοξέων που πρέπει να διασπαστούν σε μεμονωμένες λειτουργικές πρωτεΐνες ώστε να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή και στη συνέχεια η συναρμολόγηση του ιού. Στην ουσία, αναγνωρίζει συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων στις ιικές πολυπρωτεΐνες και τις διασπά σε ακριβείς θέσεις, απελευθερώνοντας τις λειτουργικές πρωτεΐνες που κρίνονται απαραίτητες για την αντιγραφή του ιού, τη μεταγραφή καθώς και άλλες ιικές διεργασίες [46].

Από την εμφάνιση της πανδημίας COVID-19, πολυάριθμες ερευνητικές μελέτες και προσπάθειες ανακάλυψης φαρμάκων έχουν αφιερωθεί στην κατανόηση της Κύριας Πρωτεΐνης και στον εντοπισμό πιθανών φαρμάκων, τα οποία μέσω της πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου μπορούν να εμποδίσουν την πρωτεολυτική του δραστηριότητα, διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο την αντιγραφή του ιού [44][45] [46] [47].

Στο επόμενο Κεφάλαιο θα πραγματοποιηθεί ανάλυση της δομής και της λειτουργίας της συγκεκριμένης Πρωτεΐνης.

#### **1.4 Τα συμπτώματα της COVID-19**

Η COVID-19, προκαλούμενη από τον ιό SARS-CoV-2, μπορεί να εκδηλωθεί με μια σειρά συμπτωμάτων, τα οποία ποικίλλουν ως προς τη σοβαρότητα, αλλά και την εμφάνισή τους [48]. Τα συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν δυο έως δεκατέσσερις ημέρες μετά την έκθεση στον ιό. Στη συνέχεια θα αναλυθούν τα πιο κοινά συμπτώματα της COVID-19 [49][50][51]:

- Συμπτώματα στο Αναπνευστικό Σύστημα:
  - Βήχας: Ο ξηρός βήχας είναι ένα συχνό πρώιμο σύμπτωμα, μπορεί να ξεκινήσει ως ήπιος ερεθισμός και να εξελιχθεί σε επίμονο βήχα.
  - Δύσπνοια: Δυσκολία στην αναπνοή ή αίσθημα δύσπνοιας, ειδικά κατά τη διάρκεια σωματικών δραστηριοτήτων ή και κατά την ανάπαυση.
- Πυρετός και ρίγη:
  - Πυρετός: Η αυξημένη θερμοκρασία σώματος είναι ένα κοινό σύμπτωμα το οποίο ενδέχεται να ποικίλλει σε σοβαρότητα.

- Ρίγη: Αίσθημα κρύου και ρίγη, που συχνά συνοδεύεται από πυρετό.
- Απώλεια γεύσης και όσφρησης:
  - Ανοσμία: Απώλεια της όσφρησης.
  - Απώλεια της αίσθησης της γεύσης.
- Κούραση:
  - Αίσθημα ασυνήθιστης κόπωσης ή εξάντλησης, το οποίο μπορεί να επιμείνει ακόμη και μετά από ήπια σωματική δραστηριότητα.
- Πόνοι μυών και σώματος:
  - Μυαλγία και πόνοι στο σώμα ενδέχεται να εμφανιστούν και μπορεί να είναι γενικευμένοι ή εντοπισμένοι.
- Πονοκέφαλο: Οι πονοκέφαλοι ενδέχεται να κυμαίνονται από ήπιους έως σοβαρούς. Επίσης, μπορεί να συνοδεύονται και από άλλα συμπτώματα.
- Πονόλαιμος: Ενόχληση ή πόνος στο λαιμό, που συχνά επιδεινώνεται με την κατάποση.
- Συμφόρηση ή καταρροή: Η βουλωμένη ή η ρινική καταρροή είναι λιγότερο συχνή, αλλά μπορεί να εξακολουθεί να είναι σύμπτωμα του COVID-19.
- Συμπτώματα στο Γαστρεντερικό Σύστημα:
  - Ναυτία και έμετος: Αίσθημα ναυτίας και πιθανώς εμετός.
  - Διάρροια: Συχνές χαλαρές ή υδαρείς κενώσεις.
- Δερματικά συμπτώματα: Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί δερματικά εξανθήματα και άλλα δερματολογικά συμπτώματα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα συμπτώματα της COVID-19 ενδέχεται να διαφέρουν ευρέως, με απόρροια τη μη εμφάνιση των ίδιων συνολικών συμπτωμάτων από τους νοσούντες. Επιπλέον, ορισμένα άτομα, ιδιαίτερα τα νεότερα άτομα ή αυτά που είναι ασυμπτωματικά, μπορεί να παρουσιάζουν πολύ ήπια ή και καθόλου συμπτώματα [48]. Οι σοβαρές περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε πνευμονία, σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS), ανεπάρκεια οργάνων και θάνατο, ειδικά σε ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας και σε ασθενείς με υποκείμενες παθήσεις.

## 1.5 Η θεραπεία της COVID-19

Στις αρχές της πανδημίας λόγω της περιορισμένης κατανόησης της δράσης του ιού SARS-CoV-2, η θεραπευτική διαχείριση της νόσου υπήρξε επίσης περιορισμένη. Ως εκ τούτου δημιουργήθηκε μια επείγουσα ανάγκη αντιμετώπισης της νέας ιογενούς νόσου είτε με πειραματικές θεραπείες είτε με επαναχρησιμοποίηση φαρμάκων. Έκτοτε, η επιστημονική κοινότητα του τομέα Υγείας παγκοσμίως στράφηκε προς αυτή την κατεύθυνση με αποτέλεσμα να σημειωθεί σημαντική πρόοδος τόσο στην κατανόηση της COVID-19, όσο και στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών και εμβολίων [52].

Επί του παρόντος, οι θεραπευτικές επιλογές περιλαμβάνουν αντιικά φάρμακα (π.χ. molnupiravir, raxlovid, remdesivir), μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies, mAbs) κατά του ιού SARS-CoV-2 (π.χ. bamlanivimab/etesevimab, casirivimab/imdevimab, sotrovimab, bebtelovimab), αντιφλεγμονώδη φάρμακα (π.χ. dexamethasone), ανοσοτροποποιητικά φάρμακα (π.χ. baricitinib, tocilizumab), τα οποία είναι διαθέσιμα με εξουσιοδότηση Άδειας Χρήσης Έκτακτης Ανάγκης (εκδιδόμενη από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (Food and Drugs Administration, FDA) ή έχουν αξιολογηθεί για τη διαχείριση της COVID-19 [52].

Η κλινική πορεία της νόσου COVID-19 εμφανίζει δυο φάσεις, μία πρώιμη φάση όπου η αναπαραγωγή του ιού είναι μεγαλύτερη πριν ή αμέσως μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων και στη μεταγενέστερη φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από μια υπέρ-φλεγμονώδη κατάσταση προκληθείσα από την απελευθέρωση κυτοκινών και ακολούθως την ενεργοποίηση του συστήματος πήξης προκαλώντας μια προθρομβωτική κατάσταση. Τα αντιικά φάρμακα και οι θεραπείες που βασίζονται σε αντισώματα είναι πιθανώς να είναι πιο αποτελεσματικά στο πρώιμο στάδιο (αναπαραγωγή του ιού) ενώ τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως τα κορτικοστεροειδή, οι ανοσοτροποποιητικές θεραπείες ή ένας συνδυασμός αυτών των θεραπειών ενδέχεται να βοηθήσουν στην καταπολέμηση δεύτερης φάσης (υπέρ-φλεγμονώδης κατάσταση) [53].

## 1.6 Η πρόληψη της COVID-19

Για να την πρόληψη και τη μείωση της μετάδοσης του SARS-CoV-2 επιβλήθηκαν μέτρα δημόσιας υγείας (όπως χρήση μάσκας). Εν τούτοις, το πιο κρίσιμο βήμα για να περιοριστεί αυτή η παγκόσμια πανδημία είναι ο εμβολιασμός του πληθυσμού, αλλά και για την πρόληψη της νόσησης από τον κορονοϊό. Οι εξαιρετικές προσπάθειες της Επιστημονικής Κοινότητας σε όλο τον κόσμο καθ' όλη τη διάρκεια της πανδημίας είχαν ως απόρροια την ανάπτυξη νέων εμβολίων κατά του ιού SARS-CoV-2 σε τάχιστο χρόνο. Ο μηχανισμός δράσης του εμβολιασμού εντοπίζεται στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο έπειτα παράγει εξουδετερωτικά αντισώματα κατά του ιού SARS-CoV-2. Σύμφωνα με τα στοιχεία που παρέχει ο ΠΟΥ, μέχρι στιγμής έχουν χορηγηθεί περισσότερες από 12 δισεκατομμύρια δόσεις δόσεων εμβολίων.

- **Εμβόλιο BNT162b2:** τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών ανέφεραν ότι τα άτομα ηλικίας 16 ετών και άνω που έλαβαν σχήμα δύο δόσεων του δοκιμαστικού εμβολίου BNT162b2 (βασισμένο σε mRNA, BioNTech/Pfizer) που χορηγήθηκε με διαφορά 21 ημερών, παρείχε 95% προστασία έναντι του COVID-19 με προφίλ ασφάλειας παρόμοιο με άλλα ιικά εμβόλια [26]. Μετά τη λήψη της Άδειας Χρήσης Έκτακτης Ανάγκης, ο ΠΟΥ των ΗΠΑ ενέκρινε την κλινική χρήση του εμβολίου BNT162b2 για την πρόληψη του COVID-19 τον Αύγουστο του 2021.
- **Εμβόλιο mRNA-1273:** Τα αποτελέσματα κλινικών μελετών σε άτομα που τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν δύο δόσεις εμβολίου mRNA-1273 (με βάση το mRNA, Moderna), στα οποία χορηγήθηκαν με διαφορά 28 ημερών, έδειξαν 94,1% αποτελεσματικότητα στην πρόληψη της COVID-19 [54]. Μετά τη λήψη της Άδειας Χρήσης Έκτακτης Ανάγκης, ο ΠΟΥ των ΗΠΑ ενέκρινε την κλινική χρήση του εμβολίου mRNA-1273 για την πρόληψη του COVID-19 τον Ιανουάριο του 2022.
- **Εμβόλιο Ad26.COV2.S:** Οι κλινικές δοκιμές, της Φάσης 3, έδειξαν ότι μια εφάπαξ δόση του εμβολίου Ad26.COV2.S παρείχε 73,1% αποτελεσματικότητα στην πρόληψη του COVID-19, σε συμμετέχοντες ενήλικες που τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν το εμβόλιο [55]. Ο ΠΟΥ

των ΗΠΑ ενέκρινε την κλινική χρήση του συγκεκριμένου εμβολίου στις 27 Φεβρουαρίου 2021.

- **Εμβόλιο ChAdOx1 nCoV-19:** Οι κλινικές μελέτες μιας εν εξελίξει τυχαιοποιημένης δοκιμής ελέγχου έδειξε αποδεκτό προφίλ ασφάλειας και κλινική αποτελεσματικότητα 70,4% έναντι του συμπτωματικού COVID-19 μετά τη χορήγηση δύο δόσεων, και 64% προστασίας έναντι του COVID-19 μετά από τουλάχιστον μία τυπική δόση [56]. Το εμβόλιο ChAdOx1 nCoV-19 έχει εγκριθεί ή έχει λάβει άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης για την πρόληψη του COVID-19 σε πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο, αλλά δεν έχει εγκριθεί ακόμα από τον ΠΟΥ για χρήση στις Η.Π.Α.
- **Εμβόλιο NVX-CoV2373:** Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα από τις κλινικές μελέτες της φάσης 2 στη Νότια Αφρική, όπου αξιολογείται η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του NVX-CoV2373 (Novavax), μιας γενετικής μηχανής νανοσωματιδίων ανασυνδυασμένου SARS-CoV-2, ανέφερε ότι το εμβόλιο NVX-CoV2373 ήταν αποτελεσματικό στην πρόληψη του COVID-19 [57], ενώ μελέτη στις Ηνωμένες Πολιτείες και το Μεξικό με περισσότερους από 29.000 συμμετέχοντες έδειξε ότι μια εφάπαξ δόση του NVX-CoV2373, παρείχε 92,6% αποτελεσματικότητα έναντι οποιασδήποτε παραλλαγής του ιού [58].

Εκτός από τα προαναφερθέντα εμβόλια άλλα επτά εμβόλια, συμπεριλαμβανομένων αυτών που έχουν βασιστεί σε πρωτεΐνες καθώς και των αδρανοποιημένων εμβολίων, έχουν αναπτυχθεί εγχώρια στην Ινδία (Covaxin), στη Ρωσία (Sputnik V) και στην Κίνα (CoronaVac) και έχουν λάβει Άδεια Χρήσης Έκτακτης Ανάγκης για την πρόληψη του COVID-19 σε πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο.

Τέλος, μια τρίτη δόση (αναμνηστική δόση) έχει συμπεριληφθεί στο πρόγραμμα εμβολιασμού διαφόρων εθνών, καθώς μελέτες έδειξαν μείωση της ανοσίας μετά από δυο δόσεις, οπότε μια τρίτη δόση προσφέρει υψηλότερα επίπεδα ανοσοπροστασίας [59][60]. Επιπρόσθετα, μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή φάσης 2 από το Ηνωμένο Βασίλειο, η οποία συνέκρινε διάφορους συνδυασμούς εμβολίων, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ανάμειξη τύπων εμβολίων ενίσχυσε τα αντισώματα καθώς και τις αποκρίσεις εξουδετέρωσης για

τα επτά δοκιμασμένα εμβόλια κατά της COVID-19 (ChAd, BNT, m1273, NVX, Ad26, CVn και VAL) [61].

## Κεφάλαιο 2

### Η Κύρια Πρωτεάση και η Πρωτεΐνη Ακίδα του ιού SARS-CoV-2

#### 2.1 Εισαγωγή

Για την ανάπτυξη αντιικών φαρμάκων και εμβολίων κατά της COVID-19, η Επιστημονική Κοινότητα στράφηκε στα κρίσιμα συστατικά του κύκλου ζωής του ιού SARS-CoV-2. Στο παρόν Κεφάλαιο θα πραγματοποιηθεί ενδελεχής περιγραφή της Κύριας Πρωτεάσης και της Πρωτεΐνης Ακίδας του συγκεκριμένου ιού, καθώς λόγω των λειτουργιών τους αποτελούν τους πιο ελκυστικούς και ιδανικούς στόχους.

Η Πρωτεΐνη Ακίδα μεσολαβεί στην είσοδο του ιού στα κύτταρα-ξενιστές δεσμεύοντας τον υποδοχέα του Μετατρεπτικού Ενζύμου 2 της Αγγειοτασίνης (ACE2) στην κυτταρική επιφάνεια. Η αναστολή της αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης ακίδας και του ACE2 θα μπορούσε να αποτρέψει την είσοδο του ιού και συνεπώς τη μόλυνση.

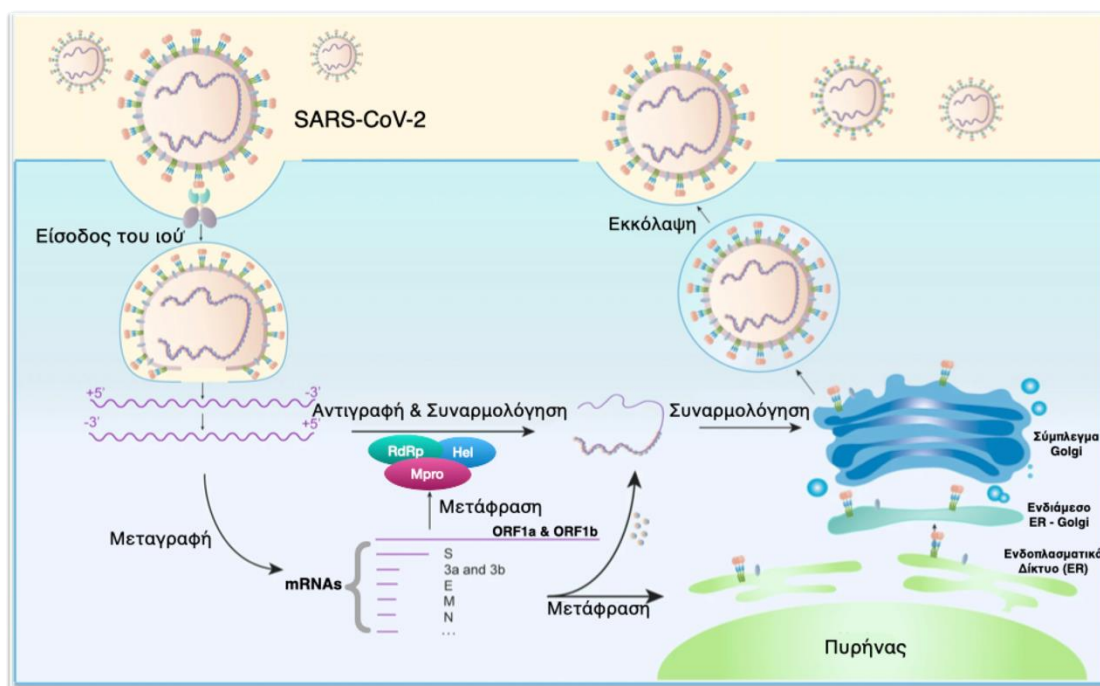
Η Κύρια Πρωτεάση είναι ζωτικής σημασίας καθώς παρουσιάζει ένα ευδιάκριτο πλεονέκτημα λόγω της αποκλειστικής της ικανότητας να διασπά αλληλουχίες πολυπεπτιδίου μετά από την παρουσία ενός αμινοξέος γλουταμίνης. Επί του παρόντος δεν υπάρχει γνώση για πρωτεάσες ανθρώπινων κυττάρων-ξενιστών με παρόμοια εξειδίκευση υποστρώματος, ενισχύοντας περαιτέρω την πιθανή βιωσιμότητα της Mpro ως στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων.

#### 2.2 Ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού SARS-CoV-2

Η επιφάνεια του ιού SARS-CoV-2 περιβάλλεται από πολυάριθμες γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες S, οι οποίες αλληλεπιδρούν με ACE2 του κυττάρου-ξενιστή, επιτρέποντας την κυτταρική είσοδο του ιού [62]. Κατά τη δέσμευση της Πρωτεΐνης Ακίδας, μια διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης (Transmembrane Protease Serine 2, TMPRSS2), που εντοπίζεται στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, ενεργοποιεί την πρωτεΐνη S, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό την είσοδο του ιού. Μετά την κυτταρική διείσδυση,



απελευθερώνεται ιικό RNA, οδηγώντας στη μετάφραση πολυπρωτεϊνών από το γονιδίωμα του RNA. Αυτή η περίπλοκη διαδικασία περιλαμβάνει τη διάσπαση πρωτεΐνης, τη συναρμολόγηση του συμπλέγματος της πολυμεράσης RNA, την αντιγραφή καθώς και τη μεταγραφή του γονιδιώματος του ιικού RNA. Κατά συνέπεια, λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του ιικού RNA, συντίθενται, συναρμολογούνται και συσκευάζονται δομικές πρωτεΐνες εντός του κυττάρου ξενιστή, με αποκορύφωμα την απελευθέρωση ιικών σωματιδίων (Σχήμα 3) [63].



Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου αναπαραγωγής του ιού SARS-CoV-2.

### 2.3 Η Κύρια Πρωτεάση

Η Κύρια Πρωτεάση (Main Protease, Mpro), γνωστή και ως Πρωτεάση τύπου 3 χυμοθρεψίνης (3-chymotrypsin-like protease, 3CLpro), είναι ένας αρκετά μελετημένος στόχος στην κατηγορία των κορονοϊών, καθώς έχει συγκεντρώσει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω του υψηλού βαθμού διατήρησής της και της σαφούς διάκρισής της από τα ανθρώπινα γονίδια. Συγκεκριμένα, τα πρόσφατα ευρήματα αποκαλύπτουν ότι παρά το 80% συνολικής ομοιότητας στην ταυτότητα αλληλουχίας μεταξύ του SARS-CoV και του SARS-CoV-2, το ένζυμο Mpro του SARS-CoV-2 εμφανίζει μια εντυπωσιακή ομοιότητα στην

ταυτότητα αλληλουχίας 96,08% με το αντίστοιχο του SARS-CoV [64]. Γεγονός που μας οδηγεί στη σκέψη ότι ένας ισχυρός αναστολέας που στοχεύει στην Mpro του ιού SARS-CoV θα μπορούσε επίσης να χρησιμεύσει ως ισχυρός αναστολέας για την Mpro του SARS-CoV-2.

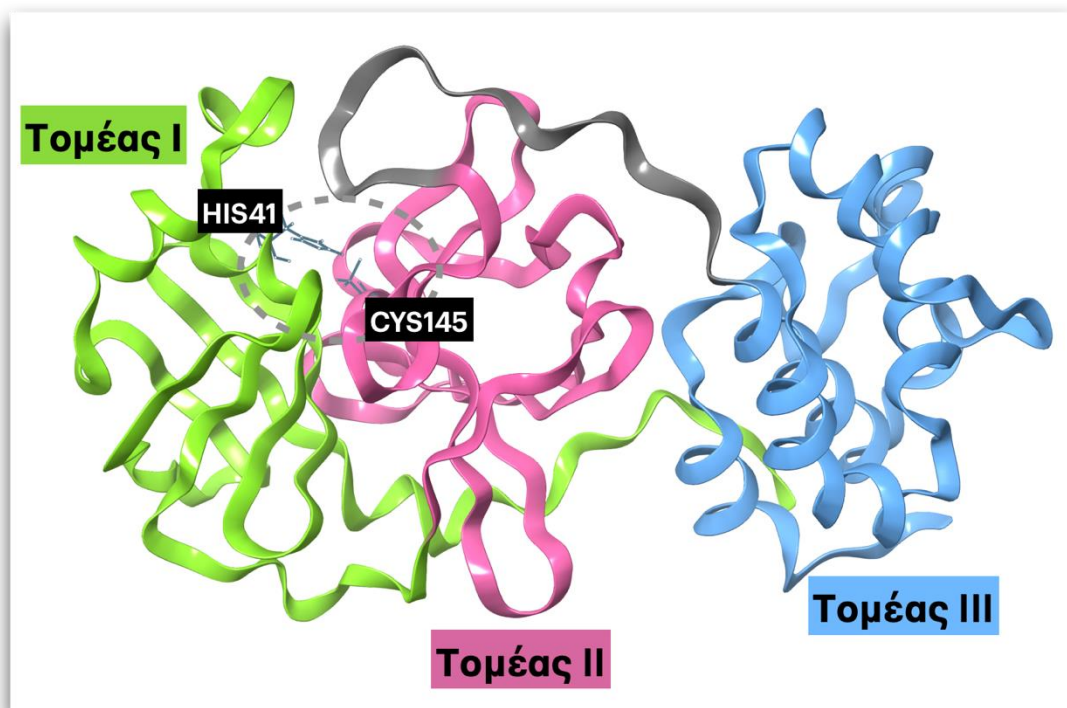
### 2.3.2 Η δομή της Κύριας Πρωτεΐσης

Δομικά, η Mpro είναι οργανωμένη ως διμερές, με τα δύο μονομερή τοποθετημένα σχεδόν κάθετα μεταξύ τους. Ωστόσο, κάθε μονομερές, είναι ενζυμικά ανενεργό [65]. Τα εν λόγω μονομερή παρουσιάζουν μια διάταξη αποτελούμενη από τρεις τομείς: τον τομέα I (αμινοξέα 10-99), τον τομέα II (αμινοξέα 100-182) και τον τομέα III (αμινοξέα 198-303) [66][67][68]. Οι τομείς I και II, οι οποίοι εντοπίζονται στο N-τελικό άκρο, αποτελούνται από εξάκλωνες αντιπαράλληλες δομές β-βαρελίου, που συλλογικά μοιάζουν με την αρχιτεκτονική της χυμοθρυψίνης και άλλων πρωτεασών τύπου 3C που βρίσκονται στους πι-κορονοϊούς (Εικόνα 4) [69]. Μεταξύ αυτών των περιοχών σχηματίζεται μια πτυχή τύπου χυμοθρυψίνης, η οποία φιλοξενεί τον πλήρη καταλυτικό μηχανισμό [70].

Συγκεκριμένα, η Mpro ξεχωρίζει με ένα ασυνήθιστο καταλυτικό αμινοξύ κυστεΐνης, το Cys145, σχηματίζοντας ένα δυαδικό ζεύγος με ένα αμινοξύ ιστιδίνης (His41), σε αντίθεση με την τυπική τριάδα Ser(Cys)-His-Asp(Glu), η οποία παρατηρείται σε ένζυμα που μοιάζουν με τη χυμοθρυψίνη και πολλές υδρολάσες [70][71]. Η συγκεκριμένη καταλυτική δυάδα συμμετέχει στο στάδιο ακυλίωσης κατά τη διάρκεια της πρωτεολυτικής αντίδρασης, με τη Cys145 να δρα ως πυρηνόφιλο και το ιμιδαζόλιο της His41 ως γενική βάση [72]. Οι ενεργές θέσεις της Mpro είναι εξαιρετικά διατηρημένες, αποτελούμενες από τέσσερις υποτομείς (S1', S1, S2 και S4) μέσα σ' ένα κυρίως υδρόφιλο θύλακα [72]. Μια περιοχή εκτεταμένου βρόχου συνδέει τις καταλυτικές περιοχές με τον τομέα III, το C-τερματικό τμήμα. Ο τομέας III αποτελείται από ένα σφαιρικό σύμπλεγμα πέντε αντιπαράλληλων α-ελίκων, το οποίο είναι μοναδικό για τις πρωτεάσες των κορονοϊών και ευθύνεται για τον διμερισμό του ενζύμου [73].

Ο διμερισμός, απαραίτητος για την ενζυμική δράση, περιλαμβάνει τον τομέα II του μονομερούς A και τη NH<sub>2</sub>-τερματική περιοχή, «N-δάκτυλο», του μονομερούς B, διασφαλίζοντας τον ορθό προσανατολισμό του θύλακα S1 και

της θέσης δέσμευσης του υποστρώματος [42]. Μέσω Υπολογιστικών μελετών της δομής της Mpro οι ερευνητές απέδειξαν ότι όταν ο μέσος όγκος του θύλακα σύνδεσης αυξάνεται σε μια αλυσίδα, λαμβάνει χώρα μείωση στην άλλη αλυσίδα. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του N-άκρου και της περιοχής III ενός μονομερούς σταθεροποιούν τα αμινοξέα στον θύλακα [42].

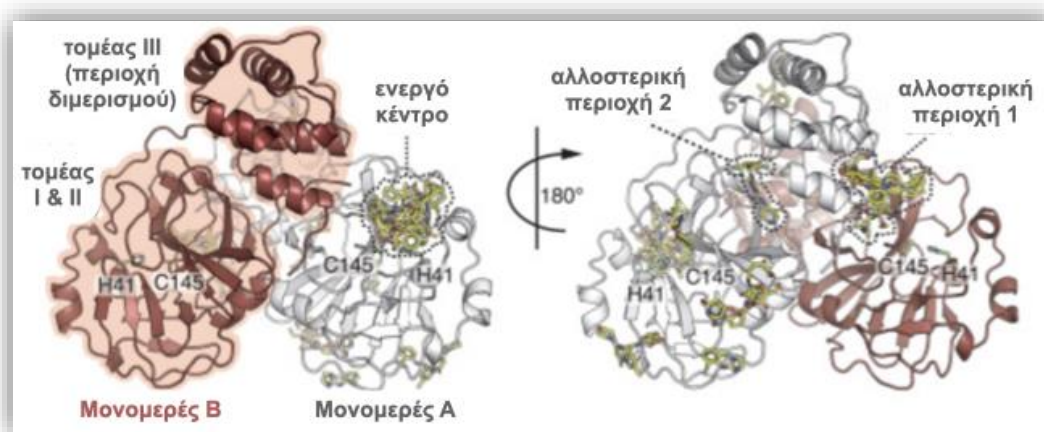


**Εικόνα 4.** Η δομή του κάθε μονομερούς της Mpro του ιού SARS-CoV-2 εμφανίζει διακριτούς τομείς. Ο τομέας I (αμινοξέα 8–101) απεικονίζεται με πράσινο, ο τομέας II (αμινοξέα 102–184) απεικονίζεται με φούξια και ο τομέας III (αμινοξέα 201–303) απεικονίζεται με γαλάζιο. Η καταλυτική δυάδα της Mpro (His14 και Cys145) αναπαρίστανται σε μορφή ραβδιού, που υποδεικνύεται με τον γκρι κύκλο.

Από την ευθυγράμμιση αλληλουχίας της Mpro του SARS-CoV-2 με τον SARS-CoV παρατηρήθηκε 96 % ομοιότητα, με μόνο μικρές διαφορές στην αλληλουχία (12 μη διατηρημένα αμινοξέα από τα 306), τα οποία δεν επηρεάζουν σημαντικά την καταλυτική δραστηριότητα ή τη συνολική δομή [67][74]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα διατηρημένα αμινοξέα όπως η His41 και το Glu166 συμβάλλουν στη σύνδεση του υποστρώματος, ενώ άλλα όπως η Arg4 και η Ser10 διαδραματίζουν ρόλο στον διμερισμό του ενζύμου [75][76][77]. Επιπρόσθετα,

παρατηρήθηκε ότι η απουσία σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μεταξύ της Thr285 στον SARS-CoV και στον SARS-CoV-2 δεν εμποδίζει τον διμερισμό ή τη δραστηριότητά του [72].

Στη μελέτη τους οι Günher *et al.* προτείνουν δυο αλλοστερικές περιοχές δέσμευσης της Mpro του ιού SARS-CoV-2 (Εικόνα 5) [78]. Η πρώτη αλλοστερική περιοχή εντοπίζεται στον τομέα III (περιοχή διμερισμού) και βρίσκεται σε άμεση γειννίαση με τον θύλακα S1 του γειτονικού μονομερούς εντός του φυσικού διμερούς. Κεντρική θέση σε αυτή την περιοχή δέσμευσης διαδραματίζει ένας υδρόφοβος θύλακας που σχηματίζεται από τα αμινοξέα Ile213, Leu253, Gln256, Val297 και Cys300 εντός της O-τερματικής περιοχής διμερισμού. Η δεύτερη αλλοστερική περιοχή σχηματίζεται από τη βαθιά αύλακα μεταξύ των καταλυτικών τομέων (His41 και Cys145) και του τομέα III.



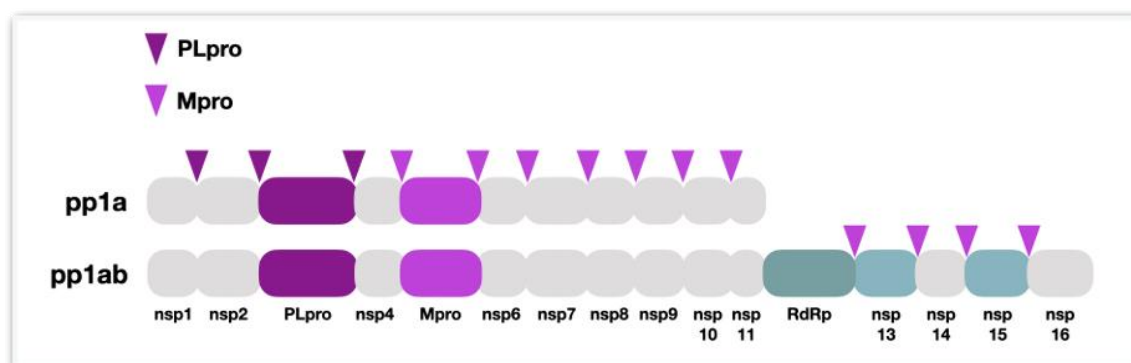
Εικόνα 5. Η διμερής δομή της Mpro. Αριστερά: απεικονίζονται οι τομείς I, II και III, καθώς και το ενεργό κέντρο. Δεξιά: απεικονίζονται οι δυο αλλοστερικές περιοχές [78].

### 2.3.1 Η λειτουργία της Κύριας Πρωτεάσης

Αυτό το κρίσιμο ένζυμο στον SARS-CoV-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία ιικών πολυπρωτεϊνών, οδηγώντας στη δημιουργία τελικών προϊόντων από το ιικό RNA στη θέση διάσπασης της πολυπρωτεΐνης pp1ab (polyprotein 1ab, pp1ab) [66]. Μόλις διασπαστούν από την Mpro, οι μη δομικές πρωτεΐνες (nsps), συμμετέχουν στη συναρμολόγηση του συμπλόκου μεταγραφής αντιγραφής του ιού για τη σύνθεση ιικού RNA [47][42][79]. Η Mpro είναι απαραίτητη για την αποκωδικοποίηση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο

πολυπρωτεϊνών (pp1a και pp1ab), ακολούθως λαμβάνει χώρα η αυτοδιάσπασή της (Σχήμα 4).

Η πολυπρωτεΐνη pp1a είναι ένα πρόδρομο μόριο που συντίθεται από τον ιό SARS-CoV-2. Περιέχει μια σειρά μη δομικών πρωτεϊνικών περιοχών, οι οποίες είναι απαραίτητες σε διάφορα στάδια στον κύκλο αναπαραγωγής του ιού. Η πολυπρωτεΐνη pp1ab είναι ένα μεγαλύτερο πρόδρομο μόριο που περιλαμβάνει ολόκληρη την αλληλουχία του pp1a καθώς και με κάποιες επιπλέον μη δομικές πρωτεϊνικές περιοχές. Παρόμοια με τη pp1a, η pp1ab διασπάται επίσης σε μεμονωμένες μη δομικές πρωτεϊνικές μονάδες από ιικές πρωτεάσες. Η πολυπρωτεΐνη pp1ab μεταφράζεται από το ιικό RNA και περιέχει αρκετές περιοχές, οι οποίες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή, τη μεταγραφή και άλλες διαδικασίες ζωτικής σημασίας για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του ιού [80].



**Σχήμα 4.** Σχηματική αναπαράσταση των δύο πολυπρωτεϊνών pp1a και pp1ab του ιού SARS-CoV-2. Αυτές οι πολυπρωτεΐνες διασπώνται από μία ή δύο πρωτεάσες, την PLpro και την Mpro. Στο σχήμα με ιώδες τριγωνικό σύμβολο υποδεικνύονται οι θέσεις διάσπασης της PLpro και με σκούρο λιλά αυτές της Mpro αντίστοιχα.

Τόσο η πολυπρωτεΐνη pp1a, όσο και η pp1ab χρησιμεύουν ως χρησιμοποιούμενη στρατηγική από τον ιό SARS-CoV-2 για τη συμπαγή κωδικοποίηση πολλαπλών λειτουργικών πρωτεϊνών σ' ένα μόνο πρόδρομο μόριο. Η πρωτεολυτική διάσπαση αυτών των πολυπρωτεϊνών που πραγματοποιείται από την Κύρια Πρωτεάση, δημιουργεί μεμονωμένες μη δομικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορες πτυχές της ιικής αντιγραφής και μόλυνσης. Αυτές οι μη δομικές πρωτεΐνες συμβάλλουν σε διεργασίες όπως η αντιγραφή ιικού RNA, η μεταγραφή, η μετάφραση και η ρύθμιση της

ανοσοαπόκρισης του ξενιστή. Η στόχευση της διάσπασης αυτών των πολυπρωτεϊνών, ιδιαίτερα με την αναστολή της δραστηριότητας της Mpro, έχει διερευνηθεί ως πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για τη διακοπή της αναπαραγωγής του ιού και την αναστολή της εξάπλωσης του SARS-CoV-2 [80].

Επίσης, είναι καθοριστική για τη διάσπαση έντεκα επιπλέον θέσεων, παράγοντας τελικά δεκαέξι μη δομικές πρωτεΐνες [80][81]. Η συγκεκριμένη πρωτεάση (Mpro) του κορονοϊού, που αναφέρεται επίσης ως 3CLpro, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην έκφραση και την αντιγραφή των γονιδίων του ιού. Η εναλλακτική του ονομασία, πρωτεάση τύπου 3C, υποδηλώνει τη δομική της ομοιότητα με τις πρωτεάσες τύπου 3C που βρίσκονται στους πι-κορονοϊούς και τις κοινές προτιμήσεις υποστρώματος τους [69].

### **2.3.3 Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή της Κύρια Πρωτεάση**

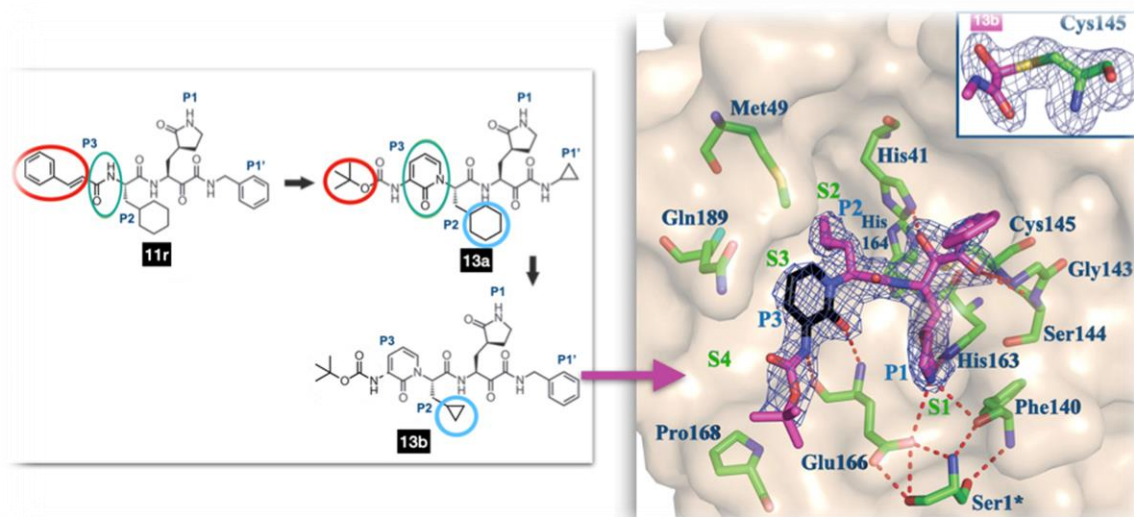
Η ανάπτυξη φαρμάκων που δεσμεύουν επιλεκτικά και αναστέλλουν την Κύρια Πρωτεάση του ιού SARS-CoV-2 είναι μια εξαιρετικά υποσχόμενη στρατηγική για την καταπολέμηση της πανδημίας COVID-19. Συγκεκριμένα, το αμινοξύ Gly143 εντός του SARS-CoV-2 Mpro έχει αναγνωριστεί ως μια ιδιαίτερα ελκυστική θέση για τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με προσδέτες (ligands), ακολουθούμενη από τα Glu166, Cys145 και His163, υπογραμμίζοντας τη δυνατότητα για στοχευμένο σχεδιασμό φαρμάκων [82].

Οι κρυσταλλικές δομές ιικών πρωτεασών συνδεδεμένων με πιθανούς αναστολείς μας προσφέρουν πολύτιμες γνώσεις, καθώς παρέχουν δυνατότητα στον σχεδιασμό βελτιωμένων φαρμάκων μέσω της τροποποίησης των αναστολέων σύμφωνα με τη δομική δυναμική της ενεργού θέσης στα ένζυμα στόχους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο ισχυρός αναστολέας AG7088 για ρινοϊούς και άλλες πρωτεάσες τύπου Picornaval 3C (3Cpro), ο οποίος δεν αναστέλλει αποτελεσματικά την Mpro του SARS-CoV-2 λόγω δομικών διαφορών [83][84]. Το συγκεκριμένο παράδειγμα τονίζει την ανάγκη για ακριβείς τροποποιήσεις φαρμάκων με βάση τις διαφορές στην αλληλουχία και τις δομικές παραλλαγές, οι οποίες επηρεάζουν σημαντικά την εξειδίκευση του αναστολέα.



Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η μονομερής μορφή της Mpro θεωρείται κυρίως ανενεργή, αυξάνοντας έτσι τη διμερή μορφή ως πιο βιώσιμο στόχο φαρμάκου [85]. Ο σχεδιασμός αναστολέων με βάση την ανταγωνιστική δέσμευση στη δραστική θέση προσφέρει μια πολύτιμη προσέγγιση για τον εντοπισμό των νέων και βελτιωμένων αναστολέων.

Η διάταξη της Mpro του ιού SARS-CoV-2 με δυνάμει φαρμακευτικούς αναστολείς απεικονίζεται μέσω κρυσταλλικών δομών. Οι Zhang *et al.* προσδιόρισαν την κρυσταλλική δομή με τη χρήση ακτίνων Χ του ενζύμου, το οποίο ήταν συμπλεγμένο με πεπτιδομιμητικούς αναστολείς α-κετοαμίδης (Εικόνα 6) [66]. Για να ενισχύσουν τον χρόνο ημιζωής στο πλάσμα και τη στόχευση των πνευμόνων, οι συγγραφείς εισήγαγαν τροποποιήσεις σ' έναν αναστολέα που είχε αναπτυχθεί προηγουμένως (11r). Ενσωμάτωσαν έναν αμιδικό δεσμό P2-P3 στον δακτύλιο πυριδόνης, αποδίδοντας την ένωση 13a. Επιπλέον, οι δομικές προσαρμογές οδήγησαν στη δημιουργία ενός πιο ισχυρού αλλά στενού φάσματος φαρμάκου, του 13b, όπου επιτεύχθηκε με την αντικατάσταση του τμήματος κυκλοεξανίου P2 με ένα συμπαγές κυκλοπροπάνιο. Αυτή η ένωση συνδέεται εντός του ρηχού θύλακα δέσμευσης υποστρώματος στην επιφάνεια των πρωτομερών που παρατηρούνται μεταξύ των τομέων I και II.



**Εικόνα 6.** Αριστερά: Οι χημικές δομές των αναστολέων α-κετοαμίδιου 11r, 13a, 13b και 14b, οι έγχρωμοι κύκλοι επισημαίνουν τις δομικές τροποποιήσεις από το ένα βήμα ανάπτυξης στο επόμενο. Δεξιά: Η ένωση 13b στην περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος, το οποίο εντοπίζεται μεταξύ των τομέων I και II της Mpro. Στον

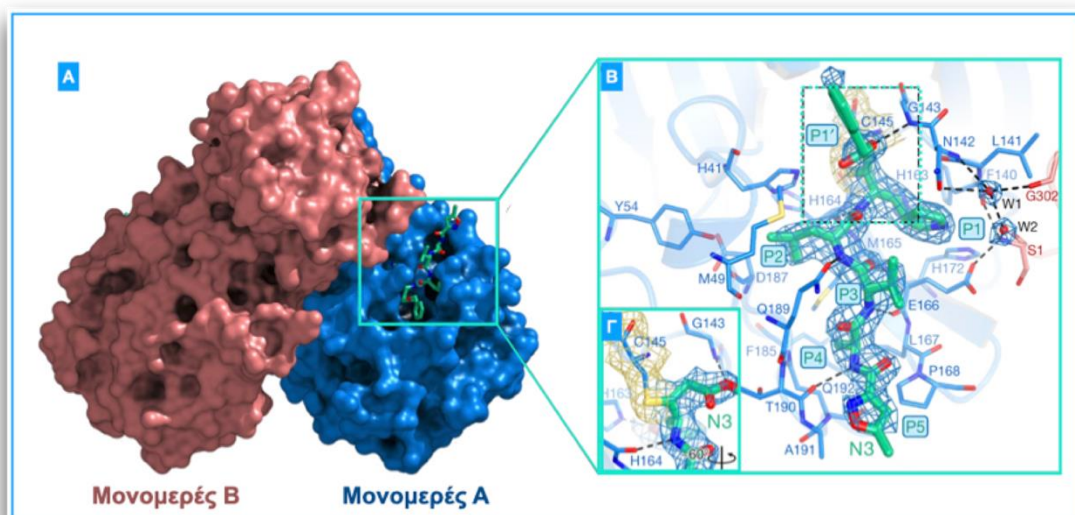
αναστολέα 13b, τα άτομα άνθρακα απεικονίζονται με μωβ απόχρωση, εκτός από εκείνα εντός του δακτυλίου πυριδόνης, τα οποία αναπαρίστανται με μαύρο χρώμα. Τα άτομα οξυγόνου έχουν κόκκινο χρώμα, τα άτομα αζώτου μπλε και τα άτομα θείου κίτρινο. Με ανοιχτό πράσινο συμβολίζονται τα S1, S2, S3 και S4, που δηλώνουν τους κανονικούς θύλακες δέσμευσης που αντιστοιχούν στα τμήματα P1, P2, P3 και P4 (που εμφανίζονται με ανοιχτά μπλε σύμβολα) του πεπτιδομιμητικού αναστολέα. Οι δεσμοί υδρογόνου αντιπροσωπεύονται οπτικά με διακεκομμένες κόκκινες γραμμές.

Συγκεκριμένα, ενώ οι φαρμακοκινητικές βελτιώσεις από το 11r στο 13a απέδωσαν ένα πιο ευνοϊκό προφίλ φαρμάκου, ορισμένες ανασταλτικές δραστηριότητες κατά της Mpro επηρεάστηκαν αρνητικά από τις δομικές αλλαγές [86]. Τα ανωτέρω ευρήματα υπογραμμίζουν την ανάγκη προσεκτικού σχεδιασμού των υποψηφίων φαρμάκων, λαμβάνοντας υπόψη την περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ δομικών τροποποιήσεων και ανασταλτικής αποτελεσματικότητας.

Το 2020, η μελέτη των Jin *et al.* παρείχε μια εικόνα για τη διαμόρφωση της Mpro του SARS-CoV-2 σε συνδυασμό με τον αναστολέα N3 [47]. Τα ευρήματά τους αποκάλυψαν την τοποθέτηση του N3 εντός του θύλακα της περιοχής σύνδεσης του υποστρώματος (Εικόνα 7). Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση μεταξύ N3 και Mpro χαρακτηρίζεται από το άτομο Sγ της Cys145 στο πρωτομερές A που σχηματίζει έναν ομοιοπολικό δεσμό με το άτομο Cβ της βινυλικής ομάδας. Το τμήμα λακτάμης P1 εκτείνεται στον υποτομέα S1, δημιουργώντας έναν δεσμό υδρογόνου με το His163 στο μονομερές A. Ταυτόχρονα, η πλευρική αλυσίδα της λευκίνης στη θέση P2 διεισδύει βαθιά στον υδρόφοβο υποτομέα S2. Περαιτέρω, η εκτεθειμένη σε διαλύτη πλευρική αλυσίδα της βαλίνης στο P3 και η πλευρική αλυσίδα της αλανίνης στο P4 καλύπτονται από τις πλευρικές αλυσίδες και τις κύριες αλυσίδες του μονομερούς A. Επιπλέον, το P5 αναπτύσσει επαφές με την Pro168 του μονομερούς A και με τα αμινοξέα 190-191 κατά μήκος της ραχοκοκαλιάς. Η παραπάνω περιγραφή παρουσιάζει τον ειδικό μηχανισμό δέσμησης του N3, υπογραμμισμένο από πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα του θύλακα πρόσδεσης υποστρώματος. Στη συνέχεια, το N3 ασκεί μια μη αναστρέψιμη αδρανοποίηση δύο σταδίων της Mpro, επηρεάζοντας τη φαρμακοκινητική του ενζύμου. Επίσης, η μελέτη των Jin *et al.* κατέδειξε τη συγγένεια του carmofur, ενός



αντινεοπλασματικού φαρμάκου, για την καταλυτική δυάδα Cys145-His41 της Mpro, με εξαιρετικά υποσχόμενη την *in vitro* αναστολή της αναπαραγωγής του ιού [87].



**Εικόνα 7. Α.** Απεικονίζεται η επιφάνεια της ομοδιμερούς Mpro, με το μονομερές A να παριστάνεται με μπλε και το μονομερές B με κόκκινο. Η δομή του αναστολέα N3 απεικονίζεται με πράσινο χρώμα. **Β.** Μια πιο προσεκτική εξέταση του θύλακα που δεσμεύει το υποστρώμα αποκαλύπτει σημαντικά αμινοξέα του θύλακα σύνδεσης, οι δύο κόκκινες σφαίρες υποδηλώνουν δυο μόρια ύδατος (W1 και W2). Υποδεικνύονται οι θέσεις των περιοχών P1, P1', P2, P3, P4 και P5 του N3. Η πρόσδεση του αναστολέα ενισχύεται από δεσμούς υδρογόνου, που απεικονίζονται με μαύρες διακεκομμένες γραμμές. **Γ.** Ο ομοιοπολικός δεσμός C-S [47].

Στη μελέτη τους, οι Dai *et al.* σχεδίασαν δύο φάρμακα (11a και 11b), τα οποία στοχεύουν στην Mpro του κορονοϊού, τονίζοντας τη σημασία των δομικών και λειτουργικών εκτιμήσεων για τη δημιουργία ισχυρών αναστολέων με βάση τη διαμόρφωση της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος [88]. Η αποτελεσματικότητα αυτών των δύο φαρμάκων ως εξαιρετικών κύριων αναστολέων της πρωτεάσης, ικανών να εμποδίσουν τη μόλυνση από τον SARS-CoV-2, έχει τεκμηριωθεί. Η σύνθετη κρυσταλλική δομή αποκάλυψε την ομοιοπολική αλληλεπίδραση της ομάδας αλδεΐδης, και στα δύο φάρμακα, με την Cys145, επιδεικνύοντας ευνοϊκές *in vivo* φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Η αντιική ισχύς των δυο φαρμάκων εξαρτιόταν από την ομοιοπολική αγκύρωσή τους στη θειόλη ενός αμινοξέος κυστεΐνης εντός του υποτομέα S1' του θύλακα

που δεσμεύει το υπόστρωμα. Στην περίπτωση του 11a σχηματίστηκε ένας ομοιοπολικός δεσμός C-S, μεταξύ του ατόμου άνθρακα της ομάδας αλδεΐδης και της Cys145 της Mpro. Ομοίως, το 11b παρουσίασε έναν συγκρίσιμο τρόπο ανασταλτικής δέσμωσης με το 11a, με μόνο μια μικρή απόκλιση που πιθανώς αποδίδεται στην ομάδα 3-φθοροφαινυλίου του P2 στο 11b, προκαλώντας μια περιστροφή προς τα κάτω. Συγκεκριμένα, το άτομο οξυγόνου εντός της ομάδας αλδεΐδης του 11a συνέβαλε στη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης του φαρμάκου μέσω ενός δεσμού υδρογόνου με τη ραχοκοκαλιά της Cys145 στον υποτομέα S1', ενώ ο δακτύλιος του (S)- $\gamma$ -λακτάμης στο P1 καταλάμβανε ισχυρά τον υποτομέα S1. Με αυτό τον τρόπο, οι συγγραφείς διευκρίνισαν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των στρατηγικά τροποποιημένων φαρμάκων σε σχετικές θέσεις (P1, P2, P3, P4 ή P5) μέσω δομικών και λειτουργικών επεξηγήσεων.

Έχει τεκμηριωθεί ότι η βαΐκελαΐνη (Baicalein) παρουσιάζει έναν διαφορετικό τρόπο δέσμωσης με την Mpro, αποκλίνοντας από τις άμεσες αλληλεπιδράσεις τα 12 διαφορετικά αμινοξέα που βρίσκονται στις κύριες πρωτεάσες SARS-CoV και SARS-CoV-2 [89]. Η πρόσδεση του Baicalein στην ενεργή περιοχή περιλαμβάνει τους υποτομείς S1 και S2, με την παρουσία ενός δικτύου πολλαπλών δεσμών υδρογόνου. Συγκεκριμένα, τρεις φαινολικές υδροξυλομάδες του προσδέτη σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Leu141 και Gly143 εντός των κύριων αλυσίδων, παράλληλα με τα αμινοξέα Ser144 και His163 εντός των πλευρικών αλυσίδων. Η ομάδα καρβονυλίου συνδέεται με την κύρια αλυσίδα του αμινοξέος Glu166 μέσω δεσμών υδρογόνου, ενώ η ομάδα φαινυλίου ενσωματώνεται στον υπο-θύλακα του S2, όπου εξασκεί υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Gln189, Arg188, Met49, Cys44 και His41. Επιπλέον, ο αρωματικός δακτύλιος της βαΐκελαΐνης δημιουργεί αλληλεπιδράσεις s-π με την His41 και π-π με την Cys145, συμβάλλοντας στον τρόπο πρόσδεσής του.

Οι Jain και Mujwar μέσω μελέτης προσομοίωσης αποδείξαν ότι η μετοκουρίνη (Metocurine), ένας παράγοντας νευρομυϊκού αποκλεισμού, δεσμεύεται ειδικά εντός της περιοχής πρόσδεσης της πρωτεάσης [90]. Αυτή η πρόσδεση χαρακτηρίζεται από τις αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Phe140, Leu141, Cys145, His163, His164, Met165, Glu166, Leu167 και Pro168. Αυτά τα

ευρήματα υποδηλώνουν την πιθανή επαναχρησιμοποίηση του Metocurine ως ένα εξαιρετικά υποσχόμενο, ασφαλές και αποτελεσματικό υποψήφιο φάρμακο.

Μια πρόσφατη υπολογιστική μελέτη από τους Ahamad *et al.* εξέτασε πληθώρα ενώσεων που σχετίζονται με την ελονοσία ως πιθανούς αναστολείς της Mpro [91]. Ωστόσο, παραμένει αβέβαιο εάν αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν πειραματικά ή κλινικά ανασταλτικά αποτελέσματα.

Μια άλλη κατηγορία φαρμάκων που έχει μελετηθεί για επαναχρησιμοποίηση είναι αναστολείς της πρωτεάσης του HIV. Η λοπιναβίρη (lopinavir) και η ριτοναβίρη (ritonavir) έχουν δείξει δυνατότητα δέσμωσης και αναστολής τόσο της Mpro του SARS-CoV [92] όσο και του SARS-CoV-2, εμφανίζοντας πολλά υποσχόμενα αντιικά αποτελέσματα [93]. Παρά ταύτα, μια αντικρουόμενη μελέτη αποκάλυψε ότι αυτά τα φάρμακα ήταν αναποτελεσματικά στην αναστολή της Mpro του SARS-CoV-2 [94]. Επιπλέον, η αναποτελεσματικότητά τους διαπιστώθηκε και σε μια κλινική δοκιμή που αφορούσε ασθενείς με σοβαρή COVID-19 [95] καθώς εμφάνισαν τοξικότητα στη θεραπεία της πνευμονίας που σχετίζεται με τον COVID-19 [96].

Τα φυσικά προϊόντα προέρχονται από διάφορες φυτικές, θαλάσσιες και μικροβιακές πηγές. Καθώς διαθέτουν ποικίλες χημικές δομές και βιολογικές δραστηριότητες, καθίστανται ως ελκυστικά υποψήφια ενώσεις για την αναστολή της ενζυμικής δράσης της Mpro. Αρκετές μελέτες έχουν εντοπίσει διάφορα φυσικά προϊόντα με πιθανές ανασταλτικές επιδράσεις στην Mpro, καθώς παρουσιάζουν μια σειρά μηχανισμών, όπως σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ακόμη και ομοιοπολικούς δεσμούς με κρίσιμα αμινοξέα εντός της ενεργού περιοχής πρόσδεσης [97][98][99][100]. Ανάλυση των φυσικών προϊόντων θα πραγματοποιηθεί σε επόμενο Κεφάλαιο.

## **2.4 Η Πρωτεΐνη Ακίδα**

Η Πρωτεΐνη Ακίδα (Spike Protein, S) του ιού SARS-CoV-2 έχει συγκεντρώσει έντονη προσοχή ως πρωταρχικός στόχος για τον σχεδιασμό φαρμάκων στη μάχη κατά της COVID-19. Αυτή η γλυκοπρωτεΐνη διαδραματίζει πρωταγωνιστικό ρόλο στην είσοδο του ιού δεσμεύοντας τον υποδοχέα του Μεταρρεπτικού Ενζύμου της Αγγειοτασίνης 2 (ACE2) στα κύτταρα ξενιστές. Η αναστολή αυτής της αλληλεπίδρασης προσφέρει μια πολύπλευρη προσέγγιση

για την καταπολέμηση του ιού. Συγκεκριμένα, η διακοπή της δέσμευσης της πρωτεΐνης S-ACE2 μπορεί να αποτρέψει αποτελεσματικά την είσοδο του ιού, περιορίζοντας ενδεχομένως την εξάπλωση της μόλυνσης. Η κοινή μηχανιστική οδός μεταξύ των κορονοϊών υπογραμμίζει τον ευρύ αντίκτυπο της στόχευσης της πρωτεΐνης S, παρέχοντας ένα στρατηγικό πλεονέκτημα έναντι των υπάρχοντων και των αναδυόμενων στελεχών. Επιπλέον, η παρέμβαση σε αυτό το στάδιο θα μπορούσε να οδηγήσει στη μείωση του ιικού φορτίου, τη βελτίωση της σοβαρότητας της νόσου και της δυναμικής μετάδοσης. Πέρα από την άμεση επιρροή της στη μόλυνση, η πρωτεΐνη S ενεργοποιεί την ανοσολογική απόκριση, καθιστώντας την ένα κρίσιμο συστατικό για την ανάπτυξη εμβολίων και άλλων θεραπευτικών φαρμάκων. Η πρόοδος στη Δομική Βιολογία και τις Υπολογιστικές Μεθόδους επιτρέπουν τον ακριβή σχεδιασμό φαρμάκων, ενισχύοντας την πιθανότητα επιτυχούς παρέμβασης. Συμπερασματικά, το σκεπτικό για τον σχεδιασμό φαρμάκων με τη στόχευση της πρωτεΐνης S έγκειται στον κεντρικό της ρόλο, τη θεραπευτική ευελιξία, αλλά και τη συνεργιστική του δράση με υπάρχουσες θεραπείες, υπόσχοντας τον μετριασμό της τρέχουσας πανδημίας και ενισχύοντας την παγκόσμια ετοιμότητα για μελλοντικές ιογενείς προκλήσεις.

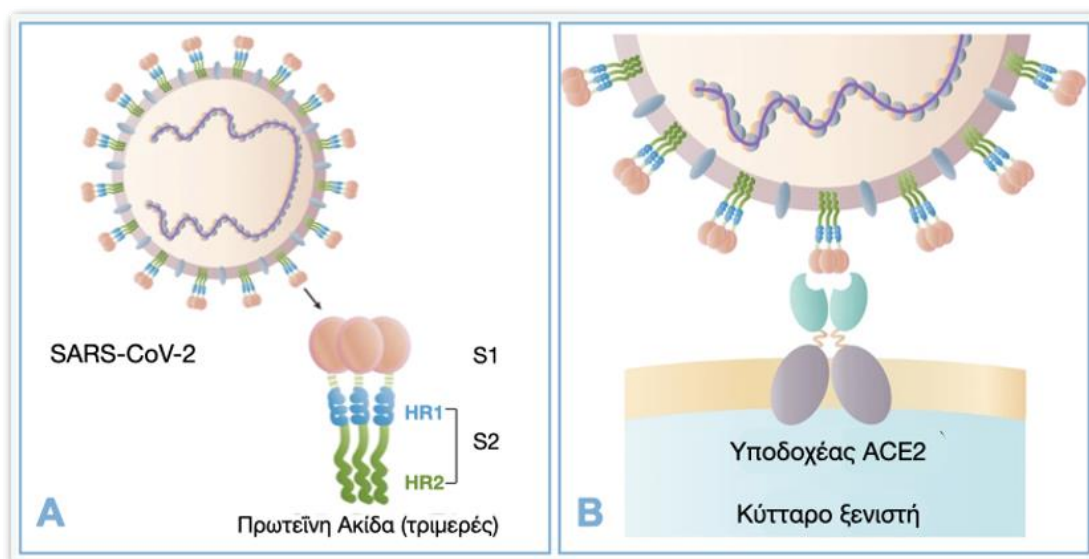
#### **2.4.1 Η δομή της Πρωτεΐνης Ακίδας**

Η τριμερής δομή της πρωτεΐνης S περιλαμβάνει ένα εξωκυτταρικό N-τελικό άκρο, ένα διαμεμβρανικό τμήμα (Transmembrane, TM) αγκυρωμένο εντός της ιικής μεμβράνης και ένα μικρό ενδοκυτταρικό C-τελικό άκρο [101]. Τυπικά σε μια μετασταθερή, διάχυτη κατάσταση, η πρωτεΐνη S υφίσταται σημαντικές δομικές αναδιατάξεις κατά την επαφή με ένα κύτταρο ξενιστή, διευκολύνοντας τη σύντηξη μεμβράνης ιού-κυττάρου. Η πρωτεΐνη S είναι καλυμμένη με μόρια πολυσακχαρίτη, διαφεύγοντας με αυτό τον τρόπο το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή κατά την είσοδο [102].

Αναλυτικότερα, το συνολικό μήκος της πρωτεΐνης S του ιού SARS-CoV-2 είναι 1273 αμινοξέα και αποτελείται από: (i) ένα πεπτίδιο σήματος (αμινοξέα 1-13) στο N-άκρο, (ii) την υπομονάδα S1 (14-685 αμινοξέα), και (iii) την υπομονάδα

S2 (686- 1273 αμινοξέα), με τις S1 και S2 να είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση του υποδοχέα και τη σύντηξη μεμβράνης [103].

Η υπομονάδα S1 περιέχει μια N-τερματική περιοχή (14-305 αμινοξέα) και μια περιοχή δέσμευσης υποδοχέα (RBD, 319-541 αμινοξέα). Η υπομονάδα S2 περιλαμβάνει το πεπτιδίο σύντηξης (Fusion Peptide, FP) (788-806 αμινοξέα), την αλληλουχία επανάληψης επταπεπτιδίου 1 (Heptapeptide Repeat Sequence, HR1) (912-984 αμινοξέα), την αλληλουχία επανάληψης επταπεπτιδίου 2, HR2 (1163-1213 αμινοξέα), τη διαμεμβρανική (TM) περιοχή (1213-1237 αμινοξέα), και τέλος την κυτταροπλασματική περιοχή (cytoplasmic domain, CT) (1237-1273 αμινοξέα) [13]. Οι υπομονάδες S1 και S2 δημιουργούν τις βολβώδεις περιοχές της κεφαλής και του μίσχου με βάση την αρχιτεκτονική των μονομερών πρωτεΐνης S του κορονοϊού (Εικόνα 8A) [104].



**Εικόνα 8. Α. Η σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης Ακίδας. Β. Η πρωτεΐνη Ακίδα συνδέεται με το ACE2 ώστε να εισέλθει ο ιός SARS-CoV-2 στο κύτταρο του ξενιστή.**

Η δομή της τριμερούς πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία μικροσκοπία σε ατομικό επίπεδο, αποκαλύπτοντας διάφορες διαμορφώσεις RBD σε ανοιχτές και κλειστές καταστάσεις και τις αντίστοιχες λειτουργίες τους [105][23]. Στη φυσική της μορφή, η πρωτεΐνη S των κορονοϊών (CoVs) παραμένει αδρανής. Οι κυτταρικές πρωτεάσες την ενεργοποιούν κατά

τη διάρκεια της ιογενούς μόλυνσης, διασπώντας την σε υπομονάδες S1 και S2 [106]. Αυτή η διάσπαση εκτός του ότι ενεργοποιεί την πρωτεΐνη, ενεργοποιεί και τον τομέα σύντηξης της μεμβράνης μετά την είσοδο του ιού στα κύτταρα στόχους [106]. Όπως και σε άλλους κορονοϊούς, η πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 διασπάται σε υπομονάδες S1 και S2 από κυτταρικές πρωτεάσες, με την πρωτεάση TMPRSS2 να δρα ως εκκινήτης, ωστόσο η συγκεκριμένη θέση διάσπασης για τον ιό SARS-CoV-2 S δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί [106].

#### **2.4.1.1 Η δομή της υπομονάδας S1**

Η είσοδος του ιού ξεκινά με τη δέσμευση ιικών σωματιδίων σε κυτταρικούς υποδοχείς στην επιφάνεια του κυτάρου ξενιστή, σηματοδοτώντας την έναρξη της μόλυνσης. Αυτό το βήμα αναγνώρισης υποδοχέα είναι ζωτικής σημασίας για την είσοδο του ιού, αποτελώντας έναν ελκυστικό στόχο για τον σχεδιασμό φαρμάκων.

Η περιοχή δέσμευσης υποδοχέα (Receptor Binding Domain, RBD) εντοπίζεται στην υπομονάδα S1 της πρωτεΐνης S, και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα ACE2 των κυττάρων του ξενιστή (Εικόνα 8B). Εντός της περιοχής S1, υπάρχουν τόσο ο N-τερματικός τομέας (N-Terminal Domain, NTD) όσο και ο C-τερματικός τομέας (C-Terminal Domain, CTD), όπου οι ατομικές λεπτομέρειες στη διεπαφή δέσμευσης καταδεικνύουν αντικαταστάσεις βασικών αμινοξέων στο CTD του SARS-CoV-2. Συγκεκριμένα, η διεπαφή δέσμευσης του CTD της S του SARS-CoV-2 δημιουργεί μια πιο εκτεταμένη αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ACE2 σε σύγκριση με το RBD του SARS-CoV, που περιλαμβάνει περισσότερα αλληλεπιδρώντα αμινοξέα (21 έναντι 17) και μεγαλύτερη θαμμένη επιφάνεια. Οι μεταλλάξεις κρίσιμων αμινοξέων, όπως οι F486 και E484, στον ιό SARS-CoV-2, προωθούν ισχυρότερες αρωματικές-αρωματικές και ιοντικές αλληλεπιδράσεις με το ACE2, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, αυτές οι αλλαγές συμβάλλουν σε υψηλότερη συγγένεια για τη δέσμευση υποδοχέα στο SARS-CoV-2 σε σύγκριση με τον SARS-CoV [23][107][105].

Η περιοχή RBD είναι υψίστης σημασίας για την εξουδετέρωση των αντισωμάτων (neutralizing antibodies, nAbs). Ενώ οι RBD των SARS-CoV-2 και SARS-CoV μοιράζονται περίπου 73%-76% ομοιότητα αλληλουχίας, τα

κρίσιμα αμινοξέα που έρχονται σε επαφή με το ACE2 παραμένουν διατηρημένα. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου τα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού (monoclonal antibodies, mAbs) και τα πολυκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν το RBD του SARS αποτυγχάνουν να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2, αποκαλύπτοντας διαφορές αντιγονικότητας μεταξύ των δύο. Ομοίως, ειδικά αντισώματα RBD του SARS-CoV ήταν αναποτελεσματικά στον αποκλεισμό της μόλυνσης, η οποία προκαλείται από την πρωτεΐνη S του SL-CoV-SHC014. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η RBD της S1 ενδέχεται να μην είναι ο καταλληλότερος στόχος φαρμάκου λόγω της εξελισσόμενης φύσης των φαρμάκων ευρέως φάσματος κατά του CoV, δεδομένου του χαρακτηριστικού της υψηλής μεταβλητότητας [107][108].

#### **2.4.1.2 Η δομή της υπομονάδας S2**

Η υπομονάδα S2 διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη σύντηξη και την είσοδο του ιού. Περιλαμβάνει: (i) το πεπτιδίο σύντηξης (FP), (ii) τις περιοχές επανάληψης επταπεπτιδίου HR1 και HR2, (iii) τον διαμεμβρανικό τομέα (TM), και (iv) τη σύντηξη κυτταροπλασματικής περιοχής (CT).

Το FP, ένα πεπτιδίο 15-20 αμινοξέων, περιέχει διατηρημένα υδρόφοβα αμινοξέα (π.χ. γλυκίνης ή αλανίνης) που αγκυρώνουν την πρωτεΐνη S στη μεμβράνη-στόχο. Διαταράσσοντας και συνδέοντας διπλές στοιβάδες λιπιδικής μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή, η FP είναι ζωτικής σημασίας στη διαμεσολάβηση της σύντηξης της μεμβράνης [109].

Τα HR1 και HR2 περιλαμβάνουν μια αλληλουχία επανάληψης επταπεπτιδίου: His-Pro-Pro-His-Cys-Pro-Cys, όπου η ιστιδίνη αντιπροσωπεύει υδρόφοβα/ογκώδη αμινοξέα, η προλίνη υποδηλώνει πολικά/υδρόφιλα αμινοξέα και η κυστεΐνη αντιπροσωπεύει φορτισμένα αμινοξέα. Μαζί, το HR1 και το HR2 σχηματίζουν τη δομή των έξι ελικοειδών δεσμίδων (6-HB) [103]. Το HR1 εντοπίζεται στο C-άκρο του υδρόφοβου FP, ενώ το HR2 βρίσκεται στο N-άκρο της περιοχής TM (Transmembrane, TM). Η περιοχή TM ασφαρίζει την πρωτεΐνη S στην ιική μεμβράνη και η υπομονάδα S2 ολοκληρώνεται με μια ουρά κυτταροπλασματικής περιοχής [104].

Η διαμορφωτική αλλαγή της S2, που προκλήθηκε από τη δέσμευση της RBD στο ACE2, οδηγεί σε είσοδο της FP στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου, και μέσω αλληλεπίδρασης με το HR2 σχηματίζεται η δομή 6-HB. Με απόρροια, την εγγύτητα του ιικού φακέλου και της κυτταρικής μεμβράνης, διευκολύνεται η σύντηξη και η είσοδος του ιού [110]. Το HR1 συναρμολογείται σε ένα ομοτριμερές εκθέτοντας τις υδρόφοβες αυλακώσεις που δεσμεύουν το HR2. Το HR2, ένα μείγμα άκαμπτης έλικας και εύκαμπτου βρόχου, αλληλεπιδρά με το HR1. Οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ HR1 και HR2 σχηματίζουν την «περιοχή του πυρήνα σύντηξης» εντός της διαμόρφωσης φουρκέτας μετά τη σύντηξη των CoVs.

Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι η ανακάλυψη θεραπευτικών φαρμάκων στοχεύει πρωτίστως στην περιοχή επανάληψης. Η πρωτεΐνη ακίδα, αν και κρίσιμη, θέτει προκλήσεις λόγω της μεταβλητής περιοχής S1 RBD της για ευρέως φάσματος αντιϊικούς αναστολείς. Αντίθετα, η διατηρημένη περιοχή HR εντός της υπομονάδας S2, που διέπει τις λοιμώξεις από τον ιό HCoV (Human Coronavirus), προσφέρει δυνατότητες. Συνθετικά πεπτίδια που προέρχονται από συντηρημένες περιοχές της ιικής πρωτεΐνης παρουσιάζουν αντιική αποτελεσματικότητα. Τα πεπτίδια από τα τμήματα HR2 της ιικής πρωτεΐνης σύντηξης κατηγορίας I συνδέονται ανταγωνιστικά με τον HR1 του ιού, εμποδίζοντας την ιογενή μόλυνση. Έτσι, το HR1 αναδύεται ως ένας πολλά υποσχόμενος στόχος για αναστολείς σύντηξης κατά του SARS-CoV-2 [111][112][113].

#### **2.4.2 Η λειτουργία της Πρωτεΐνης Ακίδας**

Η επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται από τη δομική πρωτεΐνη S, έναν βασικό παράγοντα στη μόλυνση. Ως τριμερής διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη κατηγορίας I, επιτρέπει την είσοδο του ιού και αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό σε διάφορους ιούς HCoVs, συμπεριλαμβανομένου του HIV (HIV γλυκοπρωτεΐνη 160, Env), του ιού της γρίπης (αιμοσυγκολλητίνης γρίπης, HA) [114]. Όπως και σε άλλους κορονοϊούς, η πρωτεΐνη S SARS-CoV-2 διευκολύνει την αναγνώριση των υποδοχέων, την προσκόλληση των κυττάρων και τη σύντηξη κατά τη διάρκεια της ιογενούς μόλυνσης [23][107] [115].



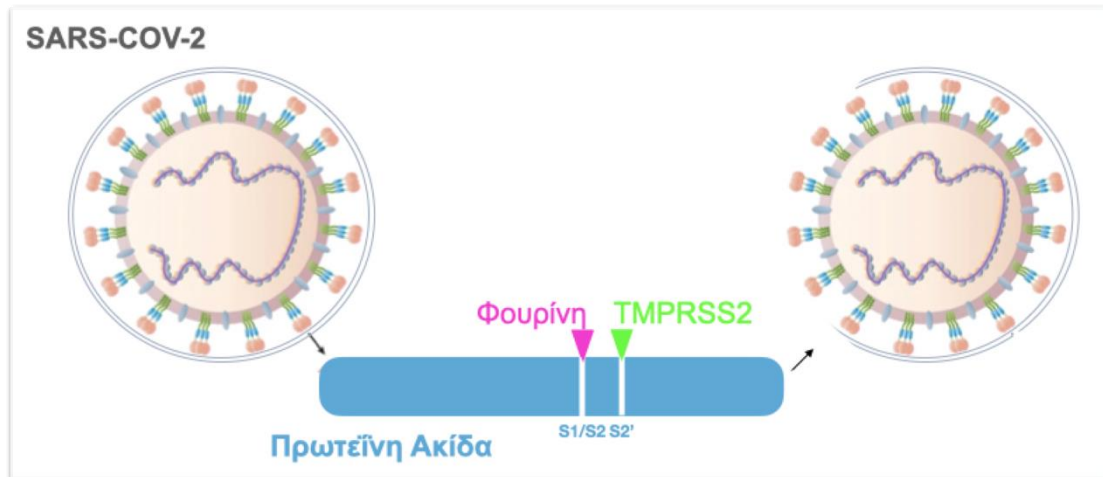
Η επιφάνεια του ιικού φακέλου φιλοξενεί μια τριμερή μονάδα πρωτεΐνης S, θεμελιώδη για τη δέσμευση με τον υποδοχέα [71]. Μέσα σε αυτή τη δομή, ο τομέας S1 περιέχει τον τομέα δέσμευσης υποδοχέα (RBD), ο οποίος είναι καθοριστικός για την αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα, ενώ ο τομέας S2 περιέχει κυρίως τον τομέα HR, συμπεριλαμβανομένων των HR1 και HR2, ο οποίος σχετίζεται στενά με τη σύντηξη του ιού [116].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2 και των κυττάρων-ξενιστών περιλαμβάνει την αναγνώριση του υποδοχέα ACE2 [115]. Το ACE2, ένα ομόλογο του ACE, χρησιμεύει στη μετατροπή της Αγγειοτασίνης I σε Αγγειοτασίνη 1-9 καθώς και της Αγγειοτασίνης II σε Αγγειοτασίνη 1-7 στο Σύστημα Ρενίνης – Αγγειοτασίνης (Renin - Angiotensin System, RAS) [117]. Κατανέμεται κυρίως σε όργανα όπως οι πνεύμονες, το έντερο, η καρδιά και οι νεφροί, με τα επιθηλιακά κύτταρα τύπου II να είναι τα κύρια κύτταρα έκφρασης [118]. Επίσης, το ACE2 λειτουργεί ως υποδοχέας για τον SARS-CoV-2. Στην περίπτωση του SARS-CoV-2, η υπομονάδα S1 της πρωτεΐνης S του αλληλεπιδρά με το ACE2, οδηγώντας σε σχηματισμό ενδοσωμάτων, με επακόλουθη την ιική σύντηξη υπό συνθήκες χαμηλού pH [119]. Η εν λόγω αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης S και του ACE2 είναι χρήσιμη για τον εντοπισμό ενδιάμεσων ξενιστών για το SARS-CoV-2, καθώς ο υποδοχέας ACE2 διατηρεί μια πρωτογενή δομή σε διάφορα είδη όπως αμφίβια, πτηνά και θηλαστικά [120].

Η πρωτεΐνη S εμπλέκεται με το ACE2 μέσω της περιοχής RBD εντός της υπομονάδας S1, διευκολύνοντας την προσκόλληση του ιού στα κύτταρα ξενιστές ως τριμερής οντότητα [105]. Η συγγένεια δέσμευσης μεταξύ του SARS-CoV-2 S και του ανθρώπινου ACE2 χαρακτηρίζεται από σταθερά διάστασης (dissociation constant,  $K_D$ ) με τιμή 14,7 nM, ενώ για τον SARS-CoV η τιμή  $K_D$  υπολογίζεται στα 325,8 nM [105]. Αυτό σημαίνει ότι η πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία στο ACE2 σε σύγκριση με την πρωτεΐνη S του ιού SARS-CoV. Οι αναλύσεις των πρωτεϊνών SARS-CoV-2 έχουν αποκαλύψει περίπου 24% ανομοιότητα στην πρωτεΐνη S σε σύγκριση με το SARS-CoV, ενώ η απόκλιση στην περιοχή RBD είναι περίπου 23% [121].

Μια ακόμα λειτουργία που συμμετέχει η πρωτεΐνη S είναι η σύντηξη. Η σύντηξη των υποδηλώνει τη συγχώνευση της ιικής μεμβράνης με τη μεμβράνη του

κυττάρου ξενιστή, διευκολύνοντας την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κύτταρο ξενιστή. Η σύντηξη υποστηρίζεται από τη διάσπαση των υπομονάδων S1 και S2 του SARS-CoV-2. Οι πρωτεάσες του ξενιστή διασπούν την πρωτεΐνη S σε διακριτές υπομονάδες S1 και S2, οι οποίες παραμένουν σε μη ομοιοπολική κατάσταση μέχρι να πραγματοποιηθεί η σύντηξη [122]. Πιο συγκεκριμένα, μια ειδική θέση διάσπασης φουρίνης εντοπίζεται μόνο στον SARS-CoV-2 (Εικόνα 9) [123][124]. Η διαταραχή αυτής της θέσης διάσπασης μέσω μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα τη μη διάσπαση της πρωτεΐνης S του SARS-CoV-2. Η παρουσία πολλαπλών θέσεων διάσπασης φουρίνης στην πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 ενισχύει την ευαισθησία της στη διάσπαση από πρωτεάσες που μοιάζουν με φουρίνη, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τη μολυσματικότητα [125][126]. Μια συγκρίσιμη περιοχή διάσπασης που μοιάζει με αυτή της φουρίνης είναι εμφανής και σε άλλους ιούς γρίπης υψηλής παθογένειας (π.χ. *influenza A*), επηρεάζοντας την παθογένειά τους, όπως παρατηρήθηκε στο ξέσπασμα της γρίπης των πτηνών το 1997 στο Χονγκ Κονγκ [127]. Επιπλέον, οι πρωτεάσες του κυττάρου ξενιστή όπως το TMPRSS2 διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εκκίνηση της πρωτεΐνης S, μια διαδικασία που επίσης παρατηρείται στον SARS-CoV, αλλά και στην είσοδο του ιού της γρίπης A (Εικόνα 9) [106][128][129]. Συνοψίζοντας, τόσο ο SARS-CoV-2 όσο και ο SARS-CoV βασίζονται σε πρωτεάσες των κυττάρων-ξενιστών για να διευκολύνουν τη διάσπαση της πρωτεΐνης S, μια ομοιότητα που υπογραμμίζεται από τη συγκρίσιμη δομή της πρωτεΐνης S τους. Η χαρακτηριστική θέση διάσπασης της φουρίνης στο SARS-CoV-2 S ενδέχεται να συμβάλει στην αυξημένη μεταδοτικότητά του σε σύγκριση με τον ιό SARS-CoV.



**Εικόνα 9.** Η πρωτεΐνη S διασπάται σε δύο θέσεις, S1/S2 και S2', ώστε να πυροδοτήσει τη σύντηξη ιικών και κυτταρικών μεμβρανών κατά την είσοδο του ιού για την απελευθέρωση του γονιδιώματός του στο κύτταρο ξενιστή. Η διάσπαση της πρωτεΐνης S πιστεύεται ότι συμβαίνει διαδοχικά, με τη διάσπαση στη θέση S1/S2 να εμφανίζεται πρώτη και την ακολουθεί η διάσπαση στη θέση S2'. Η φουρίνη ευθύνεται για τη διάσπαση στη θέση S1/S2, ενώ η TMPRSS2 για τη διάσπαση στη θέση S2'.

Κρίσιμο στάδιο της ιικής σύντηξης είναι ο σχηματισμός της δέσμης έξι ελίκων (6-HB). Απαραίτητο για αυτή τη διαδικασία είναι το πεπτιδίο σύντηξης (FP) στο N-άκρο του SARS-CoV-2 και στους δύο τομείς HR εντός του S2 [130]. Η διάσπαση της πρωτεΐνης S εκθέτει το FP, προκαλώντας την έναρξη της ιικής σύντηξης. Πυροδοτούμενη από ειδικούς προσδέτες, το πεπτιδίο σύντηξης υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές, έπειτα εισάγεται στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή [131]. Μέσω της σύγκλιση μειώνεται η απόσταση μεταξύ των μεμβρανών του ιού και του κυττάρου ξενιστή, τοποθετώντας την περιοχή HR1 κοντά στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, ενώ το HR2 πλησιάζει την ιική μεμβράνη. Ακολούθως, δημιουργείται μια δομή έξι ελίκων στον πυρήνα σύντηξης. Αυτή η συντονισμένη δράση έλκει την ιική μεμβράνη προς τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, προκαλώντας ισχυρή σύντηξη των δύο μεμβρανών [132].

#### 2.4.2.1 Η Φουρίνη

Η φουρίνη είναι ένα ένζυμο κυτταρικής πρωτεάσης, το οποίο εμπλέκεται στη διάσπαση διαφόρων πρωτεϊνών και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην

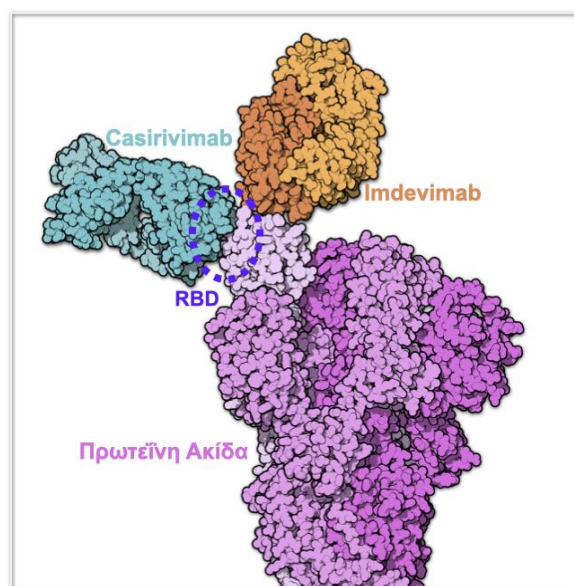
ενεργοποίηση ορισμένων ιικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της μόλυνσης [125][133][134]. Η παρουσία μιας θέσης διάσπασης φουρίνης στην πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 έχει εγείρει ερωτήματα σχετικά με τον πιθανό αντίκτυπό της στη μολυσματικότητα, τη μεταδοτικότητα αλλά και την παθογένεια του ιού. Η θέση διάσπασης της φουρίνης στην πρωτεΐνη S SARS-CoV-2 εντοπίζεται στο όριο μεταξύ των υπομονάδων S1 και S2, πιο συγκεκριμένα, στη θέση διάσπασης S1/S2 [125][133][134]. Αυτή η τοποθεσία διαφέρει από άλλους γνωστούς κορονοϊούς, συμπεριλαμβανομένου του SARS-CoV, όπου απουσιάζει η θέση διάσπασης φουρίνης. Τέλος, η θέση διάσπασης της φουρίνης χαρακτηρίζεται από ειδική αλληλουχία αμινοξέων [133][134].

#### **2.4.3 Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή Πρωτεΐνης Ακίδας**

Καθώς η πρωτεΐνη S διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην είσοδο του ιού, τη μόλυνση μέσω της αναγνώρισης του υποδοχέα και τη σύντηξη της μεμβράνης, η αναστολή της λειτουργίας της αποτελεί σημαντικό στόχο για τον σχεδιασμό αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών έναντι του ιού. Η Ερευνητική Κοινότητα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη αναστολέων που στοχεύουν ειδικά την πρωτεΐνη ακίδα του ιού SARS-CoV-2 με προσεγγίσεις που ποικίλλουν. Παρακάτω περιγράφονται οι σημαντικότερες αυτών.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν την πρωτεΐνη ακίδα έχουν δείξει ισχυρή εξουδετερωτική δράση κατά του SARS-CoV-2. Το Casirivimab/imdevimab, το οποίο διατίθεται στην αγορά με την επωνυμία REGEN-COV και άλλες ονομασίες, είναι ένα συνδυαστικό μονοκλωνικό φάρμακο σχεδιασμένο για τη θεραπεία και την πρόληψη του COVID-19 [135]. Την ανάπτυξη αυτού του φαρμάκου ανέλαβε η αμερικανική εταιρεία βιοτεχνολογίας Regeneron Pharmaceutical. Το συγκεκριμένο θεραπευτικό μείγμα περιλαμβάνει δύο ξεχωριστά ανθρώπινα μονοκλωνικά αντισώματα, το Casirivimab και το Imdevimab. Ο συνδυασμός τους επιβλέπει στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας, καθώς με αυτό τον τρόπο μειώνεται η πιθανότητα της αντίστασης του ιού στα αντισώματα, αφού μέσω της στόχευσης πολλαπλών θέσεων στην πρωτεΐνη ακίδα καθίσταται πιο δύσκολη η διαφυγή του ιού από την εξουδετέρωση [135]. Τα μονοκλωνικά αντισώματα στο

REGEN-COV έχουν σχεδιαστεί για να μιμούνται τη φυσική ανοσολογική απόκριση που εμφανίζεται όταν το σώμα αντιμετωπίζει έναν ιό. Το Casirivimab (REGN10933) στοχεύει συγκεκριμένα την περιοχή του δέσμευσης με τον υποδοχέα της πρωτεΐνης S (RBD), ενώ το Imdevimab (REGN10987) στοχεύει μια διαφορετική αλλά επικαλυπτόμενη περιοχή του RBD της πρωτεΐνης S (Εικόνα 10) [135]. Με την πρόσδεσή τους σε αυτές τις συγκεκριμένες θέσεις στην πρωτεΐνη S, τα μονοκλωνικά αντισώματα παρεμβαίνουν στην ικανότητα του ιού να αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα ACE2 στα ανθρώπινα κύτταρα.



**Εικόνα 10. Τα μονοκλωνικά αντισώματα Casirivimab (πετρόλ χρώμα) και Imdevimab (πορτοκαλί χρώμα) προσδεμένα στην πρωτεΐνη ακίδα του ιού SARS-CoV-2. Το Casirivimab προσδένεται στην RBD της πρωτεΐνης ακίδας, ενώ το Imdevimab, σε μια παράπλευρη περιοχή της RBD.**

Μια ακόμα θεραπεία μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι το Bamlanivimab και το Etesevimab που αναπτύχθηκαν από την Eli Lilly για τη θεραπεία της COVID-19. Μεμονωμένα, στοχεύουν σε διαφορετικές θέσεις της πρωτεΐνης ακίδας του ιού SARS-CoV-2 και όταν χρησιμοποιούνται συνδυαστικά, στοχεύουν στην ενίσχυση της εξουδετερωτικής δράσης έναντι του ιού. Πιο συγκεκριμένα, το Bamlanivimab, (LY-CoV555) στοχεύει ειδικά την περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (RBD) της πρωτεΐνης S και μέσω της πρόσδεσής του ουσιαστικά παρεμβαίνει στην αλληλεπίδραση μεταξύ του ιού και του υποδοχέα ACE2 στα ανθρώπινα κύτταρα [136][137]. Από την άλλη, το Etesevimab (LY-CoV016)

στοχεύει μια διαφορετική περιοχή της πρωτεΐνης S SARS-CoV-2, συγκεκριμένα μια τοποθεσία κοντά στο RBD [137]. Ο μηχανισμός δράσης του Etesevimab συμπληρώνει το Bamlanivimab παρέχοντας πρόσθετη εξουδετερωτική δράση έναντι του ιού. Η ταυτόχρονη σύνδεση των δύο αντισωμάτων σε διαφορετικές θέσεις στην πρωτεΐνη S αποσκοπεί στην αποτροπή της προσκόλλησης και της εισόδου του ιού μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Αυτή η συνεργική δράση έχει σκοπό να μειώσει την πιθανότητα ιικών μεταλλάξεων διαφυγής και να ενισχύσει την κλινική αποτελεσματικότητα της θεραπείας.

Το Sotrovimab (VIR-7831) είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο προέρχεται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ατόμων που έχουν αναρρώσει από την COVID-19 [138]. Αναπτύχθηκε από τη Vir Biotechnology και την GlaxoSmithKline (GSK), και έχει σχεδιαστεί για να στοχεύει την πρωτεΐνη S του ιού SARS-CoV-2 ώστε να εξουδετερώνει την ικανότητα του ιού να μολύνει τα κύτταρα-ξενιστές [138]. Κατά τη χορήγηση, το Sotrovimab προσδένεται ισχυρά στην πρωτεΐνη S του SARS-CoV-2 ώστε να μην είναι εφικτή η αλληλεπίδραση του ιού με το ACE2 στην επιφάνεια των ανθρώπινων κυττάρων και ως εκ τούτου να εξουδετερώνεται αποτελεσματικά ο ιός.

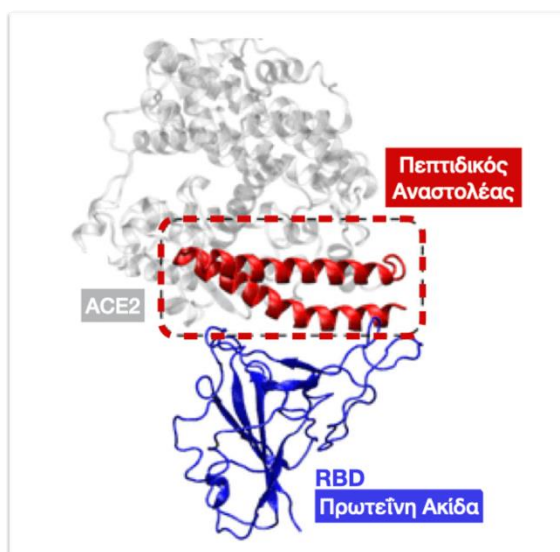
Διάφορα μικρά μόρια έχουν διερευνηθεί ως αναστολείς της πρωτεΐνης S. Οι Bojadzic *et al.* στη μελέτη τους εξέτασαν οργανικές χρωστικές ως πιθανούς μικρομοριακούς αναστολείς (Small Molecules Inhibitors, SMI) της αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2 και του ανθρώπινου ACE2, δηλαδή μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Protein Protein Interaction, PPIs) [139].

Οι Li *et al.* μέσω της δημιουργίας πλατφόρμας ελέγχου φαρμάκων κατά του κορονοϊού, η οποία χρησιμοποιεί την τεχνολογία HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorescence, HTRF) εξέτασαν δύο βιβλιοθήκες 2.864 μορίων, εστιάζοντας στην αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης ακίδας του κορονοϊού και του υποδοχέα ACE2 του ξενιστή [140]. Επιπρόσθετα, μέσω Πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης ανέλυσαν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης S και αυτών των ενώσεων, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το TS984 ξεχωρίζει ως η πιο αποτελεσματική ένωση στην πρόληψη της δέσμευσης της πρωτεΐνης S του κορονοϊού στον υποδοχέα ACE2 στα κύτταρα ξενιστές



και της μόλυνσης που περιλαμβάνει άλλους ψευδοϊούς ανθρώπινου κορονοϊού, όπως τον SARS-CoV και τον MERS-CoV. Η δομή του EK1C βασίστηκε στη δομή του EK1, προηγούμενου αναστολέα σύντηξης [103], όπου για να βελτιωθεί η ανασταλτική του δράση προστέθηκε ομοιοπολικά ένα μόριο χοληστερόλης στο C'-άκρο της αλληλουχίας του EK1 με τη βοήθεια ενός εύκαμπτου διαχωριστή (linker) πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG).

Τα πεπτίδια που βασίζονται στο ACE2 έχουν συγκεντρώσει επιστημονικό ενδιαφέρον ως δυνητικοί αναστολείς για την καταπολέμηση ιογενών λοιμώξεων, ιδιαίτερα στο πλαίσιο της εισόδου των κυττάρων ξενιστών με τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης SARS-CoV-2. Αυτά τα πεπτίδια έχουν σχεδιαστεί για να συνδέονται ανταγωνιστικά με την περιοχή σύνδεσης υποδοχέα (RBD) της πρωτεΐνης ακίδας, εμποδίζοντας αποτελεσματικά την αλληλεπίδρασή της με τον φυσικό υποδοχέα ACE2. Τα πεπτίδια που βασίζονται στο ACE2 παρασκευάζονται έτσι ώστε να μιμούνται ή να μοιάζουν με τη διεπαφή δέσμευσης του υποδοχέα ACE2, με στόχο να υπερνικήσουν τον εγγενή υποδοχέα ACE2 για σύνδεση με το RBD.



**Εικόνα 12.** Η πρόσδεση πεπτιδικού αναστολέα (κόκκινο χρώμα) με βάση το ACE2 (γκρι χρώμα) στην RBD περιοχή της πρωτεΐνης S (μπλε χρώμα) του ιού SARS-CoV-2 [143].

Οι Han και Kral στην υπολογιστική μελέτη τους σχεδίασαν πεπτιδικούς αναστολείς που βασίζονται στο ACE2 [143]. Αυτοί οι αναστολείς αποτελούνται



κυρίως από δύο διαδοχικές α-έλικες, διατεταγμένες σε διαμόρφωση δεσμίδας, που προέρχονται από την περιοχή πρωτεάσης (Protease Domain, PD) του ACE2. Αυτά τα πεππίδια έχουν σχεδιαστεί για να συνδέονται με τις περιοχές δέσμησης υποδοχέα του ιού SARS-CoV-2 (Εικόνα 12). Μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, διαπίστωσαν ότι τα εν λόγω πεππίδια διατηρούν τη δευτεροταγή δομή τους, επιτρέποντας μια εξαιρετικά σταθερή και ειδική αλληλεπίδραση δέσμησης, η οποία εμποδίζει αποτελεσματικά τη σύνδεση του ιού με τα κύτταρα ξενιστές. Επίσης, προτείνουν για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητά τους να χρησιμοποιηθεί μια προσέγγιση πολλαπλής δέσμησης, με την προσάρτηση πολλών τέτοιων πεπτιδίων στις επιφάνειες φορέων νανοσωματιδίων.

## Κεφάλαιο 3

### Ο *in silico* σχεδιασμός φαρμάκων

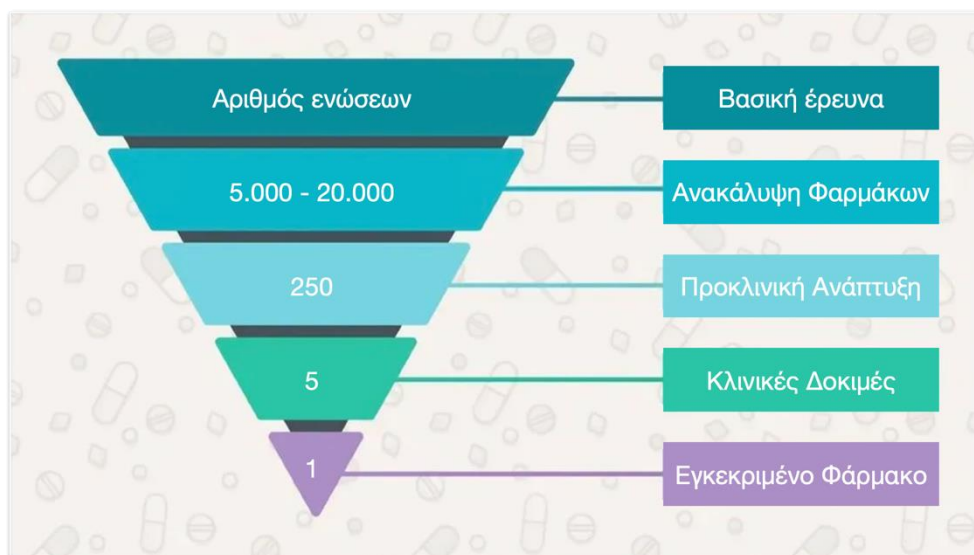
#### 3.1 Ο σχεδιασμός φαρμάκων

Ο σχεδιασμός φαρμάκων είναι ένας εξελιγμένος κλάδος της Φαρμακευτικής Επιστήμης, ο οποίος παρουσιάζει μεγάλη Ιστορία. Σημαντικές εξελίξεις έχουν επιτευχθεί σε αυτό το πεδίο από τα τέλη του 19ου αιώνα, όταν ο Emil Fischer πρότεινε την έννοια των αλληλεπιδράσεων φαρμάκου-υποδοχέα, ανάλογες με τον μηχανισμό κλειδαριάς και κλειδιού [144]. Με την πάροδο του χρόνου, ο σχεδιασμός των φαρμάκων έχει ωριμάσει σε μια συνεκτική και δομημένη επιστήμη, ενισχυμένη από μια ισχυρή θεωρητική βάση και ρεαλιστικές εφαρμογές. Επί του παρόντος, αποτελεί την προσέγγιση αιχμής για την ανακάλυψη φαρμάκων, αξιοποιώντας τις επιστημονικές και τεχνολογικές καινοτομίες, οι οποίες είναι ενσωματωμένες στο ευρύ φάσμα τεχνικών και εργαλείων του.

Ως φάρμακο χαρακτηρίζεται η χημική ουσία, η οποία εισερχόμενη στον οργανισμό επηρεάζει τις βιολογικές του διεργασίες και χρησιμοποιείται για την πρόληψη, τη διάγνωση ή τη θεραπεία ασθενειών [145]. Η προέλευση των φαρμάκων μπορεί να είναι από φυσικές πηγές ή να συντίθενται τεχνητά. Ο απώτερος στόχος του σχεδιασμού ενός φαρμάκου παραμένει σταθερός: να ανακαλυφθούν φάρμακα αποτελεσματικά, τα οποία παρουσιάζουν ειδική δράση, ασφάλεια, ελάχιστη τοξικότητα και παρενέργειες, χημική και μεταβολική σταθερότητα, δυνατότητα σύνθεσης, καθώς και διαλυτότητα τόσο στο νερό όσο και στα λιπίδια για αποτελεσματική κατανομή σε όλο το σώμα [145].

Για να επιτευχθεί η δράση τους, τα φάρμακα αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένους στόχους μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Αυτή η αλληλεπίδραση αποδίδεται σε δύο είδη: την επίδραση του φαρμάκου στον οργανισμό και την επίδραση του οργανισμού στο φάρμακο. Η πρώτη μελετάται μέσω της Φαρμακοδυναμικής, ενώ η δεύτερη μέσω της Φαρμακοκινητικής. Η Φαρμακοδυναμική εξετάζει τους μηχανισμούς του φαρμάκου, τη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης και της επίδρασης του φαρμάκου, καθώς και τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Από την άλλη,

η Φαρμακοκινητική διερευνά τον τρόπο με τον οποίο τα φάρμακα απορροφώνται, κατανέμονται, μεταβολίζονται και εκκρίνονται με την πάροδο του χρόνου — που συχνά αναφέρονται ως διεργασίες ή ιδιότητες ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion, ADME).



**Σχήμα 5. Διαδικασία ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκου.**

Η διαδικασία ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων περιλαμβάνει τρία κύρια στάδια: την ανακάλυψη φαρμάκων, την προκλινική ανάπτυξη και τις κλινικές δοκιμές (Σχήμα 5). Η ανακάλυψη ενός φαρμάκου ξεκινά με τον εντοπισμό ενός μορίου, το οποίο εμφανίζει επιθυμητή δράση σε μια δοκιμασία διαλογής (screening). Στη συνέχεια, η δομή αυτού του μορίου βελτιώνεται για να ενισχύσει τη συγγένεια, την εκλεκτικότητα, τη διαλυτότητα, τις ιδιότητες ADME και να ελαχιστοποιήσει την τοξικότητα, με αποτέλεσμα μια ένωση-οδηγό. Περαιτέρω βελτιστοποίηση της ένωσης-οδηγού οδηγεί στο υποψήφιο φάρμακο. Ακολουθούν, οι προκλινικές μελέτες που επικεντρώνονται στην αποσαφήνιση του τρόπου δράσης του υποψηφίου φαρμάκου, της Φαρμακοκινητικής, της αποτελεσματικότητας στα ζώα, των τοξικών μεταβολιτών (εάν υπάρχουν), της φαρμακοτεχνικής μορφής και της σταθερότητας του σκευάσματος. Οι κλινικές δοκιμές, η πιο εκτεταμένη και δαπανηρή φάση, περιλαμβάνουν τέσσερα διακριτά στάδια. Η Φάση I περιλαμβάνει περίπου 100 υγιείς εθελοντές για την αξιολόγηση της ασφάλειας,

της Φαρμακοκινητικής και των άμεσων παρενεργειών. Η Φάση II περιλαμβάνει αρκετές εκατοντάδες ασθενείς με τη νόσο-στόχο, αξιολογώντας τη βραχυπρόθεσμη ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Η Φάση III επεκτείνεται σε χιλιάδες ασθενείς σε πολλά κέντρα σε όλο τον κόσμο, συγκεντρώνοντας δεδομένα για την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των φαρμάκων. Η επιτυχής ολοκλήρωση της Φάσης III πληροί τις προϋποθέσεις για εγγραφή και κυκλοφορία του φαρμάκου. Ωστόσο, η παρακολούθηση των φαρμάκων συνεχίζεται και πέρα από αυτό το στάδιο. Η Φάση IV (Φαρμακοεπαγρύπνιση) παρακολούθησης μετά την κυκλοφορία, ουσιαστικά ατελείωτη, συνεπάγεται συνεχή παρακολούθηση του προφίλ ασφάλειας του φαρμάκου για ενδεχόμενες, απροσδόκητες παρενέργειες.

### **3.1.1 Μέθοδοι σχεδιασμού φαρμάκων**

Διάφορες στρατηγικές χρησιμοποιούνται στην ανακάλυψη φαρμάκων. Ανάμεσά τους, η μέθοδος «τύχης» (serendipity), που χαρακτηρίζεται από τυχαίες ανακαλύψεις, είναι η παλαιότερη [146]. Αξιοσημείωτες περιπτώσεις αυτής της στρατηγικής περιλαμβάνουν την πενικιλίνη, η οποία έσωσε αμέτρητες ζωές στον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο και οδήγησε τους Fleming, Florey, και Chain σε βραβείο Νόμπελ. Άλλα φάρμακα που η ανακάλυψή τους βασίστηκε στην «τύχη» είναι το χλωροδιαζεποξείδιο, η βενζοδιαζεπίνη, και η κυκλοσπορίνη, με την τελευταία να αποτελεί το πρώτο ανοσοκατασταλτικό φάρμακο [146]. Πιο πρόσφατο παράδειγμα είναι αυτό του Sildenafil (Viagra), το οποίο προοριζόταν ως αντιυπερτασικό φάρμακο, αλλά απροσδόκητα οδήγησε σε μια πρωτοποριακή φαρμακολογική κατηγορία στη φαρμακευτική ιστορία [146].

Μια εναλλακτική οδός στην ανακάλυψη φαρμάκων περιλαμβάνει την αλλαγή γνωστών φαρμάκων ή φυσικών ενώσεων μέσω χημικών τροποποιήσεων [147]. Η προέλευση της ασπιρίνης έγκειται στη χημική τροποποίηση με ακετυλιωμένο. το σαλικυλικό οξύ ώστε να ενισχυθεί η σταθερότητά του και να μειωθεί ο γαστρικός ερεθισμός που προκαλεί [148]. Μικρές χημικές αλλαγές αποδίδουν βελτιωμένες θεραπευτικές ιδιότητες σε διαδοχικές γενιές φαρμάκων. Χαρακτηριστικά αναφέρονται: η ρανιτιδίνη (Zantac), μια πιο ισχυρή

και μεγαλύτερης διάρκειας παραλλαγή της σιμετιδίνης, και την πινδολόλη (Visken), που προέρχεται από την προπρανολόλη, και παρουσιάζει αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα, λόγω αποφυγής του μεταβολισμού στο ήπαρ [145].

Η εξερεύνηση βάσεων δεδομένων, είτε εικονικά είτε μέσω αναλύσεων υψηλής απόδοσης (High Throughput Assays, HTS), προσφέρει μια πρόσθετη μέθοδο για την ανακάλυψη φαρμάκων [149]. Η προντοσίλη (Prontosil), το πρώτο φάρμακο σουλφοναμίδης, εμφανίστηκε μέσω τυχαίου *in vitro* ελέγχου, αξιολογώντας πολυάριθμες χρωστικές για αντιβακτηριακές ιδιότητες [145]. Ομοίως, η πακλιταξέλη (Taxol), ένας καινοτόμος αντικαρκινικός παράγοντας, παρουσιάστηκε μέσω μεθόδων HTS [145].

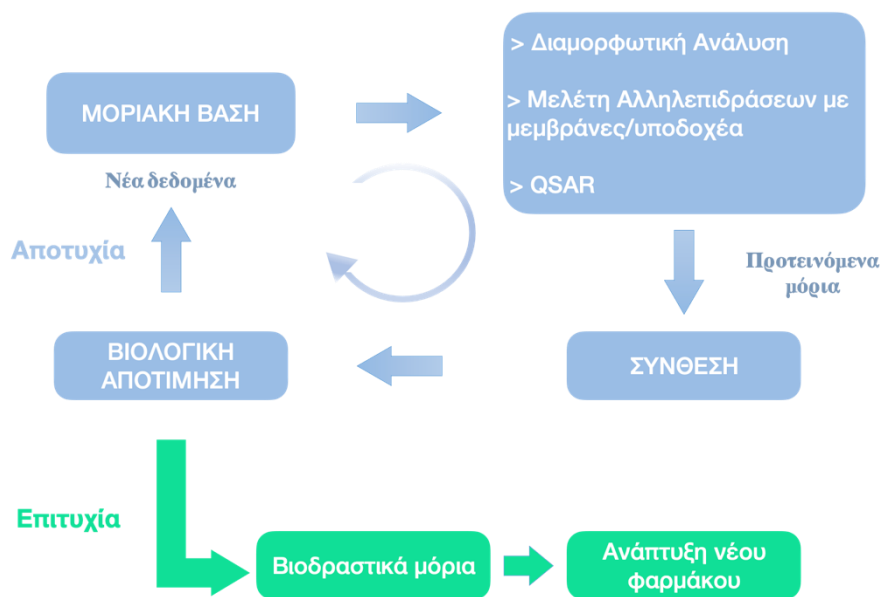
Ο Ορθολογικός Σχεδιασμός φαρμάκων (Rational Drug Design) είναι μια εξελιγμένη και οικονομικά αποδοτική προσέγγιση στη σύγχρονη ανακάλυψη φαρμάκων. Ξεκινά με τον εντοπισμό ενός συγκεκριμένου βιολογικού στόχου, συχνά ενός βιομορίου (πρωτεΐνη, ένζυμα, τμήμα DNA ή RNA κ.ά.) που εμπλέκεται σε μια ασθένεια. Μέσω της επαναληπτικής βελτιστοποίησης στοχεύει στην ανάπτυξη μιας ένωσης με προσαρμοσμένες ιδιότητες όπως βέλτιστη συγγένεια, εκλεκτικότητα, ασφάλεια, διαλυτότητα, διαπερατότητα και βιοδιαθεσιμότητα, όλα απαραίτητα για την αποτελεσματική ανάπτυξη φαρμάκων. Ο Ορθολογικός Σχεδιασμός φαρμάκων περιλαμβάνει δύο κύριες στρατηγικές: (i) με βάση τον προσδέτη, και (ii) με βάση τη δομή [150]. Στον σχεδιασμό που βασίζεται στον προσδέτη, η εστίαση είναι στη σχέση μεταξύ της δομής ενός προσδέτη και της δραστηριότητάς του, ενώ στον σχεδιασμό με βάση τη δομή, η γνωστή τριδιάστατη δομή του μακρομορίου στόχου καθοδηγεί τη δημιουργία ενός συμπληρωματικού προσδέτη, ο οποίος ταιριάζει ακριβώς στην περιοχή πρόσδεσης. Αυτή η προσέγγιση αξιοποιεί τις μοριακές γνώσεις για τη δημιουργία πιο ακριβών και αποτελεσματικών φαρμάκων για στοχευμένες θεραπείες.

Στις μέρες μας, η τεχνητή νοημοσύνη (Artificial Intelligence, AI) έχει εισβάλει σε κάθε στάδιο ανακάλυψης φαρμάκων [151][152]. Στον σχεδιασμό φαρμάκων, η τεχνητή νοημοσύνη επικουρεί στην πρόβλεψη των πρωτεϊνικών δομών, των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φαρμάκων και πρωτεϊνών, καθώς και στην αποτελεσματικότητα αυτών. Ακόμα, μπορεί να δημιουργήσει και *de novo* μόρια. Στη φαρμακολογία, η τεχνητή νοημοσύνη συμβάλλει στον σχεδιασμό μορίων

για συγκεκριμένους σκοπούς, συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων πολλαπλών στόχων. Στο πλαίσιο της χημικής σύνθεσης, η τεχνητή νοημοσύνη υπερέχει στη διαμόρφωση συνθετικών οδών, στην πρόβλεψη των αποδόσεων των αντιδράσεων και στην αποσαφήνιση των μηχανισμών αντίδρασης. Επιπρόσθετα, η τεχνητή νοημοσύνη είναι αρκετά καλή στο να επαναχρησιμοποιεί (Repurposing) υπάρχοντα φάρμακα για νέους θεραπευτικούς στόχους. Αναπόφευκτα, ο ρόλος της τεχνητής νοημοσύνης είναι καθοριστικός στον έλεγχο φαρμάκων, προσφέροντας προγνωστικές γνώσεις σχετικά με την τοξικότητα, τη βιοδραστικότητα, τις ιδιότητες ADME, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και πολλά άλλα [152].

### **3.2 Ο *in silico* σχεδιασμός φαρμάκων**

Ο *in silico* σχεδιασμός φαρμάκων ή Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη διαδικασία χρήσης υπολογιστικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης της Μοριακής Μοντελοποίησης και Προσομοιώσεων, για τον σχεδιασμό και την ανακάλυψη νέων υποψηφίων φαρμάκων (Σχήμα 6). Η φράση «*in silico*» έχει λατινική προέλευση «*in silicio*» και αναφέρεται σε μεθόδους που βασίζονται σε υπολογιστή, σε αντίθεση με το «*in vivo*» (σε ζωντανό οργανισμό) και το «*in vitro*» (σε ένα ελεγχόμενο περιβάλλον όπως ένας δοκιμαστικός σωλήνας). Με τον *in silico* σχεδιασμό φαρμάκων μειώνεται σημαντικά ο χρόνος και το κόστος που απαιτείται για την ανακάλυψη φαρμάκων εξαλείφοντας την ανάγκη για εκτεταμένα εργαστηριακά πειράματα.



Σχήμα 6. Η πορεία του Ορθολογικού Σχεδιασμού Φαρμακευτικών μορίων.

Η Μοριακή Μοντελοποίηση είναι ένας ερευνητικός κλάδος, ο οποίος συνδυάζει τη Θεωρητική Χημεία (Αρχές Κβαντικής Χημείας και Κλασικής Φυσικής) με τις υπολογιστικές τεχνικές προκειμένου να αναπαρασταθεί, εξηγηθεί, και προβλεφθεί η συμπεριφορά είτε μικρών χημικών συστημάτων είτε μεγάλων μακρομορίων.

### 3.2.1 Εφαρμογές του *in silico* σχεδιασμού φαρμάκων

Ο *in silico* σχεδιασμός φαρμάκων περιλαμβάνει τη χρήση μεθόδων, οι οποίες βασίζονται σε υπολογιστή. Έχει γίνει αναπόσπαστο μέρος των σύγχρονων μεθόδων ανακάλυψης φαρμάκων λόγω της αποτελεσματικότητάς του, της οικονομικής αποδοτικότητάς του και της ικανότητάς του να επιταχύνει τη διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων. Ακολουθούν ορισμένες βασικές εφαρμογές του *in silico* σχεδιασμού φαρμάκων [153][154][155][156] [157]:

- **Εικονική διαλογή (Virtual Screening):** Οι μέθοδοι *in silico* μπορούν να εξετάσουν γρήγορα μεγάλες βάσεις δεδομένων ενώσεων για τον εντοπισμό πιθανών υποψηφίων φαρμάκων. Αυτό βοηθά στον περιορισμό του αριθμού αναζήτησης ενώσεων πριν από τις πειραματικές δοκιμές, εξοικονομώντας χρόνο και πόρους.

- **Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τον προσδέτη (Ligand-Based Drug Design):** Αυτή η προσέγγιση περιλαμβάνει την ανάλυση της δομής γνωστών προσδετών και τη χρήση υπολογιστικών τεχνικών για την πρόβλεψη καινοτόμων προσδετών με παρόμοιες δομές, οι οποίοι ενδέχεται να εμφανίζουν την επιθυμητή βιολογική δραστηριότητα.
- **Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή (Structure-Based Drug Design):** Εδώ, η τριδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης στόχου χρησιμοποιείται για τον σχεδιασμό ενώσεων που ταιριάζουν στην περιοχή πρόσδεσης. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται σε τεχνικές όπως η Μοριακή Πρόσδεση, οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής, καθώς και οι Υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας.
- **De Novo σχεδιασμός φαρμάκων:** Σε αυτή την προσέγγιση, καινοτόμες ενώσεις σχεδιάζονται από την αρχή για να αλληλεπιδρούν με μια πρωτεΐνη ή έναν άλλο κυτταρικό στόχο. Οι προηγμένοι αλγόριθμοι και τα υπολογιστικά εργαλεία βοηθούν στη δημιουργία νέων χημικών δομών με επιθυμητές ιδιότητες.
- **ADME και Πρόβλεψη Τοξικότητας:** Οι *in silico* μέθοδοι μπορούν να προβλέψουν τις ιδιότητες Απορρόφησης, Κατανομής, Μεταβολισμού, Απέκκρισης (ADME) και Τοξικότητας, υποψηφίων φαρμάκων. Βοηθώντας με αυτό τον τρόπο στον εντοπισμό ενώσεων με υψηλότερη πιθανότητα επιτυχίας σε κλινικές δοκιμές.
- **Ανάλυση Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR):** Τα μοντέλα QSAR συσχετίζουν τις δομικές ιδιότητες των ενώσεων με τις βιολογικές τους δράσεις. Αυτά τα μοντέλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της βιολογικής δράσης νέων ενώσεων έχοντας ως βάση τη χημική τους δομή.
- **Σχεδιασμός φαρμάκου που βασίζεται σε θραύσματα (Fragment-Based Drug Design):** Τα θραύσματα μορίων σχεδιάζονται ή εξάγονται από βιβλιοθήκες και στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για τη συγκέντρωση μεγαλύτερων υποψηφίων φαρμάκων που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη-στόχο. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να εξερευνήσει έναν ευρύτερο χημικό χώρο και να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της αναγνώρισης χτυπήματος (hit).



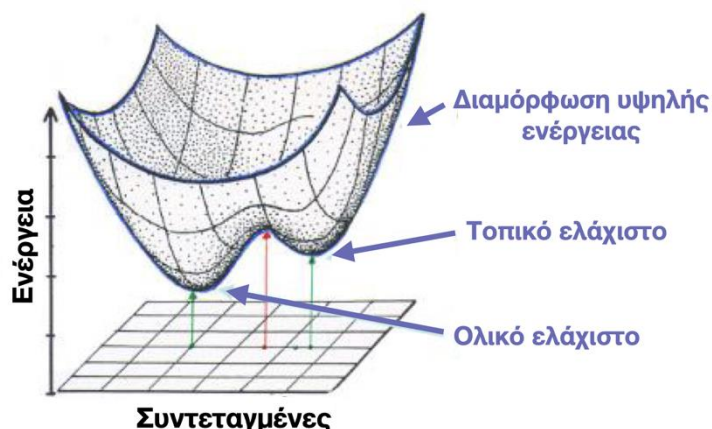
- **Πρόβλεψη αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης:** Οι *in silico* μέθοδοι μπορούν να προβλέψουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, οι οποίες είναι κρίσιμες σε διάφορες ασθένειες. Η στόχευση αυτών των αλληλεπιδράσεων με μικρά μόρια μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπειών.
- **Βελτιστοποίηση ενώσεων - οδηγών:** Οι υπολογιστικές τεχνικές μπορούν να καθοδηγήσουν τη βελτιστοποίηση των ενώσεων – οδηγών, προτείνοντας τροποποιήσεις που βελτιώνουν την ισχύ, την εκλεκτικότητα, καθώς και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες.
- **Επαναχρησιμοποίηση υπαρχόντων φαρμάκων (Repurposing):** Μέσω των *in silico* μεθόδων μπορούν να προσδιορίσουν υπάρχοντα φάρμακα που ενδέχεται να παρουσιάζουν δυνατότητες για τη θεραπεία διαφορετικών ασθενειών αναλύοντας τις αλληλεπιδράσεις τους με διάφορους στόχους.
- **Σχεδιασμός Θεραπευτικών Πεπτιδίων και Αντισωμάτων:** Οι υπολογιστικές προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται για τον σχεδιασμό και την παρασκευή πεπτιδίων και αντισωμάτων για θεραπευτικούς σκοπούς, ενισχύοντας τη συγγένεια δέσμευσης και την εκλεκτικότητά τους.

Όλες αυτές οι εφαρμογές που αναφέρθηκαν παραπάνω, παρέχονται από λογισμικά πακέτα, τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα αλλά και που διατίθενται δωρεάν (open access).

### 3.3 Ελαχιστοποίηση Ενέργειας

Η ελαχιστοποίηση ενέργειας είναι μια μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται στη Μοριακή Μοντελοποίηση, με στόχο την εύρεση της χαμηλότερης ενεργειακής κατάστασης του μελετούμενου συστήματος. Η ιδέα αυτή είναι θεμελιώδης για την κατανόηση και την πρόβλεψη της συμπεριφοράς των φυσικών, χημικών και βιολογικών συστημάτων. Οι μέθοδοι ελαχιστοποίησης ενέργειας περιλαμβάνουν επαναληπτική προσαρμογή των θέσεων των ατόμων ή των σωματιδίων σε μια προσομοίωση ώστε να ευρεθεί η διαμόρφωση που αντιστοιχεί στη χαμηλότερη ενέργεια μέσω ειδικά σχεδιασμένων αλγορίθμων.

Κάθε μοριακό σύστημα περιέχει εσωτερική ενέργεια, αποτελούμενη από δύο συνιστώσες: την κινητική και τη δυναμική. Η κινητική ενέργεια σχετίζεται με την ταχύτητα και τη μάζα, ενώ η δυναμική με τη διαμόρφωση του μορίου. Η δυναμική ενέργεια ενός μορίου είναι συνάρτηση των συντεταγμένων των ατόμων του και της διεύθετησής τους. Η διεύθετηση ενός ατόμου που αντιστοιχεί στη μικρότερη ενέργεια είναι και σταθερότερη [158]. Αναλυτικότερα, ένα μόριο  $N$  ατόμων περιγράφεται από  $3N$  καρτεσιανές συντεταγμένες (ή  $3N-6$  εσωτερικές), οι οποίες ορίζουν την πολυδιάστατη επιφάνεια της δυναμικής ενέργειας (Potential Energy Surface, PES). Κάθε ένα σημείο της επιφάνειας αντιστοιχεί σε μία διαμόρφωση του μορίου, το οποίο χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη δυναμική ενέργεια. Σε μια επιφάνεια ενέργειας μπορεί να υπάρχουν πολλά ενεργειακά ελάχιστα (τοπικά ελάχιστα). Αυτό που θα αντιστοιχεί στη χαμηλότερη ενέργεια όλων είναι γνωστό ως το ολικό ελάχιστο (global energy minimum) (Σχήμα 7), και αυτή η διαμόρφωση είναι θερμοδυναμικά σταθερότερη.



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση της επιφάνειας ελαχιστοποίησης ενέργειας για ένα σύστημα  $N$  ατόμων που περιγράφεται από  $3N$  συντεταγμένες. Κάθε σημείο της επιφάνειας αντιπροσωπεύει μια διαμόρφωση του μορίου, με συγκεκριμένη δυναμική ενέργεια. Υποδεικνύονται η διαμόρφωση υψηλής ενέργειας, το τοπικό και ολικό ελάχιστο.

### 3.3.1 Κατηγορίες Αλγορίθμων Ελαχιστοποίησης Ενέργειας

Στους αλγορίθμους ελαχιστοποίησης ενέργειας θεωρείται ότι οποιαδήποτε συνάρτηση  $F(x)$ , η οποία αντιπροσωπεύει τη δυναμική ενέργεια του μορίου, μπορεί να αναλυθεί με μια σειρά Taylor, γύρω από το ελάχιστο  $X_0$ :

$$F(X)=F(X_0)+(X-X_0)F'(X_0)+\frac{1}{2}(X-X_0)^2F''(X_0)+\dots$$

Όπου:

$F'$ : η πρώτη παράγωγος της συνάρτησης,

$F''$ : η δεύτερη παράγωγος της συνάρτησης.

Η κατάταξη των αλγορίθμων πραγματοποιείται ανάλογα με τη μεγαλύτερη παράγωγο της συνάρτησης που χρησιμοποιείται στον αλγόριθμο. Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούν την πρώτη παράγωγο ( $F'$ ) ως κριτήριο σύγκλισης, κατατάσσονται στους αλγορίθμους πρώτης τάξης, ενώ αυτοί που χρησιμοποιούν την πρώτη και τη δεύτερη παράγωγο ως κριτήριο σύγκλισης κατατάσσονται στους αλγορίθμους δεύτερης τάξης [159].

Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης της ενέργειας που παρέχονται από το MacroModel της εταιρείας Schrödinger είναι οι εξής [160]:

- **Αλγόριθμος Polak-Ribiere Conjugate Gradient (PRCG)**

Ο αλγόριθμος αυτός ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων σύγκλισης και ταυτόχρονα χρησιμοποιεί τη συνάρτηση της πρώτης παραγώγου Polak-Ribiere [161]. Χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου αλγόριθμου είναι ότι ξεκινά ξανά τη διαδικασία της ελαχιστοποίησης κάθε  $3N$  επαναλήψεις, όπου  $N$  ο αριθμός ατόμων του υπό μελέτη συστήματος. Με τον τρόπο αυτόν επιτυγχάνεται η λήψη μοριακών δομών πολύ χαμηλής ενέργειας.

- **Αλγόριθμος Truncated Newton Conjugate Gradient (TNCG)**

Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος χρησιμοποιεί μία συνάρτηση δεύτερης παραγώγου για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας, παρουσιάζοντας μεγάλη επιτυχία στην παραγωγή μοριακών δομών πολύ χαμηλής ενέργειας [162].

- **Αλγόριθμος Oren-Spedicato Variable Metric (OSVM)**  
Ο αλγόριθμος QSVM ανήκει στις μεθόδους μεταβλητής μετρικής (variable metric) και χρησιμοποιεί την τροποποίηση Oren-Spedicato της μεθόδου Fletcher-Powell quasi-Newton [163]. Παρουσιάζει σχετικά χαμηλή ταχύτητα επαναλήψεων. Δεν ενδείκνυται για μοριακές δομές με πολύ στρεβλωμένη γεωμετρία.
- **Αλγόριθμος Steepest Descent (SD)**  
Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος θα ήταν προτιμότερο να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους για την ελαχιστοποίηση μοριακών δομών, καθώς δεν επιτυγχάνεται πλήρης σύγκλιση στο τέλος της ελαχιστοποίησης. Είναι αποτελεσματικός στην ελαχιστοποίηση της ενέργειας μοριακών δομών που σχεδιάζονται με κάποιο σχεδιαστικό λογισμικό και οι οποίες είναι πάρα πολύ μακριά από κάποιο ενεργειακό ελάχιστο, αλλά απαιτείται η χρήση και άλλης μεθόδου για περαιτέρω ελαχιστοποίηση της ενέργειας [160].
- **Αλγόριθμος Full Matrix Newton Raphson (FMNR)**  
Αποτελεσματικός αλγόριθμος για την πλήρη σύγκλιση μοριακών δομών, χρησιμοποιείται συνήθως σε μεγάλα μοριακά συστήματα [160].
- **Αλγόριθμος Low-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (LBFGS)** Ορθή και αποτελεσματική επιλογή για την ελαχιστοποίηση ενέργειας σε μεγάλα μοριακά συστήματα.

### 3.3.2 Πεδία Δυνάμεων

Τα πεδία δυνάμεων (force fields) είναι ένα σημαντικό συστατικό της Μοριακής Μοντελοποίησης μέσω των οποίων προσομοιάζεται η συμπεριφορά των ατόμων σε ατομικό επίπεδο. Ένα πεδίο δυνάμεων είναι ένα μαθηματικό μοντέλο, το οποίο περιγράφει τον τρόπο αλληλεπίδρασης των ατόμων με βάση τις αρχές της Κλασικής Μηχανικής, όπου κάθε άτομο θεωρείται ότι αποτελεί σκληρή σφαίρα και κάθε δεσμός συμπεριφέρεται ως ελατήριο επαναφοράς. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν την τάση δεσμού, την κάμψη γωνίας,

τις περιστροφές στρέψης, τις αλληλεπιδράσεις van der Waals καθώς και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Επιπρόσθετα, τα πεδία δυνάμεων παρέχουν τους ενεργειακούς όρους που απαιτούνται για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας, τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής και άλλες υπολογιστικές μελέτες στη Μοριακή Μοντελοποίηση.

Διαφορετικά πεδία δυνάμεων έχουν σχεδιαστεί για διαφορετικούς τύπους μορίων και συστημάτων, τα οποία κυμαίνονται από απλά οργανικά μόρια έως πολύπλοκα μακρομόρια όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Η επιλογή ενός συγκεκριμένου πεδίου δυνάμεων εξαρτάται από τον τύπο του υπό μελέτη συστήματος και του επιπέδου ακρίβειας που απαιτείται. Ακολουθούν μερικά από τα πεδία δυνάμεων που χρησιμοποιούνται ευρύτατα:

- **Πεδίο δυνάμεων AMBER**

Τα πεδία δυνάμεων AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement, AMBER) χρησιμοποιούνται ευρέως σε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής. Διαφορετικές εκδόσεις πεδίων δυνάμεων AMBER (όπως AMBER\*, AMBER94, AMBER99, AMBER ff14SB, κ.λπ.) έχουν σχεδιαστεί για διάφορους τύπους μορίων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και μικρών οργανικών μορίων. Όλες οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στο πεδίο δυνάμεων AMBER\* είναι πανομοιότυπες με αυτές του αυθεντικού πεδίου δυνάμεων AMBER που σχεδιάστηκε από τον Kollman και τους συνεργάτες του [164]. Ωστόσο, το πεδίο δυνάμεων AMBER\* διαφοροποιείται από το AMBER καθώς για τους δεσμούς υδρογόνου χρησιμοποιείται ο πρόσφατα σχεδιασμένος από τον Kollman όρος 6,12-Lennard-Jones και μία βελτιωμένη παράμετρος για τον αμιδικό σκελετό των πεπτιδίων [165][166].

- **Πεδίο δυνάμεων CHARMM**

Το πεδίο δυνάμεων CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics CHARMM) αναπτύχθηκε από το πρόγραμμα CHARMM του Πανεπιστημίου του Χάρβαρντ και είναι γνωστό για την ακρίβειά του στην προσομοίωση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Περιλαμβάνει παραμέτρους για ένα ευρύ φάσμα μακρομοριακών συστημάτων.

- **Πεδίο δυνάμεων OPLS**

Το πεδίο δύναμης OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations, OPLS) είναι γνωστό για την αποτελεσματικότητά του και την ακρίβειά του στην προσομοίωση ιδιοτήτων υγρής φάσης [167]. Έχει επεκταθεί ώστε να περιλαμβάνει παραμέτρους για πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια.

- **Πεδίο δυνάμεων OPLS\_2001**

Το συγκεκριμένο πεδίο δυνάμεων, που αναφέρεται και ως OPLS-AA, σχεδιάστηκε από τον Jorgensen στο Πανεπιστήμιο Yale και αποτελεί ένα από τα επιτυχέστερα πεδία δυνάμεων για τις προσομοιώσεις συμπυκνωμένης φάσης πεπτιδίων. Όλες οι χρησιμοποιούμενες εξισώσεις του OPLS\_2001 είναι πανομοιότυπες με αυτές του αυθεντικού πεδίου δυνάμεων OPLS-AA [168]. Το OPLS\_2001 έχει δοκιμαστεί σε μία ευρεία ποικιλία από οργανικά συστήματα και έχει επικυρωθεί η αξιοπιστία των υπολογισμών που προσφέρει. Σύγκριση υπολογισμών με χρήση του OPLS\_2001 με *ab initio* υπολογισμούς και πειραματικά δεδομένα απέδειξε την ακρίβεια των υπολογισμών ενέργειας για συστήματα των οποίων οι παράμετροι είχαν προσδιοριστεί με ακρίβεια. όλες οι υπόλοιπες παράμετροι του OPLS\_2001 είναι με ακρίβεια προσδιορισμένες. Όλες οι περισσότερες παράμετροι του OPLS\_2001 είναι με ακρίβεια προσδιορισμένες. Εξαίρεση αποτελούν η δυνατότητα βελτιστοποίησης των παραμέτρων των φορτίων, των van der Waals αλληλεπιδράσεων και εκείνων της περιστροφής δεσμών για τα άτομα θείου στις θειόλες και τους θειαιθέρες [169]. Οι νέες χρησιμοποιούμενες παράμετροι για τα άτομα του θείου, οι οποίες αποδίδουν σημαντικά μικρότερες τιμές για τα φορτία των ατόμων θείου και οι οποίες επικυρώθηκαν σε προσομοιώσεις υγρής φάσης θειολών και θειαιθέρων, παρείχαν σημαντική βελτίωση στις ενέργειες διαμόρφωσης της κυστεΐνης και της μεθειονίνης στις πρωτεΐνες.

- **Πεδίο δυνάμεων OPLS\_2005**

Το πεδίο δυνάμεων OPLS\_2005 είναι μία ενισχυμένη έκδοση του OPLS-AA, η οποία παρέχει μεγάλη κάλυψη στις απαιτήσεις που παρουσιάζουν οι

λειτουργικές ομάδες των οργανικών μορίων. Αποτελεί την τελευταία τεχνολογία ανάπτυξη της εταιρείας Schrödinger. Ειδικότερα, όλες οι περιστροφικές παράμετροι μετασκευάστηκαν για να αναπαράγουν τις ενέργειες διαμόρφωσης μορίων, οι οποίες προέκυψαν από υψηλής ακρίβειας κβαντικούς υπολογισμούς και επιπρόσθετες παράμετροι φορτίων εισήχθησαν για να καλύπτουν όλες τις λειτουργικές ομάδες των οργανικών μορίων. Οι παράμετροι των πρωτεϊνικών μορίων βελτιστοποιήθηκαν για να παρέχουν πιο ακριβείς υπολογισμούς [169].

- **Πεδίο δυνάμεων GROMOS**

Το πεδίο δυνάμεων GROMOS (Groningen Molecular Simulation, GROMOS) χρησιμοποιείται ευρέως για προσομοιώσεις οργανικών ενώσεων, μακρομορίων και υγρών [170].

- **Πεδίο δυνάμεων UFF**

Σε αντίθεση με ορισμένα από τα πεδία δυνάμεων που αναφέρθηκαν προηγουμένως και έχουν συγκεκριμένες παραμέτρους για διαφορετικούς τύπους ατόμων, το πεδίο δυνάμεων UFF (Universal Force Field, UFF) είναι ένα πιο γενικό πεδίο δυνάμεων, το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία χημικών ενώσεων [171]. Συχνά χρησιμοποιείται για γρήγορες προκαταρκτικές ελαχιστοποιήσεις ενέργειας.

- **Πεδίο δυνάμεων MMFF**

Το MMFF (Merck Molecular Force Field MMFF) χρησιμοποιείται για ταχεία ελαχιστοποίηση ενέργειας και διαμορφωτική ανάλυση οργανικών μορίων. Χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες Φαρμακευτικής Χημείας και σχεδιασμού φαρμάκων [172].

- **Ημιεμπειρικές Κβαντομηχανικές Μέθοδοι (Semi-Empirical Quantum Mechanical Methods, AM1, PM3, κ.λπ)**

Αν και δεν θεωρούνται κλασικά πεδία δυνάμεων, αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν κβαντομηχανική για να εκτιμήσουν τις ηλεκτρονικές δομές

και τις ενέργειες των μορίων. Συχνά χρησιμοποιούνται για ελαχιστοποίηση της ενέργειας μικρών μορίων όταν απαιτείται μεγαλύτερη ακρίβεια.

### 3.4 Διαμορφωτική Ανάλυση

Όπως έχει αναφερθεί η εύρεση του ολικού ελάχιστου αποτελεί σημαντικό βήμα της Μοριακής Μοντελοποίησης. Ωστόσο, η Ελαχιστοποίηση Ενέργειας δεν αποτελεί επαρκές εργαλείο, καθώς ενδέχεται να μην προσεγγίσει το ολικό ελάχιστο της δομής, αλλά κάποιο τοπικό. Αυτό το ενδεχόμενο έρχεται να αντιμετωπίσει η Διαμορφωτική Ανάλυση.

Η Διαμορφωτική Ανάλυση είναι μια κρίσιμη πτυχή της Μοριακής Μοντελοποίησης, η οποία περιλαμβάνει τη διερεύνηση των διαφορετικών χωρικών διαμορφώσεων των ατόμων μέσα σε ένα μόριο. Τα μόρια δεν είναι άκαμπτες οντότητες, καθώς τα άτομα τους μπορούν να περιστρέφονται γύρω από δεσμούς, οδηγώντας σε μια ποικιλία πιθανών τριδιάστατων διαμορφώσεων. Ως εκ τούτου, τα μόρια μπορούν να εμφανίσουν πολλές σταθερές ή μετασταθερές διαμορφώσεις λόγω της περιστροφικής ελευθερίας γύρω από απλούς δεσμούς και άλλους εσωτερικούς βαθμούς ελευθερίας. Διαφορετικές διαμορφώσεις μπορεί να έχουν σημαντικά διαφορετικές ενέργειες, ιδιότητες και συμπεριφορές. Η Διαμορφωτική Ανάλυση στοχεύει στον εντοπισμό των πιο ενεργειακά ευνοϊκών διαμορφώσεων, οι οποίες είναι και θερμοδυναμικά σταθερότερες.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη Διαμορφωτική Αναζήτηση, η καθεμία με τα δικά της πλεονεκτήματα και περιορισμούς είναι οι ακόλουθες [173]:

- **Συστηματική αναζήτηση (Systematic search)**, η οποία περιλαμβάνει για τη δειγματοληψία διαφορετικών διαμορφώσεων τη συστηματική περιστροφή διεδρων γωνιών γύρω από τους περιστρεφόμενους δεσμούς του μορίου. Είναι απλό, αλλά μπορεί να είναι υπολογιστικά ευαίσθητο, με αποτέλεσμα να χαθούν ορισμένες διαμορφώσεις χαμηλής ενέργειας.



- **Μέθοδοι τυχαίας αναζήτησης Monte Carlo (MC).** Αυτές οι στοχαστικές μέθοδοι χρησιμοποιούν τυχαία δειγματοληψία για την εξερεύνηση του διαμορφωτικού χώρου. Η κύρια ιδέα είναι να δημιουργηθούν νέες διαμορφώσεις κάνοντας τυχαίες αλλαγές στις ατομικές θέσεις (περιστροφή δίεδρων γωνιών, μετατόπιση ατόμων κ.ά.) και στη συνέχεια αξιολόγηση της ενέργειας της προκύπτουσας διαμόρφωσης. Ο αλγόριθμος Metropolis MC, ευρύτερα χρησιμοποιούμενος, βασίζεται σε τυχαίους αριθμούς και έχει έναν πολύ απλό αλγόριθμο. Σύμφωνα με αυτό τον αλγόριθμο, κάθε νέα διαμόρφωση μετά από την ελαχιστοποίηση ενέργειας γίνεται εναρκτήρια για τον επόμενο κύκλο και συνεχώς η κίνηση πραγματοποιείται προς τη χαμηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση, αν δεν έχει ήδη επιτευχθεί η ελάχιστη ενέργεια [174]
- **Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics, MD).** Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής περιλαμβάνουν την αριθμητική επίλυση των εξισώσεων κίνησης για ένα σύστημα ατόμων συναρτήσει του χρόνου. Καθώς οι προσομοιώσεις MD περιέχουν και τη χρονική μεταβλητή δύναται να παρέχουν διάφορες διαμορφώσεις με βάση τη δυναμική ενέργεια της επιφάνεια.
- **Γενετικοί αλγόριθμοι (Genetic Algorithms),** εμπνευσμένοι από τη βιολογική εξέλιξη, αυτοί οι αλγόριθμοι εξελίσσουν σύνολα διαμορφώσεων κατά τη διάρκεια των γενεών. Οι ευνοϊκές διαμορφώσεις επιλέγονται, μεταλλάσσονται και ανασυνδυάζονται για να εξερευνήσουν τον διαμορφωτικό χώρο πιο αποτελεσματικά.
- **Κβαντομηχανική / Μοριακή Μηχανική (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics, QM/MM).** Πρόκειται για υβριδικές μεθόδους, καθώς συνδυάζουν Κβαντομηχανικούς υπολογισμούς για ένα συγκεκριμένο μέρος του μορίου με Υπολογισμούς Μοριακής Μηχανικής για τα υπόλοιπα μέρη. Μέσω αυτού του συνδυασμού επιτρέπεται η ακριβής επεξεργασία των επιδράσεων της ηλεκτρονιακής δομής σε επιλεγμένες περιοχές, ενώ παράλληλα μοντελοποιείται αποτελεσματικά το υπόλοιπο μόριο.

- **Βελτιωμένες τεχνικές δειγματοληψίας.** Μέθοδοι όπως η ανταλλαγή αντιγράφων MD (replica exchange MD, REMD), η μεταδυναμική (metadynamics) και η δειγματοληψία ομπρέλα (umbrella sampling) προκαταλαμβάνουν την προσομοίωση προς συγκεκριμένες περιοχές του διαμορφωτικού χώρου, καθιστώντας ευκολότερη τη δειγματοληψία σπάνιων ή υψηλής ενέργειας διαμορφώσεων.

Στις περισσότερες μεθόδους διαμορφωτικής αναζήτησης, ο υπολογισμός ενέργειας της κάθε διαμόρφωσης πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τα Πεδία Δυνάμεων (βλέπε παράγραφο 3.3.2).

### 3.5 Μοριακή Πρόσδεση

Η Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking) είναι η κυρίαρχη υπολογιστική μέθοδος για τον σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή (Structure-Based Drug Design, SBDD), η οποία έχει αποκτήσει ευρεία χρήση από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 [175]. Βασική προϋπόθεση για την επιλογή της είναι η ύπαρξη της τριδιάστατης (3D) δομής του πρωτεϊνικού στόχου. Η χρήση της Μοριακής Πρόσδεσης έχει αυξηθεί από τη σημαντική πρόοδο των ηλεκτρονικών υπολογιστών, παράλληλα με την αυξανόμενη προσβασιμότητα και την ευκολία απόκτησης δομών μικρών μορίων και πρωτεϊνών.

Ο πρωταρχικός στόχος της Μοριακής Πρόσδεσης είναι η κατανόηση και η πρόβλεψη της μοριακής αναγνώρισης τόσο σε δομικό επίπεδο (αναγνώριση πιθανών τρόπων σύνδεσης) όσο και σε ενεργειακό επίπεδο (πρόβλεψη συγγένειας δέσμευσης). Η μέθοδος ήταν αρχικά σχεδιασμένη για αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός μικρού μορίου, προσδέτη (ligand) και ενός μακρομορίου στόχου, υποδοχέας (receptor), αλλά αναπτύχθηκαν και άλλα πρωτόκολλα καθώς υπήρξε ενδιαφέρον και για πρόσδεση πρωτεΐνης - πρωτεΐνης, πρόσδεση προσδέτη - νουκλεϊκού οξέος (DNA και RNA), καθώς και πρόσδεση νουκλεϊκού οξέος-πρωτεΐνης-προσδέτη [156].

Η αρχική αποσαφήνιση του μηχανισμού δέσμευσης προσδέτη - υποδοχέα χρονολογείται από τη θεωρία του Fischer, όπου η προσαρμογή του προσδέτη

στον υποδοχέα παρομοιάζεται με αυτή της κλειδαριάς και του κλειδιού [144]. Οι παλαιότερες τεκμηριωμένες μέθοδοι πρόσδεσης βασίστηκαν σε αυτή τη θεωρία, θεωρώντας τόσο τον προσδέτη όσο και τον υποδοχέα ως άκαμπτους [175]. Στη συνέχεια, η θεωρία της «επαγόμενης προσαρμογής», την οποία εισήγαγε ο Koshland, η έννοια κλειδαριάς – κλειδιού επεκτάθηκε, προτείνοντας ότι η ενεργή θέση της πρωτεΐνης αναδιαμορφώνεται συνεχώς από τις αλληλεπιδράσεις της με τους προσδέτες ώστε να επιτευχθεί η τέλεια προσαρμογή [176]. Αυτή η θεωρία υποστηρίζει ότι τόσο ο προσδέτης όσο και ο υποδοχέας θα πρέπει να παρουσιάζουν ευελιξία κατά την πρόσδεση. Κατά συνέπεια, παρουσιάζει μια ακριβέστερη προσέγγιση της πρόσδεσης σε σύγκριση με την άκαμπτη προσέγγιση.

Οι εφαρμογές της Μοριακής Πρόσδεσης στην ανακάλυψη φαρμάκων είναι ποικίλες. Περιλαμβάνουν μελέτες δομής-δραστικότητας, βελτιστοποίηση ενώσεων-οδηγών, αναγνώριση πιθανών αναστολέων μέσω εικονικής διαλογής, βοήθεια στην Κρυσταλλογραφία Ακτίνων Χ (X-ray Crystallography) και στην Κρυογονική Ηλεκτρονική Μικροσκοπία (Cryogenic Electron Microscopy Crystallography, cryo-EM) για την προσαρμογή υποστρωμάτων και αναστολέων στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, περισσότερα από 60 διαφορετικά εργαλεία Μοριακής Πρόσδεσης έχουν αναπτυχθεί τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε εμπορικό περιβάλλον.

Η Μοριακή Πρόσδεση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της λειτουργίας του υποδοχέα ή την διέγερση της δράσης του. Και στις δυο περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα είναι μια φυσιολογική απόκριση χαρακτηριστική της δράσης του προσδέτη. Οι αναπτυσσόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός προσδέτη και ενός υποδοχέα που οδηγούν στον αυθόρμητο σχηματισμό του συμπλέγματος υποδοχέα - προσδέτη, περιλαμβάνουν συχνότερα δεσμούς υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσεως, αλληλεπιδράσεις ιόντων – διπόλων, διπόλων – διπόλων, μεταφοράς φορτίου καθώς και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ σχηματίζονται ομοιοπολικοί δεσμοί.

Ουσιαστικά, ο στόχος της Μοριακής Πρόσδεσης είναι να προβλέψει τη δομή του συμπλόκου υποδοχέα - προσδέτη χρησιμοποιώντας μεθόδους υπολογισμού. Η πρόσδεση μπορεί να επιτευχθεί μέσω δύο αλληλένδετων βημάτων: αρχικά με δειγματοληψία διαμορφώσεων του προσδέτη στο ενεργό

κέντρο της πρωτεΐνης, και έπειτα ταξινομώντας αυτές τις διαμορφώσεις μέσω μιας συνάρτησης βαθμολόγησης. Στην ιδανική περίπτωση, οι αλγόριθμοι δειγματοληψίας θα πρέπει να μπορούν να αναπαράγουν τον πειραματικό τρόπο σύνδεσης και η συνάρτηση βαθμολόγησης θα πρέπει επίσης να τον κατατάσσει στην υψηλότερη θέση μεταξύ όλων των παραγόμενων διαμορφώσεων [156].

Η Μοριακή Πρόσδεση μικρών μορίων προσδετών στο ενεργό κέντρο υποδοχών επιτελείται υπολογιστικά με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών από αλγόριθμους Μοριακής Πρόσδεσης (Surflex-Dock, GLIDE, GOLD, FlexX, κ.α.). Σε κάθε αλγόριθμο η διαδικασία της Μοριακής Πρόσδεσης διαφοροποιείται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του, εκτός από τρία βασικά χαρακτηριστικά που είναι κοινά σε όλους του αλγόριθμους Μοριακής Πρόσδεσης:

- I. Η ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη, αφού συνήθως δεν είναι γνωστή η διαμόρφωση με την οποία ο προσδέτης προσδέεται στο ενεργό κέντρο [177]. Η απλούστερη μέθοδος για τη μελέτη του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη, είναι η δημιουργία πολλών διαφορετικών διαμορφώσεων του προσδέτη, αποθήκευση τους σε μια βάση δεδομένων και στη συνέχεια πραγματοποίηση άκαμπτης πρόσδεσης κάθε μίας από αυτές στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Πιο πρόσφατες και ταχύτερες μέθοδοι, εκτελούν την πρόσδεση έχοντας όλες τις διαμορφώσεις μαζί ως ομάδα, μέσα στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.
- II. Ο σχηματισμός του συμπλέγματος υποδοχέα-προσδέτη. Κατά την αλληλεπίδραση του προσδέτη με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα υπάρχουν πολλοί τοπογραφικοί περιορισμοί [177]. Σε κάθε αλγόριθμο η μεθοδολογία διαφοροποιείται ώστε να τοπογραφηθεί το ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Η διαδικασία της τοπογράφησης εξαρτάται από τον προσδιορισμό των πεδίων, τα οποία εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο του εκάστοτε υποδοχέα και τα οποία θα καθορίσουν τις αλληλεπιδράσεις του με τον προσδέτη. Αυτή η διαδικασία συνήθως καταλήγει στη δημιουργία ενός αρχείου, το οποίο αποτελεί την υπολογιστική απεικόνιση του ενεργού κέντρου του υποδοχέα. Για παράδειγμα, ο αλγόριθμος GLIDE παράγει το αρχείο «grid». Οι

εμπλεκόμενες αλληλεπιδράσεις στη μοριακή αναγνώριση είναι οι ηλεκτροστατικές, οι van der Waals, οι υδρόφοβες, οι δεσμοί υδρογόνου και οι αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης [178]. Η δημιουργία των πεδίων από τα οποία χαρακτηρίζεται το ενεργό κέντρο έχει ως σκοπό να καθοδηγηθεί η πρόσδεση του προσδέτη και να σχηματιστεί το μοντέλο των αλληλεπιδράσεων του με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

- III. Η βαθμολόγηση της πρόσδεσης, δηλαδή ο υπολογισμός της ενέργειας πρόσδεσης που πραγματοποιείται μέσω της συνάρτησης υπολογισμού της ενέργειας πρόσδεσης, η οποία διαφέρει από αλγόριθμο σε αλγόριθμο.

Τα βασικά βήματα της Μοριακής Πρόσδεσης περιγράφονται στο Σχήμα 8 που ακολουθεί,



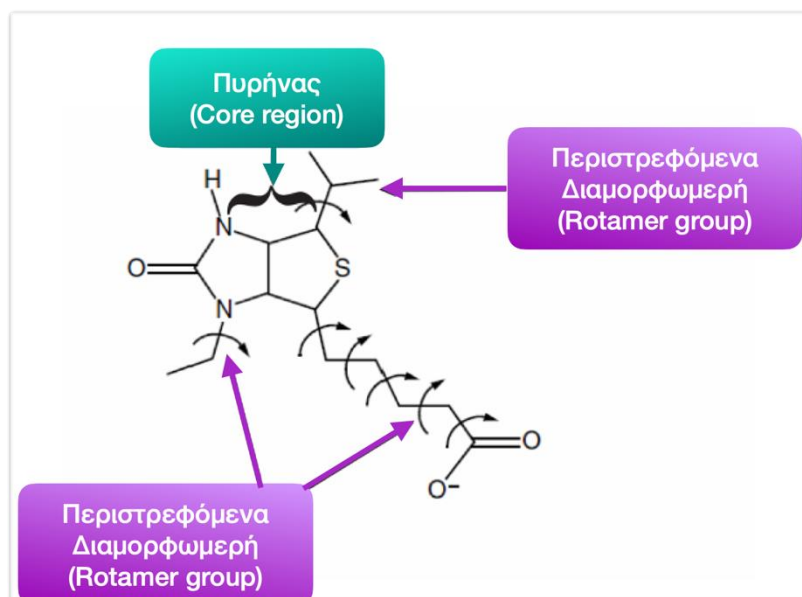
Σχήμα 8. Στάδια μελέτης μορίων που λαμβάνουν μέρος στη Μοριακή Πρόσδεση.

### 3.5.1 Ο αλγόριθμος Μοριακής Πρόσδεσης GLIDE

Ένα από τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα λογισμικά Μοριακής Πρόσδεσης είναι το GLIDE (Grid-based Ligand Docking with Energetics) του πακέτου λογισμικού Maestro της εταιρείας Schrödinger [179]. Με τη χρήση του GLIDE επιτρέπεται η πρόσδεση μικρών ευέλικτων μορίων στο ενεργό κέντρο υποδοχέα σταθερής

διαμόρφωσης και αναζητούνται οι ευνοϊκότερες αλληλεπιδράσεις προσδέτη-υποδοχέα, όπου ο υποδοχέας μπορεί να είναι μία πρωτεΐνη ή ένας μη πρωτεϊνικός συμπαράγοντας. Κατά τη χρήση του αλγόριθμου GLIDE ο προσδέτης μπορεί να θεωρηθεί άκαμπτος ή εύκαμπτος, ενώ ο υποδοχέας παραμένει άκαμπτος (επιτρέπεται μόνο η περιστροφή ορισμένων υδροξυλομάδων). Στην περίπτωση που ο προσδέτης να είναι άκαμπτος προσδένεται στον υποδοχέα ως έχει, ενώ στην περίπτωση που είναι εύκαμπτος δημιουργείται ένα σύνολο διαμορφώσεων που μπορεί να αποκτήσει πριν ακόμα ξεκινήσει η πρόσδεση.

Η ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου ενός προσδέτη αποτελεί το πρώτο βήμα της Μοριακής Πρόσδεσης με τον αλγόριθμο GLIDE, μέσω της οποίας διεξάγεται εμπειρική διαλογή όπου απορρίπτονται οι διαμορφώσεις που δεν προσαρμόζονται στην κοιλότητα που μελετάται. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για να διεξαχθεί η διαμορφωτική ανάλυση του προσδέτη είναι η Monte Carlo [180]. Κάθε προσδέτης κατά τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης χωρίζεται στην περιοχή του πυρήνα (region core) και τις περιστρεφόμενες (ή διαμορφωμερείς) ομάδες (rotamer groups) (Σχήμα 9). Κάθε περιστρεφόμενη ομάδα συνδέεται με τον πυρήνα με ένα δεσμό, ο οποίος έχει τη δυνατότητα περιστροφής και δεν περιέχει άλλους δεσμούς που μπορούν να περιστραφούν. Ως πυρήνας θεωρείται ότι απομένει μετά τον περιστρεφόμενο δεσμό, όταν αφαιρεθεί η περιστρεφόμενη ομάδα. Με τον τρόπο αυτόν κάθε περιστρεφόμενη ομάδα αναλύεται ξεχωριστά. Άτομα άνθρακα και αζώτου τα οποία συνδέονται με άτομα υδρογόνου (όπως ομάδες -CH<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH<sub>3</sub>) δεν λαμβάνονται ως περιστρεφόμενες ομάδες καθώς δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη διαμορφωτική σημασία.

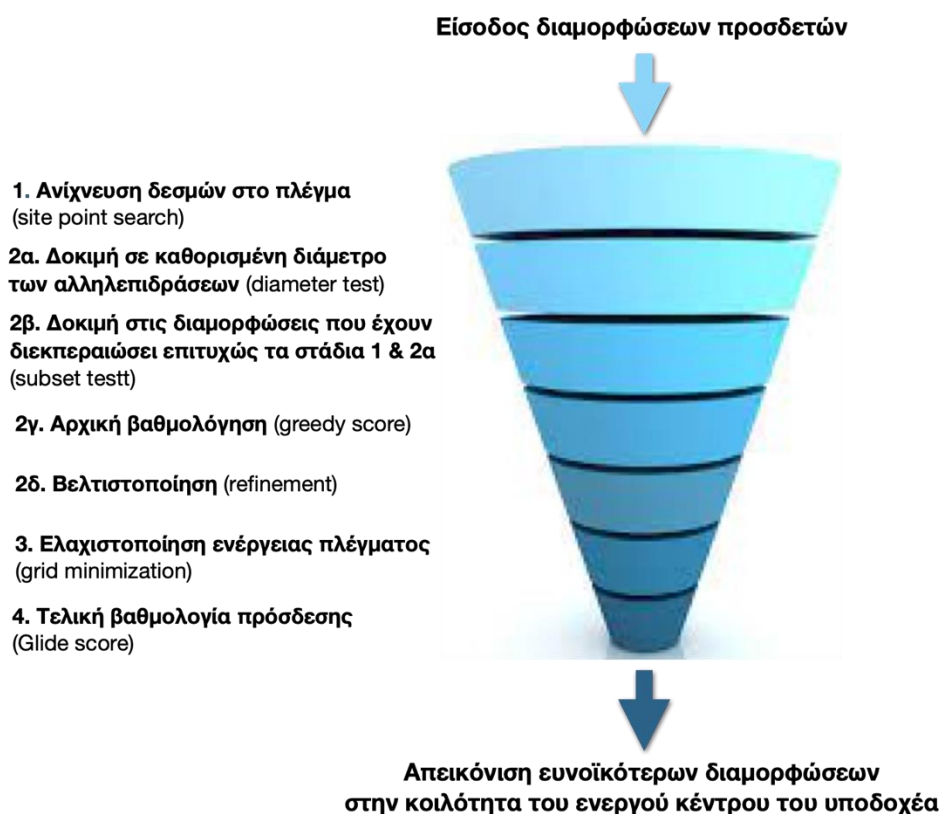


**Σχήμα 9. Προσδιορισμός περιοχών πυρήνα (core region) και διαμορφωμερών (rotamer groups).**

Επιπρόσθετα, κατά τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης, κάθε περιοχή πυρήνα αντιπροσωπεύεται από ένα σύνολο βασικών διαμορφώσεων. Το συγκεκριμένο σύνολο εξαρτάται από τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών που περιέχει, τον αριθμό των πενταμελών και εξαμελών μη αρωματικών δακτυλίων, τα οποία μπορεί να αναστρέφονται (flip), και τον αριθμό των ασύμμετρων ατόμων αζώτου με πυραμιδική γεωμετρία. Αυτό το σύνολο περιέχει συνήθως λιγότερες από 500 βασικές διαμορφώσεις, ακόμη και για αρκετά μεγάλους και ευέλικτους προσδέτες, και πολύ λιγότερες για μικρότερους και άκαμπτους προσδέτες. Στη συνέχεια, καταμετρούνται οι διαμορφώσεις που μπορεί να υιοθετήσει η κάθε περιστροφική ομάδα, και τελικά ο πυρήνας μαζί με τις διαμορφώσεις των περιστροφικών ομάδων συνδυάζονται προκειμένου να δώσουν τις τελικές διαμορφώσεις, οι οποίες θα προσδεθούν στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

Η θέση, ο προσανατολισμός και η διαμόρφωση κάθε προσδέτη που αποκτά στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα ονομάζεται «πόζα πρόσδεσης» (ligand pose). Οι πόζες πρόσδεσης που δημιουργούνται περνούν μέσα από φίλτρα ιεράρχησης, τα οποία εκτιμούν και αξιολογούν τις αλληλεπιδράσεις του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα [180]. Τα φίλτρα ιεράρχησης ελέγχουν το μέγεθος του προσδέτη και τη συμπληρωματικότητα των

αλληλεπιδράσεων του με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα χρησιμοποιώντας μία μέθοδο που βασίζεται στη θεωρία πλέγματος [181]. Οι προσανατολισμοί που ελέγχονται από τα συγκεκριμένα φίλτρα και θεωρούνται ενεργειακά ευνοϊκοί υποβάλλονται ακολούθως στο τελικό στάδιο της Μοριακής Πρόσδεσης, κατά το οποίο πραγματοποιείται εκτίμηση και ελαχιστοποίηση της ενέργειας των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέτη, χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OPLS-AA και λαμβάνοντας υπόψη τα πεδία του ενεργού κέντρου του υποδοχέα. Η τελική βαθμολόγηση διεξάγεται, στον ελαχιστοποιημένης ενέργειας προσανατολισμό του προσδέτη. Το GlideScore είναι η συνάρτηση βαθμολόγησης του GLIDE, όσο μικρότερη, δηλαδή όσο πιο αρνητική είναι η βαθμολογία αυτή, τόσο ισχυρότερη είναι η πρόσδεση του μορίου στον υποδοχέα (Σχήμα 10). Η συνάρτηση βαθμολόγησης GlideScore βασίζεται στην εμπειρική συνάρτηση βαθμολόγησης ChemScore και περιλαμβάνει επιπλέον έναν όρο για τις στερικές αλληλεπιδράσεις και ένα ακόμα πολικό άκρο, για τον περιορισμό των ηλεκτροστατικών απώσεων.



**Σχήμα 10.** Τα φίλτρα αξιολόγησης που εφαρμόζονται με τη χρήση του αλγορίθμου Glide.



Στη συνάρτηση GScore αθροίζονται τα επιμέρους αθροίσματα από τις παρακάτω συνισταμένες [180]:

$$\text{GScore} = 0.065 \cdot \text{vdW} + 0.130 \cdot \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{HBond} + \text{Metal} + \text{BuryP} + \text{RotB} + \text{Site}$$

Όπου,

**vdW**: ενέργεια των αλληλεπιδράσεων van der Waals. Ο όρος αυτός υπολογίζεται με ελαττωμένα τα αμιγή ιοντικά φορτία των ομάδων που φέρουν τυπικά φορτία, όπως είναι τα ιόντα μετάλλων, οι ομάδες καρβοξυλίου, και οι γουανιδινικές ομάδες.

**Coul**: ενέργεια Coulomb. Δίνει τη αλληλεπίδραση μεταξύ των ολικών ατομικών φορτίων.

**Lipo**: ενέργεια των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Στον όρο αυτόν υπολογίζονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

**Hbond**: ενέργεια των δεσμών υδρογόνου. Ο όρος αυτός χωρίζεται σε διαφορετικής βαρύτητας βαθμολόγηση, ανάλογα αν ο δεσμός υδρογόνου είναι μεταξύ ουδέτερου δέκτη και δότη δεσμών υδρογόνου, μεταξύ ενός ουδέτερου και ενός φορτισμένου ή μεταξύ δύο φορτισμένων ατόμων.

**Metal**: ενέργεια αλληλεπιδράσεων με μέταλλο. Μόνο οι αλληλεπιδράσεις με ανιοντικά άτομα δέκτες συμπεριλαμβάνεται σε αυτόν τον όρο. Αν το αμιγές φορτίο του μετάλλου στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα είναι θετικό, περιλαμβάνονται οι αλληλεπιδράσεις με ανιοντικά άτομα του προσδέτη, αν το αμιγές φορτίο του μετάλλου είναι μηδέν, οι αλληλεπιδράσεις δεν λαμβάνονται υπόψη.

**BuryP**: μη ευνοϊκή βαθμολόγηση των απώσεων των πολικών ομάδων.

**RotB**: μη ευνοϊκή βαθμολόγηση για τον περιορισμό περιστροφής σε δεσμούς που έχουν δυνατότητα περιστροφής.

**Site**: ενέργεια πολικών αλληλεπιδράσεων με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Ο όρος περιλαμβάνει τις πολικές αλληλεπιδράσεις με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα που δεν εμπίπτουν στους δεσμούς υδρογόνου σε μία υδρόφοβη περιοχή του ενεργού κέντρου.

Σ' ένα *in silico* πείραμα πρόσδεσης με τη χρήση του αλγορίθμου GLIDE, μπορούν να εφαρμοστούν τρία επίπεδα ακριβείας. Το επίπεδο HTVS (High Throughput Virtual Screening) διαλογής υψηλού ρυθμού απόδοσης, το οποίο είναι κατάλληλο για πολύ μεγάλες βιβλιοθήκες λόγω της τάχιστα διεξαγωγής τους. Το επίπεδο SP (Standard Precision), το οποίο παρέχει χαμηλότερο βαθμό ακριβείας αλλά είναι αρκετά ταχύ. Τέλος, το επίπεδο XP (Extra Precision), το οποίο παρέχει την υψηλότερη ακρίβεια στους υπολογισμούς, αλλά απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος. Η ακρίβεια πρόσδεσης XP συνδυάζει ένα ισχυρό πρωτόκολλο δειγματοληψίας με μία τροποποιημένη συνάρτηση βαθμολόγησης προκειμένου να αναγνωρίζει τους προσανατολισμούς του προσδέτη, οι οποίοι αναμένεται να παρουσιάσουν μη ευνοϊκή ενέργεια πρόσδεσης, βασισμένη σε πολύ γνωστές φυσικοχημικές αρχές [182]. Ο απώτερος σκοπός της XP μεθόδου είναι η απομάκρυνση των διαμορφώσεων που δίνουν λανθασμένα θετικά αποτελέσματα/βαθμολογίες και να παρέχει την ακριβέστερη βαθμολόγηση στους ευνοϊκά προσδεμένους προσανατολισμούς του προσδέτη. Συνήθως, χρησιμοποιείται το επίπεδο XP λόγω της υψηλής του ακρίβειας, την ικανότητά του να απορρίπτει ψευδώς θετικές βαθμολογίες και του συνεπούς συσχετισμού μεταξύ ευνοϊκών λύσεων και επιτυχούς βαθμολογίας. Κατά τη μέθοδο XP, στον αλγόριθμο τοποθετούνται αρχικά τμήματα του προσδέτη στο ενεργό κέντρο και έπειτα δομείται το μόριο δεσμό προς δεσμό. Οι λύσεις που προκύπτουν υποβάλλονται σε ελαχιστοποίηση ενέργειας και αξιολογούνται από τη συνάρτηση βαθμολόγησης XP [182].

### **3.5.2 Ο αλγόριθμος της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης (IFD)**

Ο αλγόριθμος της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης (Induced Fit Docking, IFD) περιλαμβάνει την προσομοίωση και την ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενός προσδέτη και ενός υποδοχέα για την πρόβλεψη της συγγένειας δέσμευσης και της γεωμετρίας τους. Η βασική διάκριση της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης από άλλους αλγορίθμους Μοριακής Πρόσδεσης έγκειται στη θεώρηση της δομικής ευελιξίας. Σε αντίθεση με τις προσεγγίσεις άκαμπτης πρόσδεσης που προϋποθέτουν σταθερές διαμορφώσεις υποδοχέα, η Επαγόμενη Μοριακή Πρόσδεσης λαμβάνει υπόψη τη δυναμική φύση της

περιοχής δέσμησης και του προσδέτη όπως προτείνεται από τη θεωρία της επαγόμενης προσαρμογής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια πιο ακριβή απεικόνιση της πραγματικής διαδικασίας δέσμησης, καταγράφοντας τις διαμορφωτικές προσαρμογές που πραγματοποιούνται καθώς ο προσδέτης και ο υποδοχέας προσαρμόζονται ο ένας στην παρουσία του άλλου.

Ο αλγόριθμος της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης διατίθεται από το πρόγραμμα Maestro της εταιρείας Schrödinger μέσω του πρωτοκόλλου IFD [183]. Το πρωτόκολλο αυτής της εφαρμογής συνδυάζει τους αλγορίθμους GLIDE και Prime επάγοντας κάποιες αλλαγές/προσαρμογές στη δομή των υποδοχέων. Παράλληλα έχει αναπτυχθεί κι ένας αλγόριθμος σε γλώσσα προγραμματισμού Python για την αυτοματοποίηση της διαδικασίας.

### **3.5.2.1 Το πρωτόκολλο της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης**

Στο Maestro, το Πακέτο λογισμικού της εταιρείας Schrödinger, υπάρχει το πρωτόκολλο Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης (IFD), το οποίο έχει σχεδιαστεί για να πραγματοποιούνται πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης, όπου λαμβάνεται υπόψη τόσο η ευελιξία του προσδέτη όσο και του υποδοχέα. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο βασίζεται στον αλγόριθμο GLIDE αλλά και στο μοντέλο βελτιστοποίησης δομής Prime, μέσω του οποίου προβλέπονται με ακρίβεια οι τρόποι πρόσδεσης του προσδέτη (ligand binding modes) και ταυτόχρονα οι δομικές αλλαγές, τις οποίες υφίσταται ο υποδοχέας. Το πρότυπο πρωτόκολλο της εταιρείας Schrödinger περιλαμβάνει πολλαπλά βήματα, τα οποία περιγράφονται παρακάτω:

#### **1. Προετοιμασία δομών προσδέτη και υποδοχέα**

Οι δομές ελέγχονται και εάν κρίνεται απαραίτητο βελτιώνονται με την προσθήκη ατόμων υδρογόνου που λείπουν ή/και με τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας των δεσμών. Συνήθως, αυτή η προετοιμασία για τους προσδέτες προτιμάται να γίνεται με τη χρήση της εφαρμογής «LigPrep», ενώ για τον υποδοχέα με τη χρήση της εφαρμογής «Protein Preparation Wizard». Αυτά τα δύο βήματα πραγματοποιούνται πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου IFD.

## 2. Επιλογή Περιοχής Πρόσδεσης

Σε αυτό το βήμα προσδιορίζεται η περιοχή πρόσδεσης των προσδετών στον υποδοχέα. Στην περίπτωση που στην τριδιάστατη δομή του υποδοχέα είναι συνκρυσταλλωμένος κάποιος προσδέτης μπορεί να επιλεχθεί αυτή η περιοχή πρόσδεσης, διαφορετικά υπάρχει η δυνατότητα επιλογής των αμινοξέων που επιθυμούμε να απαρτίσουν την περιοχή πρόσδεσης.

## 3. Αρχική πρόσδεση

Πραγματοποιείται μια αρχική πρόσδεση με άκαμπτη τη δομή του προσδέτη στην ορισμένη περιοχή πρόσδεσης χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο πρόσδεσης GLIDE. Με το GLIDE παράγονται διαφορετικές διαμορφώσεις, οι οποίες εξ' ορισμού δεν μπορούν να ξεπερνούν τις είκοσι ανά προσδέτη.

## 4. Επαγόμενη προσαρμογή

Πρόβλεψη της διαμόρφωσης των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων για το κάθε σύμπλεγμα υποδοχέα-προσδέτη, μέσω του αλγορίθμου Prime. Τα αμινοξέα αυτά βρίσκονται σε μια δεδομένη απόσταση (5Å) από την κάθε διαμόρφωση του προσδέτη. Ακόμα, μέσω του αλγορίθμου αλγορίθμου Prime, πραγματοποιείται ελαχιστοποίηση της προαναφερθείσας ομάδας αμινοξέων, καθώς και του προσδέτη για το κάθε σύμπλεγμα πρωτεΐνης-προσδέτη. Με αυτόν τον τρόπο, η δομή του υποδοχέα αντανakλά πλέον μια επαγόμενη διαμόρφωση του προσδέτη.

## 5. Βαθμολογία και κατάταξη

Οι προκύπτουσες διαμορφώσεις ταξινομούνται βάσει της βαθμολογίας IFDScore ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ), η εξίσωση της οποίας είναι:

$$IFDScore = 1.0 * GlideScore + 0.05 * Prime Energy$$

## 6. Ανάλυση και Οπτικοποίηση

Μέσω των γραφικών εργαλείων του Maestro πραγματοποιείται η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων, οπότε είναι εφικτή η αξιολόγηση όλων των αλληλεπιδράσεων.

### 3.6 Μοριακή Δυναμική

Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics, MD) είναι μια από τις βασικότερες υπολογιστικές τεχνικές του Ορθολογικού Σχεδιασμού φαρμάκων. Με τις προσομοιώσεις MD αναλύονται οι φυσικές κινήσεις ατόμων και μορίων, τα οποία αποτελούν ένα σύστημα. Τα άτομα και τα μόρια αφήνονται να αλληλεπιδράσουν για ένα σταθερό χρονικό διάστημα, δίνοντας μια άποψη της δυναμικής «εξέλιξης» του συστήματος. Ουσιαστικά, ο στόχος είναι η προσομοίωση της εξέλιξης και αλλαγής στον χρόνο ενός συστήματος για την εκτίμηση δομικών χαρακτηριστικών, θερμοδυναμικών ιδιοτήτων, ιδιοτήτων μεταφοράς και ρυθμών των δυναμικών ιδιοτήτων που λαμβάνουν χώρα σε αυτό [184].

Τα θεωρητικά θεμέλια για τη Μοριακή Δυναμική τέθηκαν στη δεκαετία του 1950 με τη μελέτη των Alder και Wainwright, οι οποίοι χρησιμοποίησαν προσομοιώσεις υπολογιστή για να μελετήσουν τη συμπεριφορά των σκληρών σφαιρών και ανέπτυξαν μεθόδους για την ολοκλήρωση των εξισώσεων κίνησης. Στη δεκαετία του 1960, η Μοριακή Δυναμική επεκτάθηκε μέσω της μελέτης υγρών και αερίων, με σημαντική τη συνεισφορά των Alder και Rahman [185] [186]. Το 1974 πραγματοποιείται από τους Rahman και Stillinger η πρώτη προσομοίωση Μοριακής Δυναμικής ενός ρεαλιστικού συστήματος, του νερού σε υγρή κατάσταση. Την ίδια δεκαετία εισάγεται ο αλγόριθμος Verlet βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια των προσομοιώσεων MD [187]. Την επόμενη δεκαετία, αναπτύχθηκαν τα εμπειρικά πεδία δυνάμεων (όπως το AMBER και το GROMOS) επιτρέποντας την ακριβέστερη μοντελοποίηση των μοριακών αλληλεπιδράσεων, και την πραγματοποίηση προσομοιώσεων μακρομορίων όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Τη δεκαετία 1990, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους McCammon και Harvey, προσομοίωση πρωτεΐνης, συγκεκριμένα του αναστολέα της παγκρεατικής θρυψίνης βοοειδών (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor, BPTI).

Η αλματώδης πρόοδος της τεχνολογίας αυξάνει διαρκώς τα όρια των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής. Η ενσωμάτωση τεχνικών μηχανικής εκμάθησης με προσομοιώσεις MD για τη βελτίωση της δειγματοληψίας και της ανάλυσης γίνεται όλο και πιο διαδεδομένη. Επίσης, οι υβριδικές προσεγγίσεις που συνδυάζουν την MD με άλλες μεθόδους προσομοίωσης όπως οι μέθοδοι

Monte Carlo ή η Κβαντομηχανική προσφέρουν νέους δρόμους για την εξερεύνηση πολύπλοκων συστημάτων.

### **3.6.1 Βασικά σημεία της θεωρίας της Μοριακής Δυναμικής**

Η Μοριακή Δυναμική περιγράφει τη δυναμική ενός μοριακού συστήματος σε ισορροπία με βάση τις αρχές της Κλασικής και Στατιστικής Μηχανικής. Στην ουσία διερευνά τη σχέση μεταξύ μικροσκοπικών καταστάσεων και μακροσκοπικών ιδιοτήτων. Η σύνδεση αυτών των δύο πραγματώνεται με τη χρήση της Στατιστικής Μηχανικής και της παραδοχής της κατανομής Maxwell – Boltzmann, την οποία ακολουθούν τα σωματίδια του συστήματος. Μέσω της κατανομής Maxwell – Boltzmann παρέχεται μια λογική προσέγγιση για τις αρχικές συντεταγμένες και ταχύτητες των σωματιδίων του συστήματος συναρτήσει της θερμοκρασίας, οι οποίες επηρεάζουν την εξέλιξη και τη συμπεριφορά του προσομοιωμένου συστήματος. Η συγκεκριμένη προσομοίωση εξέλιξης του συστήματος χρησιμοποιεί τον δεύτερο Νόμο του Νεύτωνα. Επιπρόσθετα, η κατανομή Maxwell – Boltzmann παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο διαφοροποίησης των ταχυτήτων με την πάροδο του χρόνου λόγω των αναπτυσσόμενων αλληλεπιδράσεων και των συγκρούσεων μεταξύ των σωματιδίων.

Ο υπολογισμός των ιδιοτήτων του θερμοδυναμικού συστήματος επιτυγχάνεται μέσω ενός στατιστικού συνόλου, το οποίο στηρίζεται στην Κλασική και Κβαντική Μηχανική. Ο όρος «στατιστικό σύνολο» αναφέρεται στο σύνολο των μικροσκοπικών καταστάσεων για μια μακροσκοπική ιδιότητα. Μέσω των στατιστικών συνόλων ορίζονται οι μεταβλητές που διατηρούνται σταθερές κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, παρέχοντας διαφορετικούς τρόπους μελέτης της συμπεριφοράς των σωματιδίων μέσα σε ένα σύστημα.

Στο σύνολο NVE, ο αριθμός των σωματιδίων (N), ο όγκος (V) και η συνολική Ενέργεια του συστήματος (E), διατηρούνται σταθερά. Αυτό σημαίνει ότι η προσομοίωση διεξάγεται σε ένα κλειστό, απομονωμένο σύστημα όπου η συνολική ενέργεια παραμένει σταθερή και δεν παρατηρείται ανταλλαγή θερμότητας με το περιβάλλον. Δηλαδή πραγματοποιείται μελέτη εγγενούς δυναμικής του συστήματος χωρίς καμία εξωτερική επίδραση. Στο σύνολο NVT, ο αριθμός των σωματιδίων, ο όγκος και η θερμοκρασία (T) διατηρούνται

σταθερά. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ειδικών θερμοστατών, οι οποίοι προσομοιάζουν την αλληλεπίδραση του συστήματος με ένα λουτρό θερμότητας για τον έλεγχο της θερμοκρασίας του. Το συγκεκριμένο σύνολο χρησιμοποιείται ευρέως, καθώς καταφέρνει να μιμηθεί τις πραγματικές συνθήκες. Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται στο σύνολο NPT, όπου παραμένουν σταθερά ο αριθμός των σωματιδίων, η πίεση (P) και η θερμοκρασία, με τη χρήση θερμοστατών και βαροστατών (ρύθμιση πίεσης). Ένα άλλο χρησιμοποιούμενο σύνολο είναι το μVT, όπου το χημικό δυναμικό ( $\mu$ ), ο όγκος και η θερμοκρασία διατηρούνται σταθερά. Το μVT επιλέγεται για τη μελέτη συστημάτων όπου ο αριθμός των σωματιδίων ενδέχεται να αλλάξει λόγω χημικών αντιδράσεων ή άλλων διεργασιών.

Όπως προαναφέρθηκε, η Μοριακή Δυναμική στηρίζεται στη Νευτώνεια Φυσική, και πιο συγκεκριμένα στον δεύτερο νόμο του Νεύτωνα (

$$F = m \cdot a = m \frac{d^2 r}{dt^2}).$$

Γνωρίζουμε ότι η δύναμη είναι η πρώτη παράγωγος της

δυναμικής ενέργειας, ( $F = -\nabla \cdot V(r)$ ). Εξισώνοντας αυτές τις δύο σχέσεις

προκύπτει μια διαφορική εξίσωση ( $\frac{dV(r)}{dr} = -m \frac{d^2 r}{dt^2}$ ), της οποίας το αποτέλεσμα

περιγράφει μια τροχιά. Με την ολοκλήρωση της εξίσωσης του δεύτερου νόμου του Νεύτωνα προσομοιάζεται η κίνηση των σωματιδίων σε συνάρτηση με τον χρόνο. Ένας τρόπος που χρησιμοποιείται για την επίλυση της αριθμητικής ολοκλήρωσης της εξίσωσης είναι ο αλγόριθμος Verlet, ο οποίος ξεχωρίζει για την απλότητα και την ακρίβειά του.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μια προσομοίωση MD γίνεται η παραδοχή της προσέγγισης Born – Oppenheimer, βάσει της οποίας η κίνηση των ηλεκτρονίων και των πυρήνων διαχωρίζεται δεχόμενοι ότι τα ηλεκτρόνια προσαρμόζονται ακαριαία στις θέσεις των πυρήνων. Μέσω αυτού του διαχωρισμού των χρονοδιαγραμμάτων επιτρέπεται μια σημαντική απλοποίηση των εξισώσεων που διέπουν την κίνηση του συστήματος.

Οι προσομοιώσεις MD λόγω υπολογιστικών περιορισμών πραγματοποιούνται μέσα σε πεπερασμένα πλαίσια. Οι περιοδικές οριακές συνθήκες (Periodic Boundary Conditions, PBC), δημιουργούν την ψευδαίσθηση ενός άπειρου

συστήματος αναπαράγοντας κουτιά προσομοίωσης και υπολογίζοντας τις αλληλεπιδράσεις πέρα από τα όρια. Με αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται επιφανειακά φαινόμενα.

Η εκτέλεση των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής πραγματοποιείται σε διακριτά χρονικά βήματα. Το μέγεθος του χρονικού βήματος επηρεάζει τη σταθερότητα και την ακρίβεια της προσομοίωσης, με τα μικρότερα χρονικά βήματα να προσφέρουν μεγαλύτερη ακρίβεια, αλλά υψηλότερο υπολογιστικό κόστος.

Τέλος, η ολική ενέργεια του συστήματος είναι το άθροισμα της κινητικής και δυναμικής ενέργειας, όπου η δυναμική ενέργεια μπορεί να θεωρηθεί ως το άθροισμα της ενέργειας των δεσμικών και μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 13). Η ενέργεια των δεσμικών αλληλεπιδράσεων περιλαμβάνει την ενέργεια δεσμού, των γωνιών, των διέδρων γωνιών και των ακατάλληλων διέδρων γωνιών, ενώ η ενέργεια των μη δεσμικών είναι το άθροισμα της ενέργειας των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και των αλληλεπιδράσεων van der Waals. Η ενέργεια των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων δίδεται από το δυναμικό Coulomb και η ενέργεια των αλληλεπιδράσεων van der Waals από το δυναμικό Lennard-Jones.

**Μοντελοποίηση Δυναμικής Ενέργειας**

$$E = \frac{1}{2} m\mathbf{v}^2 + V(\mathbf{r}) \quad \mathbf{F}_i = -\nabla V(\mathbf{r}) \quad V(\mathbf{r}) = E_{\text{δεσμικών}} + E_{\text{μη δεσμικών}}$$

$$E_{\text{δεσμικών}} = \sum_{\text{δεσμών}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{γωνιών}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{διέδρων γωνιών}} k_\phi (1 + \cos[n\phi - \delta]) + \sum_{\text{ακατάλληλων διέδρ. γωνιών}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2$$

$$E_{\text{μη δεσμικών}} = \sum_{i,j} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i,j} \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

Δυναμικό Coulomb

Δυναμικό Lennard-Jones

Εικόνα 13. Η μοντελοποίηση της Δυναμικής Ενέργειας στη Μοριακή Δυναμική.



### 3.6.2 Διάφορα λογισμικά προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμική

Υπάρχει πληθώρα προγραμμάτων λογισμικού για την εκτέλεση προσομοιώσεων (MD), χαρακτηριστικά αναφέρονται:

Η σουίτα προγραμμάτων **AMBER** (Assisted Model Building with Energy Refinement) εστιάζει σε προσομοιώσεις πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και άλλων μακρομορίων. Παρέχει εργαλεία για προσομοιώσεις MD, υπολογισμούς ελεύθερης ενέργειας κ.ά..

Το **GROMACS** (GROningen MAchine for Chemical Simulations) είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο και εξαιρετικά βελτιστοποιημένο πακέτο προσομοίωσης MD. Το GROMACS είναι κατάλληλο για διάφορους τύπους προσομοιώσεων, συμπεριλαμβανομένων μακρομοριακών συστημάτων και υλικών. Διατίθεται δωρεάν.

Το **Desmond** της εταιρείας Schrödinger είναι ένα εμπορικό πακέτο MD, το οποίο αναπτύχθηκε από την D. E. Shaw Research. Είναι σχεδιασμένο για προσομοιώσεις μακρομοριακών συστημάτων υψηλής απόδοσης, χαρακτηρίζεται για την ακρίβεια και την αποτελεσματικότητά του.

Το **NAMD** (Not Another Molecular Dynamics) σχεδιασμένο για μεγάλης κλίμακας προσομοιώσεις MD μακρομοριακών συστημάτων. Είναι ιδιαίτερα βελτιστοποιημένο για υπολογιστές υψηλής απόδοσης και παράλληλες προσομοιώσεις.

Το **LAMMPS** (Large-scale Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator) είναι ένας ευέλικτος κώδικας Μοριακής Δυναμικής, ο οποίος είναι κατάλληλος για ένα ευρύ φάσμα προσομοιώσεων, συμπεριλαμβανομένης της επιστήμης των υλικών και των βιολογικών συστημάτων. Είναι γνωστό για την ευελιξία και την επεκτασιμότητα του.

Το πρόγραμμα **CHARMM** (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics), χρησιμοποιείται για μακρομοριακές προσομοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων και άλλων. Προσφέρει διάφορα πεδία δύναμης, αλλά και μεθόδους για τη μελέτη μοριακών συστημάτων.

Η επιλογή του λογισμικού συχνά εξαρτάται από την εστίαση της κάθε έρευνας, το μέγεθος του συστήματος, το επιθυμητό επίπεδο ακρίβειας, τους διαθέσιμους υπολογιστικούς πόρους, αλλά και από τις προσωπικές προτιμήσεις.

### **3.6.3 Το λογισμικό προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής Desmond**

Το λογισμικό πακέτο Desmond της εταιρείας Schrödinger είναι γνωστό για την υψηλή του απόδοση και ταχύτητα στην προσομοίωση πολύπλοκων μοριακών συστημάτων. Χρησιμοποιεί προηγμένους αλγόριθμους και τεχνικές παράλληλων υπολογιστών, οι οποίες μπορούν να μειώσουν σημαντικά τον χρόνο που απαιτείται για προσομοιώσεις σε σύγκριση με άλλα λογισμικά. Επιπρόσθετα, οι αλγόριθμοι και τα πεδία δυνάμεων που χρησιμοποιούνται στο Desmond έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν ακριβείς αναπαραστάσεις των μοριακών αλληλεπιδράσεων, καθώς λαμβάνει υπόψη τις δονήσεις δεσμών, τις περιστροφές γωνιών, αλλά και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, καθιστώντας το κατάλληλο για τη μελέτη ενός ευρέος φάσματος βιολογικών συστημάτων και χημικών διεργασιών. Παρέχοντας τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί αποτελεσματικά πόρους υπολογιστών υψηλής απόδοσης (High - Performance Computing, HPC), επιτρέπει την προσομοίωση μεγαλύτερων και πιο πολύπλοκων συστημάτων ή την εκτέλεση πολλαπλών προσομοιώσεων παράλληλα. Ένα ακόμα βασικό πλεονέκτημα του λογισμικού Desmond είναι η ενσωμάτωσή του με τη σουίτα Schrödinger, η οποία περιλαμβάνει ποικιλία εργαλείων Υπολογιστικής Χημείας. Με την συγκεκριμένη ενσωμάτωση επιτρέπεται η ολοκληρωμένη προσέγγιση για την ανακάλυψη φαρμάκων και τη μοριακή ανάλυση, συνδυάζοντας προσομοιώσεις MD με άλλες υπολογιστικές μεθόδους. Επίσης, το εν λόγω πρόγραμμα μέσω της επιφάνειας Maestro παρέχει τη δυνατότητα ρύθμισης και παραμετροποίησης του συστήματος κάνοντάς το εξαιρετικά φιλικό προς τον χρήστη.

Τα βασικά βήματα μιας προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής με τη χρήση του Desmond από την επιφάνεια του Maestro είναι τα ακόλουθα (Σχήμα 11) [188][189]:

### ✓ Προετοιμασία συστήματος

Σε αυτό το βήμα προετοιμάζεται η αρχική δομή. Για την προετοιμασία της δομής της πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί το πρόγραμμα Protein Preparation Wizard, το οποίο περιλαμβάνει την αφαίρεση ιόντων και μορίων (μπορεί να προέκυψαν από την κρυστάλλωση), τη διόρθωση τάξεων δεσμών, την προσθήκη ατόμων υδρογόνου, τη συμπλήρωση τυχόν πλευρικών αλυσίδων ή αμινοξέων που λείπουν, τη βελτιστοποίηση των δεσμών υδρογόνου με προσαρμογή καταστάσεων πρωτονίωσης των αμινοξέων, και τελικά τη σχολαστική επαλήθευση της τροποποιημένης δομής. Έπεται η δημιουργία ενός επιδιδυλωμένου συστήματος κατάλληλο για προσομοίωση, διασφαλίζοντας ότι τα μοριακά συστατικά είναι βυθισμένα σε περιβάλλον διαλύτη. Η επιλογή του διαλύτη περιλαμβάνει τέσσερα μοντέλα ύδατος (SPC, TIP3P, TIP4P και TIP4PEW), καθώς και τρεις οργανικούς διαλύτες: μεθανόλη, οκτανόλη και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Εισάγονται ιόντα με θετικά ή αρνητικά φορτία για να εξουδετερωθεί το σύστημα και, εάν κρίνεται απαραίτητο, ενσωματώνονται επιπλέον ιόντα για να δημιουργηθεί η επιθυμητή ιοντική ισχύς.

### ✓ Ελαχιστοποίηση ενέργειας

Σε αυτό το στάδιο εκτελείται ελαχιστοποίηση ενέργειας για την χαλάρωση της αρχικής διαμόρφωση, ώστε να εξαλειφθούν τυχόν στερεοχημικές συγκρούσεις ή δυσμενείς αλληλεπιδράσεις. Επίσης, σε αυτό το σημείο πραγματοποιείται εύρεση του ελάχιστου του συστήματος.

### ✓ Εξισορρόπηση συστήματος

Η εξισορρόπηση του συστήματος είναι μια κρίσιμη διαδικασία στις προσομοιώσεις MD, καθώς μέσω αυτού του βήματος επιτρέπεται στο προσομοιωμένο σύστημα να φτάσει σε μια σταθερή και αντιπροσωπευτική κατάσταση πριν προχωρήσει στη φάση παραγωγής. Αυτό διασφαλίζει ότι οι αρχικές συνθήκες και τα τεχνητά αποτελέσματα από την εγκατάσταση δεν επηρεάζουν αδικαιολόγητα τα αποτελέσματα της προσομοίωσης. Η εξισορρόπηση περιλαμβάνει την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ της εσωτερικής ενέργειας του συστήματος και των εξωτερικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία και η πίεση

Η εξισορρόπηση της θερμοκρασίας (T) και της πίεσης (P) στις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής είναι σημαντικές, καθώς πρέπει να διασφαλιστεί ότι το σύστημα θα φτάσει σε μια σταθερή κατάσταση πριν από την φάση παραγωγής. Η εξισορρόπηση επιτρέπει στο σύστημα να προσαρμόζεται σταδιακά στις επιθυμητές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης.

Για την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας του συστήματος, χρησιμοποιείται ένας αλγόριθμος θερμοστάτη (Berendsen ή Nose-Hoover), με τη χρήση του οποίου ελέγχεται η θερμοκρασία αναβαθμίζοντας τις ταχύτητες των ατόμων στην προσομοίωση με βάση την απόκλισή τους από την επιθυμητή θερμοκρασία, και με αυτό τον τρόπο το σύστημα αποκτά την επιθυμητή θερμοκρασία σταδιακά. Κατά τη φάση της εξισορρόπησης της θερμοκρασίας, η κινητική ενέργεια του συστήματος (που σχετίζεται με τη θερμοκρασία) εξισορροπείται με τη δυναμική του ενέργεια (που σχετίζεται με τις μοριακές αλληλεπιδράσεις).

Τα συστήματα που προσομοιάζονται σε σταθερή πίεση (σύνολο NPT), η εξισορρόπηση της πίεσης είναι απαραίτητη. Ο έλεγχος της πίεσης επιτυγχάνεται συχνά χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο βαροστάτη, όπως ο βαροστάτης Berendsen ή ο βαροστάτης Parrinello-Rahman. Στην ουσία, ο βαροστάτης προσαρμόζει τις διαστάσεις της κυψέλης προσομοίωσης προς διατήρηση της επιθυμητής πίεσης. Εάν η πίεση αποκλίνει από τον στόχο, ο βαροστάτης εφαρμόζει έναν παράγοντα κλιμάκωσης στις διαστάσεις του στοιχείου για να το επαναφέρει στην επιθυμητή τιμή.

Επιτρέποντας στο σύστημα να προσαρμόζεται σταδιακά στις επιθυμητές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, αποφεύγονται απότομες αλλαγές που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μη ρεαλιστική συμπεριφορά ή άλλα προβλήματα στη φάση παραγωγής της προσομοίωσης που έπεται. Είναι σημαντική η επιλογή των κατάλληλων αλγορίθμων θερμοστάτη και βαροστάτη ώστε να επιτευχθεί μια ομαλή και ακριβής διαδικασία εξισορρόπησης.

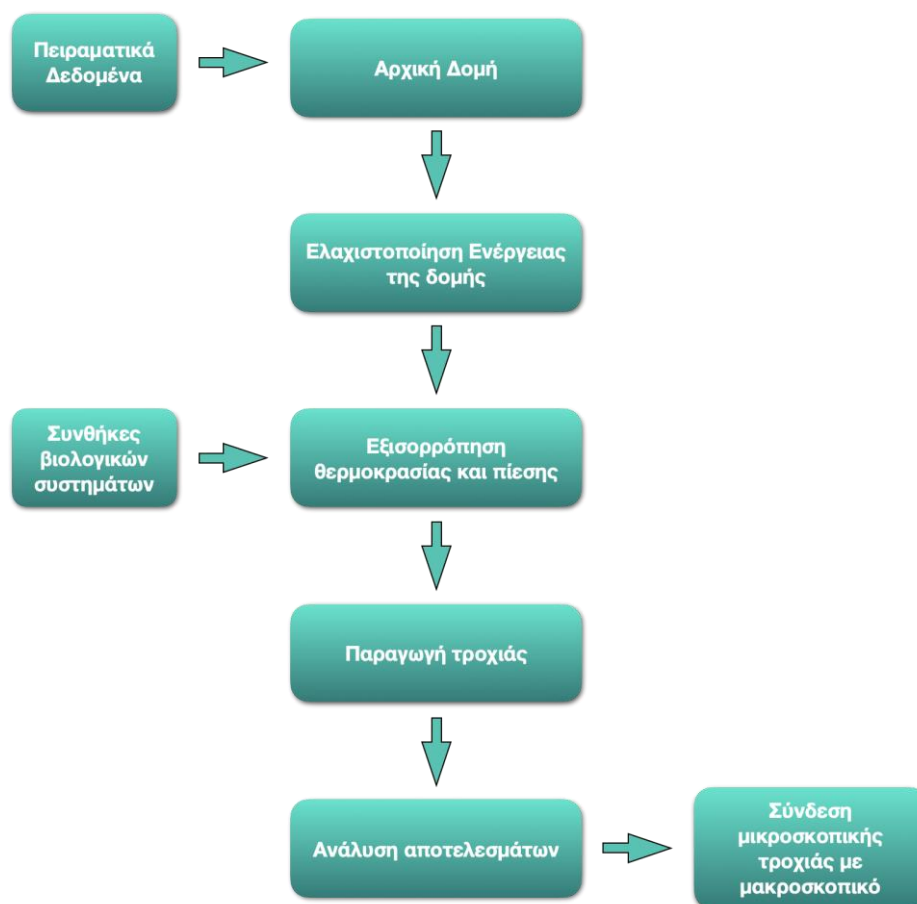
#### ✓ **Φάση παραγωγής**

Μετά την εξισορρόπηση του συστήματος πραγματοποιείται το κύριο βήμα, η φάση παραγωγής της προσομοίωσης, όπου ορίζεται η συνολική διάρκεια της

προσομοίωσης. Κατά τη διάρκεια της, το σύστημα εξελίσσεται υπό την επίδραση των καθορισμένων δυνάμεων και αλληλεπιδράσεων.

#### ✓ **Ανάλυση αποτελεσμάτων**

Η ανάλυση της προσομοίωσης πραγματοποιείται με τη χρήση του Trajectory Viewer, αλλά και μέσω άλλων εργαλείων ανάλυσης.

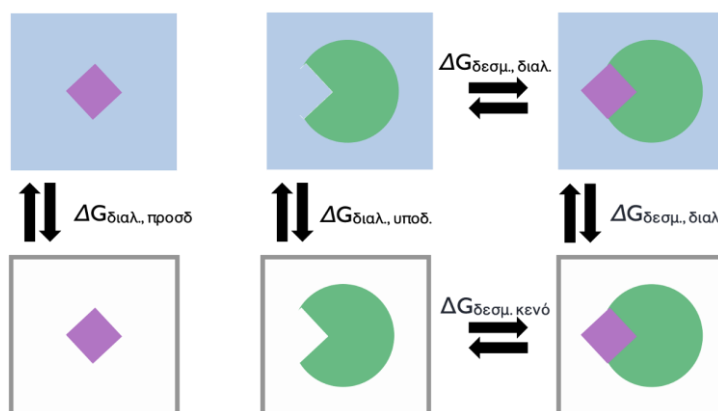


Σχήμα 11. Τα βασικά βήματα μιας προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής.

#### 3.6.4 Η μέθοδος Prime MM-GBSA

Η μέθοδος Prime Molecular Mechanics Generalized Born (MM-GBSA) χρησιμοποιείται για τη μελέτη της θερμοδυναμικής των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-προσδέτη, προκειμένου να βοηθήσει τις προσπάθειες ανακάλυψης φαρμάκων προβλέποντας τη συγγένεια δέσμευσης πιθανών υποψήφιων φαρμάκων. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον υπολογισμό της ενέργειας των σχηματιζόμενων αλληλεπιδράσεων του συμπλέγματος πρωτεΐνης-προσδέτη

λαμβάνοντας υπόψη τον διαλύτη. Για να επιτευχθεί αυτό το σύμπλεγμα διασπάται σε υποδοχέας και προσδέτης, έπειτα υπολογίζονται οι επιμέρους ενέργειες βάσει του θερμοδυναμικού κύκλου όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.



**Σχήμα 12.** Ο θερμοδυναμικός κύκλος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συνολικής ελεύθερης ενέργειας δέσμευσης του συστήματος λαμβάνοντας υπόψη τον διαλύτη.

Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί το μοντέλο επιλύσεως VSGB [190][191][192]. Εν συντομία, η μέθοδος MM-GBSA υπολογίζει την ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης ( $\overline{\Delta G_{bind}}$ ) μεταξύ ενός υποδοχέα και ενός προσδέτη για κάθε επιλεγμένο πλαίσιο τροχιάς ως:

$$\overline{\Delta G_{bind}} = G_{complex} - (G_{receptor} + G_{ligand})$$

όπου τα  $\overline{G_{complex}}$ ,  $\overline{G_{receptor}}$  και  $\overline{G_{ligand}}$  δηλώνουν την απόλυτη ελεύθερη ενέργεια του συμπλέγματος, του υποδοχέα και του προσδέτη, αντίστοιχα. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδέα ότι όταν προσδένεται ένας προσδέτης με τον υποδοχέα δεσμεύουν ελεύθερη ενέργεια, η οποία μπορεί να αποδοθεί με ακρίβεια συνδυάζοντας τη Μοριακή Μηχανική ( $\overline{\Delta E_{MM}}$ ) που δίδεται από το άθροισμα (α) της μεταβολής της εσωτερικής ενέργειας ( $\overline{\Delta E_{int}}$ ), (β) την ενέργεια των αλληλεπιδράσεων van der Waals ( $\overline{\Delta E_{vdw}}$ ), και (γ) την ηλεκτροστατική ενέργεια ( $\overline{\Delta E_{elec}}$ ), τις πολικές ( $\overline{\Delta G_{solv,p}}$ ), και τις μη πολικές ( $\overline{\Delta G_{solv,np}}$ ) αλληλεπιδράσεις:

$$\Delta G_{bind} = \Delta E_{MM} + \Delta G_{solv,p} + \Delta G_{solv,np} - T\Delta S$$

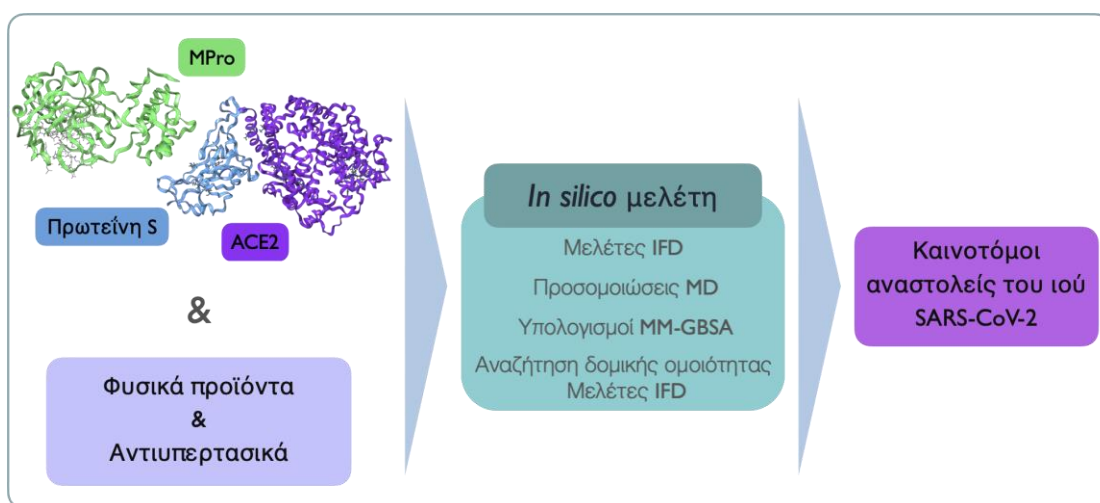
Η μέθοδος Prime-MM-GBSA αξιολογεί τις δεσμικές και μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις από το πεδίο δυνάμεων της πρωτεΐνης OPLS-AA χρησιμοποιώντας μια ποικιλία όρων διόρθωσης που βασίζονται στη φυσική, συμπεριλαμβανομένων όρων για βελτιωμένο χειρισμό αλληλεπιδράσεων στοίβαξης  $\pi$  και δεσμών υδρογόνου. Το μοντέλο διαλύτη βασίζεται στη μέθοδο γενικευμένης γεννήσεως μεταβλητής διηλεκτρικής επιφάνειας (VD-SGB), όπου η μεταβλητή διηλεκτρική τιμή για κάθε αμινοξύ προσαρμόζεται σε σημαντικό αριθμό προβλέψεων πλευρικής αλυσίδας. Ένας παραμετροποιημένος υδρόφοβος όρος χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της μη πολιτικής ενέργειας χωρίς διαλυτοποίηση.

## Σκοπός της Διδακτορικής Διατριβής

Η COVID-19 είναι μια συνεχιζόμενη πανδημία, η οποία απειλεί τη δημόσια υγεία παγκοσμίως με αποτέλεσμα να έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας και της φαρμακευτικής βιομηχανίας προκειμένου να ανακαλυφθούν δραστικά μόρια έναντι του ιού SARS-CoV-2.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών έναντι της Κύριας Πρωτεΐνης, και της δομικής πρωτεΐνης Ακίδας ενωμένης με το μετατρεπτικό ένζυμο της Αγγειοτασίνης II (ACE2) του ιού SARS-CoV-2. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού συνδυάστηκαν η μέθοδος της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης και της Μοριακής Δυναμικής. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί MM-GBSA για να αξιολογηθεί περαιτέρω η δεσμευτική συγγένεια των ενώσεων με τις πρωτεΐνες - στόχους.

Στο σχήμα που ακολουθεί αναπαρίσταται συνοπτικά η *in silico* μελέτη που ακολουθήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η οποία έχει τελικό στόχο τον εντοπισμό νέων ενώσεων που μπορούν επιλεκτικά να αναστείλουν την ενζυματική δραστηριότητα της Mpro, αλλά και να διαταράξουν τη σύνδεση της πρωτεΐνης S με τον υποδοχέα ACE2 των κυττάρων ξενιστή.





## Κεφάλαιο 4

### ***In silico* μελέτες φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών κατά της Κύριας Πρωτεάσης και της Πρωτεΐνης Ακίδας του ιού SARS-CoV-2**

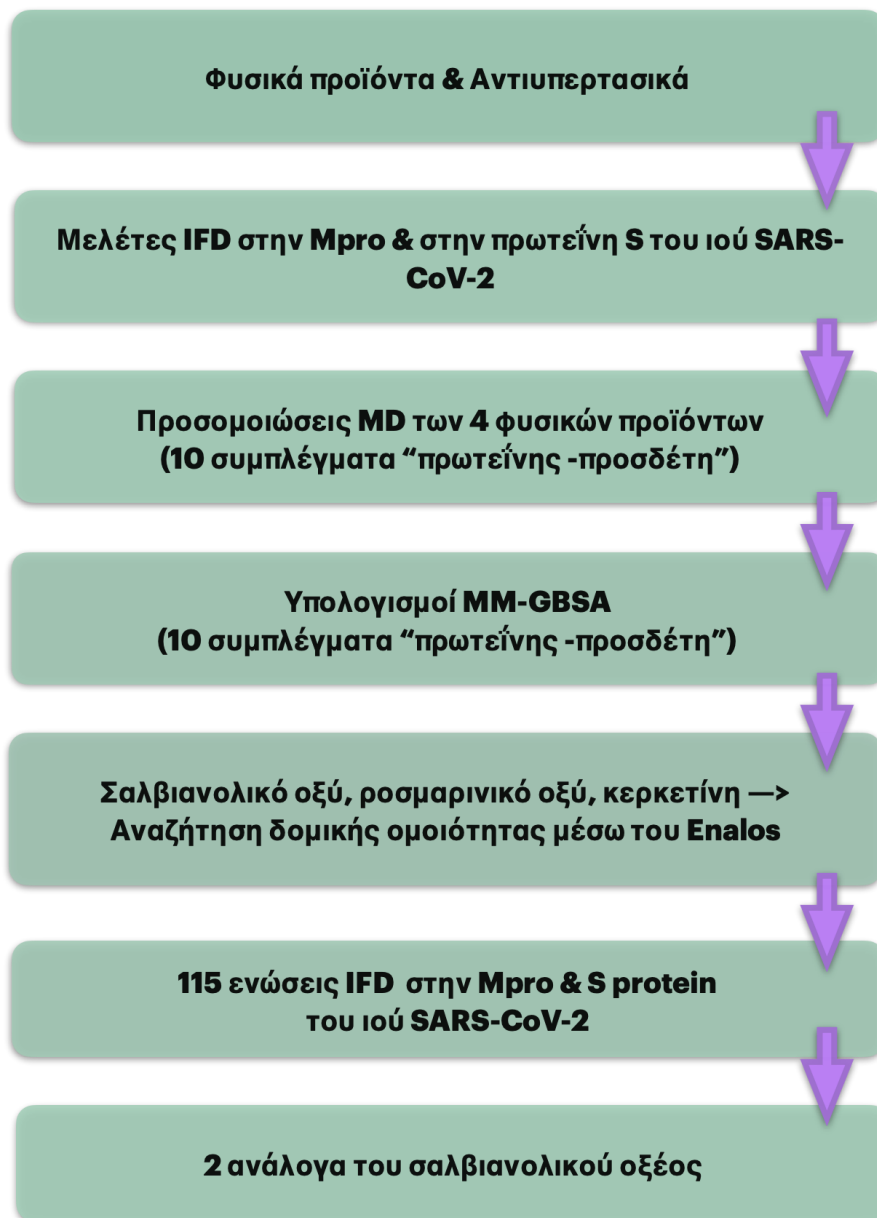
#### **4.1 Εισαγωγή**

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ροή εργασίας πολλαπλών βημάτων, στην οποία συνδυάζονται η Επαγόμενη Μοριακή Πρόσδεση και η Μοριακή Δυναμική. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθούν οι αλληλεπιδράσεις φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών φαρμάκων έναντι της μη δομικής πρωτεΐνης Mpro και της δομικής πρωτεΐνης S ενωμένης με το μετατρεπτικό ένζυμο της Αγγειοτασίνης II (ACE2), του ιού SARS-CoV-2, προκειμένου να εντοπιστούν καινοτόμοι αναστολείς που θα οδηγήσουν στη θεραπεία της COVID-19.

Οι ενώσεις που μελετήθηκαν ανήκουν σε δυο κατηγορίες, αυτή των φυσικών προϊόντων και των αντιυπερτασικών, οι οποίες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εμφανίζονται ως εξαιρετικά υποσχόμενες ενώσεις για τη θεραπεία του SARS-CoV-2, είτε μόνες τους είτε σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες. Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν ελκυστικό στόχο για τον Ορθολογικό Σχεδιασμό φαρμάκων λόγω των ποικίλων βιολογικών δράσεων που εμφανίζουν. Τα αντιυπερτασικά, τα οποία μελετήθηκαν αποτελούν ανταγωνιστές του AT1 της Αγγειοτασίνης II (Angiotensin Receptor Blockers, ARBs). Η δράση των συγκεκριμένων αντιυπερτασικών φαρμάκων έναντι του SARS-CoV-2 μελετάται από την παγκόσμια ερευνητική κοινότητα, γεγονός που οφείλεται στον μηχανισμό δράσης τους και πιο συγκεκριμένα στην αναστολή της Αγγειοτασίνης II στο σύστημα Ρενίνης – Αγγειοτασίνης (RAS).

Η υπολογιστική ροή εργασίας που ακολουθήθηκε με σκοπό την πρόταση νέων φαρμάκων με υψηλή δραστικότητα, και βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες έναντι του ιού SARS-CoV-2 απεικονίζεται γραφικά στο Σχήμα 12. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης ώστε να αξιολογηθεί η δεσμευτική ικανότητα των υπό μελέτη φυσικών

προϊόντων και αντιυπερτασικών έναντι των πρωτεϊνών Mpro και S (ενωμένη με το ACE2) του ιού SARS-CoV-2, σε μια περιοχή πρόσδεσης για την Mpro και για τρεις διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης για την πρωτεΐνη S ενωμένη με το ACE2. Στην πορεία, τα συμπλέγματα «πρωτεΐνης – προσδέτη» που εμφάνισαν την ισχυρότερη πρόσδεση μελετήθηκαν περαιτέρω μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, ώστε να ελεγχθεί η σταθερότητα των αλληλεπιδράσεων συναρτήσει του χρόνου. Επιπρόσθετα, για να αποκτήσουμε μια σαφέστερη εικόνα της δεσμευτικής ικανότητας των μελετώμενων μορίων πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς MM-GBSA. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα προχωρήσαμε σε αναζήτηση δομικής ομοιότητας των ενώσεων που εμφάνισαν την ευνοϊκότερη πρόσδεση με τη χρήση του Enalos Suite της εταιρείας NovaMechanics Ltd. Από την αναζήτηση δομικής ομοιότητας παρήχθησαν 115 ενώσεις, οι οποίες μελετήθηκαν με πειράματα IFD για να αξιολογηθεί η δεσμευτική τους ικανότητα με τις δυο πρωτεΐνες του ιού SARS-CoV-2, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδο και αναπαραγωγή του στα κύτταρα ξενιστές. Τέλος, η *in silico* μελέτη μας κατέληξε στον εντοπισμό πιθανών αναστολέων πολλαπλής στόχευσης για την αντιμετώπιση της COVID-19.



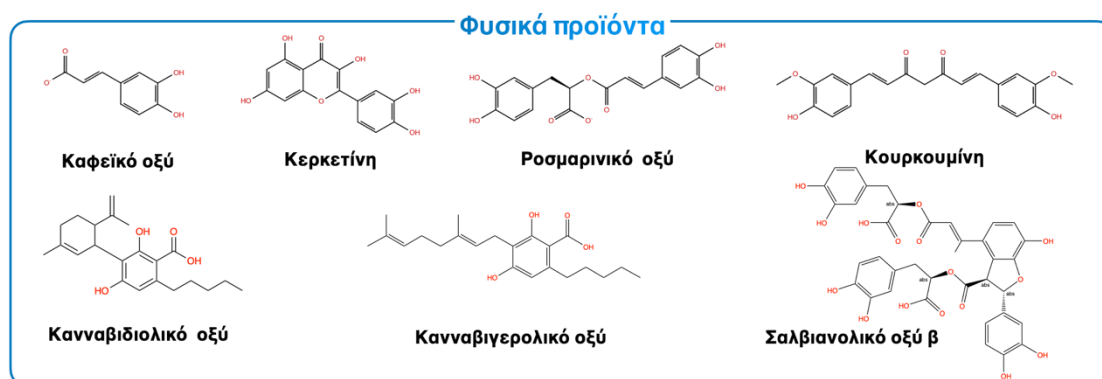
Σχήμα 13. Η υπολογιστική ροή εργασίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τον εντοπισμό νέων ενώσεων για τη θεραπεία της COVID-19. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μελέτες IFD για να αξιολογηθεί η δεσμευτική ικανότητα των μελετώμενων μορίων με τις πρωτεΐνες Mpro και S του ιού SARS-CoV-2. Ακολούθως, μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής μελετήθηκαν ενδελεχώς οι αλληλεπιδράσεις του συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης – προσδέτη» που εμφάνισαν την ευνοϊκότερη πρόσδεση σύμφωνα με τα αποτελέσματα του IFD. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί MM-GBSA για τη σαφέστερη αξιολόγηση της δεσμευτικής τους ικανότητας. Τέλος, μέσω προγράμματος Enalos διενεργήθηκε αναζήτηση δομικής ομοιότητας, έχοντας ως βάση τα τρία φυσικά προϊόντα που εμφάνισαν ισχυρή πρόσδεση με τις πρωτεΐνες Mpro και S του ιού SARS-CoV-2, όπου παρήχθησαν 115 ενώσεις. Τέλος, αυτές οι ενώσεις μελετήθηκαν με πειράματα IFD.

## 4.2 Επιλογή και προετοιμασία των αναστολέων

### 4.2.1 Τα φυσικά προϊόντα

Ως φυσικό προϊόν χαρακτηρίζεται μια ένωση ή ουσία που προέρχεται από έναν ζωντανό οργανισμό και απαντάται στη φύση. Σ' ένα ευρύτερο πλαίσιο, τα φυσικά προϊόντα περιλαμβάνουν κάθε ουσία που παράγεται από ζωντανούς οργανισμούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι φυσικά προϊόντα μπορούν επίσης να δημιουργηθούν τεχνητά μέσω χημικής σύνθεσης, η οποία περιλαμβάνει τόσο τη μερική σύνθεση (ημισύνθεση) όσο και την πλήρη σύνθεση (ολική σύνθεση) [193]. Τα φυσικά προϊόντα αποτελούν έναν ελκυστικό στόχο για τον Ορθολογικό Σχεδιασμό φαρμάκων λόγω της δομικής ποικιλομορφίας, της εξελικτικής βελτιστοποίησης, της αποδεδειγμένης βιολογικής δραστηριότητας και της προσαρμοστικότητας στις σύγχρονες τεχνικές ανάπτυξης φαρμάκων. Η αξιοποίηση των μοναδικών ιδιοτήτων των φυσικών προϊόντων δίδει τη δυνατότητα ανακάλυψης νέων και αποτελεσματικών θεραπευτικών ενώσεων.

Τα φυσικά προϊόντα αντιπροσωπεύουν μια τεράστια και ποικιλόμορφη πηγή χημικών δομών, που κυμαίνονται από απλές ενώσεις έως πολύπλοκα μόρια. Αυτή η ποικιλομορφία παρέχει μια πλούσια δεξαμενή πιθανών υποψηφίων φαρμάκων προς εξερεύνηση, αυξάνοντας την πιθανότητα εύρεσης ενώσεων που αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με συγκεκριμένους βιολογικούς στόχους. Επίσης, διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, καθώς και αντικαρκινικές ιδιότητες, και πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν την πιθανή αντιική τους δράση έναντι των ιών SARS-CoV και MERS-CoV [194, 195, 196, 197, 198].



Εικόνα 14. Οι 2D δομές των φυσικών προϊόντων της παρούσας μελέτης.

Το καφεϊκό οξύ, η κερκετίνη, η κουρκουμίνη, το ροσμαρινικό οξύ, το σαλβιανολικό οξύ β, το κανναβιδιολικό και κανναβιγελορικό οξύ αποτελούν τα φυσικά προϊόντα που μελετήθηκαν στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή (Εικόνα 14).

#### **4.2.1.1 Το καφεϊκό οξύ**

Το καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυκιναμωμικό οξύ) ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών οξέων και βρίσκεται σε αφθονία στη φύση. Έχει μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, και αντικαρκινικές του ιδιότητες [199, 200]. Επιπλέον, πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι το καφεϊκό οξύ παρουσιάζει σημαντική αντιδιαβητική δραστηριότητα στους νεφρούς των διαβητικών ποντικών [201]. Στην μελέτη τους οι Li *et. al.* αναφέρουν ότι το καφεϊκό οξύ μπορεί να βελτιώσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, και να δρα προστατευτικά σε πιθανή βλάβη του DNA [202]. Τέλος, η αντικαρκινική του δράση υπογραμμίζεται από τη μελέτη των Prasad *et. al.* καθώς αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινοσαρκώματος του HT-1080 [203].

#### **4.2.1.2 Η κερκετίνη**

Η κερκετίνη είναι ένα φυσικό флаβονοειδές, το οποίο βρίσκεται σε αφθονία σε φρούτα, λαχανικά και δημητριακά, και παρουσιάζει μια σειρά από δυνητικά ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία [204]. Οι ισχυρές αντιοξειδωτικές της ιδιότητες την καθιστούν ισχυρό σύμμαχο κατά του οξειδωτικού στρες, το οποίο εμπλέκεται σε διάφορες χρόνιες παθήσεις. Οι αντιφλεγμονώδεις ικανότητες της μπορεί να βοηθήσουν στη μείωση της φλεγμονής στο σώμα, συμβάλλοντας στη συνολική ευεξία και ενδεχομένως βοηθά σε καταστάσεις που συνδέονται με χρόνια φλεγμονή. Επιπλέον, εμφανίζεται ως εξαιρετικά υποσχόμενη για την ορθή καρδιακή λειτουργία καθώς μπορεί δυνητικά να μειώσει την αρτηριακή πίεση και βελτιώσει τη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων. Οι αντιικές της ιδιότητες, αλλά και η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον για τον ρόλο της στην καταπολέμηση των ιογενών λοιμώξεων. Πολυάριθμες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί εξετάζοντας τις αντιικές ιδιότητες της κερκετίνης έναντι του

ιού SARS-CoV-2 [205, 206, 207, 208, 209]. Επιπρόσθετα, ερευνώνται οι επιδράσεις της στην πρόληψη του καρκίνου, στη γνωστική υγεία και στην απόδοση άσκησης [203].

#### **4.2.1.3 Η κουρκουμίνη**

Η κουρκουμίνη, μια φυσική ένωση που βρίσκεται στον κουρκουμά, έχει συγκεντρώσει την προσοχή για τα πιθανά οφέλη της για την υγεία. Εμφανίζει ισχυρές αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη μείωση της φλεγμονής και του οξειδωτικού στρες στο σώμα. Αυτές οι ιδιότητες μπορεί να την κάνουν πολύτιμο σύμμαχο στην πρόληψη και τη διαχείριση διαφόρων χρόνιων παθήσεων, οι οποίες συνδέονται με τη φλεγμονή [210]. Η κουρκουμίνη έχει επίσης μελετηθεί για τη δυνατότητά της να υποστηρίζει την υγεία των αρθρώσεων και να ανακουφίζει τα συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [210]. Επιπλέον, μπορεί να διαδραματίσει ρόλο στην ορθή λειτουργία της καρδιάς βελτιώνοντας τη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων και μειώνοντας τους παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με καρδιαγγειακές παθήσεις [210]. Έρευνες δείχνουν ότι η κουρκουμίνη μπορεί να λειτουργεί νευροπροστατευτικά και να ωφελήσει τη γνωστική υγεία καθυστερώντας πιθανώς τη γνωστική έκπτωση που σχετίζεται με την ηλικία [210]. Επιπλέον, ορισμένες μελέτες υπογραμμίζουν τις δυνατότητες της κουρκουμίνης στην πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου [211]. Αξίζει να σημειωθεί ότι και η κουρκουμίνη έχει μελετηθεί ως πιθανός αναστολέας του ιού SARS-CoV-2 [205, 206].

#### **4.2.1.4 Το ροσμαρινικό οξύ**

Το ροσμαρινικό οξύ, μια φυσική πολυφαινόλη που βρίσκεται σε διάφορα βότανα και φυτά όπως το δεντρολίβανο, τον βασιλικό και το βάλαμο λεμονιού, έχει πρόσφατα κεντρίσει το ενδιαφέρον λόγω των πιθανών αντιικών ιδιοτήτων του, ειδικά κατά του ιού SARS-CoV-2 [212, 213]. Αυτό το φυσικό προϊόν παρουσιάζει σημαντικές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, οι οποίες μπορούν να συμβάλουν στη συνολική υγεία και ευεξία. Έχει αποδειχθεί ότι δρα νευροπροστατευτικά στις επαγόμενες νευρωνικές βλάβες κυττάρων N2A, οι οποίες προκαλούνται από H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [214]. Επίσης, εμφανίζει

αντιμεταλλαξιγόνες ιδιότητες έναντι του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου ντοξορουμπικίνη (doxorubicin) [215], αντιβακτηριδιακή συνέργεια με αντιβιοτικά [216], και είναι πιθανό να δρα ρυθμιστικά στην αναστολή της έκφρασης της 2,3-διοξυγενάσης ινδολαμίνης των δενδριτικών κυττάρων [217]. Επιπλέον, η αντιική του δράση εμφανίζεται ως εξαιρετικά υποσχόμενη, καθώς πολυάριθμες μελέτες δείχνουν ότι μπορεί να αναστείλει την αναπαραγωγή ορισμένων ιών, όπως του ιού της ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας, καθιστώντας το δυνητικά πολύτιμο συστατικό για την καταπολέμηση των ιογενών λοιμώξεων [218]. Ενώ απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών και του εύρους των αντιικών επιδράσεών του, τα πολύπλευρα οφέλη του ροσμαρινικού οξέος το καθιστούν ένα ενδιαφέρον φυσικό προϊόν για την πρόληψη και τη θεραπεία ιογενών ασθενειών.

#### **4.2.1.5 Το κανναβιδιολικό οξύ**

Το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) είναι μια ένωση κανναβινοειδών που βρίσκεται σε ακατέργαστα, μη θερμαινόμενα φυτά κάνναβης, το οποίο αρχίζει να κερδίζει αναγνώριση για τα ενδιαφέροντα οφέλη του ως προς την υγεία. Αν και δεν έχει μελετηθεί εκτενώς όπως η κανναβιδιόλη (CBD), οι αναδυόμενες έρευνες δείχνουν ότι το CBDA ενδέχεται να εμφανίζει θεραπευτικές δυνατότητες, ιδιαίτερα στην αντιμετώπιση διαφόρων μορφών ναυτίας και εμέτου. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι το CBDA μπορεί να είναι ένα ισχυρό αντιεμετικό, καθιστώντας το δυνητικά πολύτιμο φυσικό φάρμακο για καταστάσεις όπως ναυτία, ναυτία που προκαλείται από χημειοθεραπεία ή πρωινή ναυτία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [219]. Επιπρόσθετα, ενδέχεται να εμφανίζει θεραπευτικά οφέλη για καταστάσεις όπως η επιληψία, το άγχος, η φλεγμονή, καθώς και αντιικές ιδιότητες [220, 221].

#### **4.2.1.6 Το κανναβιγερολικό οξύ**

Το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA), ένα πρόδρομο κανναβινοειδές του φυτού της κάνναβης, παρουσιάζει ενδιαφέροντα πιθανά θεραπευτικά οφέλη, αν και βρίσκεται ακόμα στα αρχικά στάδια της έρευνας. Πιστεύεται ότι διαθέτει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, καθιστώντας το υποψήφιο για καταστάσεις που

χαρακτηρίζονται από χρόνια φλεγμονή όπως η αρθρίτιδα [222]. Επιπλέον, το CBGA μπορεί να εμφανίζει νευροπροστατευτικά αποτελέσματα, με πιθανές εφαρμογές του σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες [222]. Οι αλληλεπιδράσεις του με το ενδοκανναβινοειδές σύστημα αυξάνουν επίσης την προοπτική σταθεροποίησης της διάθεσης και μείωσης του άγχους [222]. Οι πρώτες μελέτες υποδηλώνουν ακόμη και τη δυνατότητα του CBGA στην αναστολή της ανάπτυξης καρκινικών κυττάρων, αν και περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για επιβεβαίωση. Στη διαχείριση του πόνου και ως αντιβακτηριδιακός παράγοντας, το CBGA εμφανίζεται ως εξαιρετικά υποσχόμενο. Τέλος, υπήρξαν έρευνες που μελέτησαν την αντιική του δράση έναντι του ιού SARS-CoV-2 [220, 221].

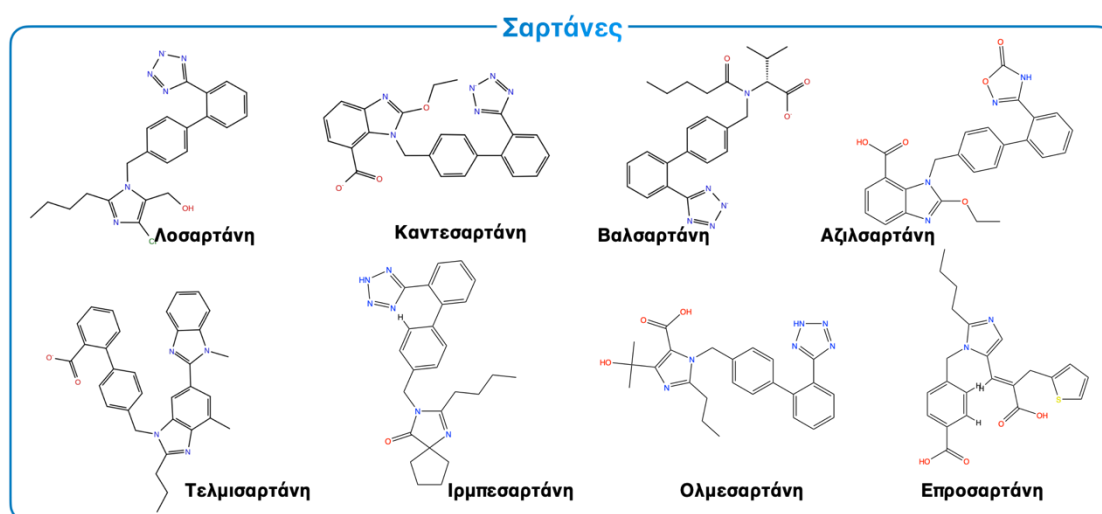
#### **4.2.1.7 Το σαλβιανολικό οξύ β**

Το σαλβιανολικό οξύ Β, μια φυσική πολυφαινολική ένωση που προέρχεται από το *Salvia miltiorrhiza* (Danshen), έχει συγκεντρώσει σημαντικό ενδιαφέρον για τα πιθανά θεραπευτικά του οφέλη. Αυτό το φυσικό προϊόν παρουσιάζει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, εξουδετερώνοντας αποτελεσματικά τις επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες και μετριάζοντας το οξειδωτικό στρες στο σώμα [223]. Επιπλέον, το σαλβιανολικό οξύ Β επιδεικνύει αξιοσημείωτα αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα, καθιστώντας το ως πιθανό υποψήφιο για τη διαχείριση καταστάσεων, οι οποίες σχετίζονται με χρόνια φλεγμονή, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις και αρθρίτιδα. Η επίδρασή του στην ορθή λειτουργία της καρδιάς είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτη, καθώς η έρευνα δείχνει ότι μπορεί να ενισχύσει τη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων, να μειώσει την αρτηριακή πίεση και να προστατεύσει το καρδιαγγειακό σύστημα από οξειδωτική βλάβη [224]. Αυτή η πολύπλευρη ένωση φαίνεται ως υποσχόμενη στην ηπατοπροστασία, όπως στην αντιμετώπιση της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), αλλά και στη φλεγμονή του ήπατος [225]. Επιπλέον, οι πιθανές νευροπροστατευτικές επιδράσεις του σαλβιανολικού οξέος Β το καθιστούν αντικείμενο ενδιαφέροντος για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών, αν και απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την πλήρη τεκμηρίωση αυτών των ισχυρισμών. Τέλος, αρκετές μελέτες αναφέρουν την αντιική του δράση έναντι του ιού SARS-CoV-2 [213, 226, 227].



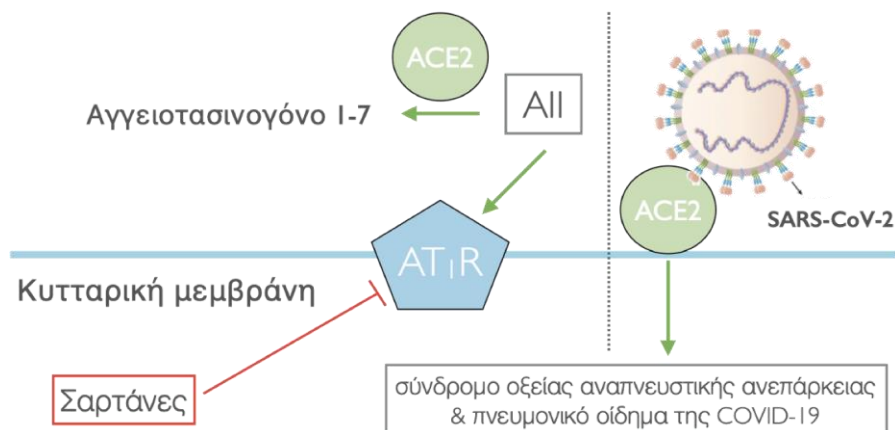
#### 4.2.2 Τα αντιυπερτασικά

Οι σαρτάνες, επίσης γνωστές ως ανταγωνιστές του AT1 της Αγγειοτασίνης II (Angiotensin Receptor Blockers, ARBs) (Εικόνα 15), είναι μια κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη θεραπεία της υψηλής αρτηριακής πίεσης και της καρδιακής ανεπάρκειας. Είναι γνωστό ότι οι σαρτάνες δρουν ως αντιυπερτασικά φάρμακα εμποδίζοντας την επιζήμια δράση της οκταπεπτιδικής ορμόνης Αγγειοτασίνης II που διεγείρει τους AT1 υποδοχείς σε παθολογικές καταστάσεις, καθώς συστέλλει τα αιμοφόρα αγγεία και αυξάνει την αρτηριακή πίεση [228, 229, 230, 231].



**Εικόνα 15. Οι 2D δομές των σαρτανών που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη.**

Ο ιός SARS-CoV-2 εισέρχεται στα ανθρώπινα κύτταρα δεσμεύοντας τον υποδοχέα του ACE2, ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων στους πνεύμονες, την καρδιά, τους νεφρούς και άλλα όργανα. Ορισμένες μελέτες προτείνουν ότι οι σαρτάνες ενδεχομένως να εμφανίζουν τη δυνατότητα εμπόδισης της δέσμευσης του ιού SARS-CoV-2 με το ACE2, με αποτέλεσμα τη μη είσοδό του στα κύτταρα ξενιστές, το οποίο βασίζεται στην υπόθεση ότι οι σαρτάνες εμπλέκονται στο ίδιο σύστημα (RAS) όπου εντοπίζεται το ACE2 [232, 233, 234].



**Σχήμα 14.** Η σχηματική αναπαράσταση της υπόθεσης που βασιστήκαμε για τη μελέτη των σαρτανών ως πιθανά αντιικά φάρμακα κατά του ιού SARS-CoV-2.

Οι σαρτάνες παρασκευάστηκαν έχοντας ως ένωση - οδηγό τη λοσαρτάνη,. Όλα τα παράγωγα της λοσαρτάνης φέρουν τα εξής δομικά χαρακτηριστικά: (i) ένα διφαινύλιο, το πρώτο φαινύλιο (spacer phenyl) ενώνεται με έναν αζωτούχο ετεροκυκλικό δακτύλιο, ενώ το δεύτερο (terminal methyl) ενώνεται με μια όξινη ομάδα, (π.χ. καρβονύλιο, τετραζόλιο κλπ.), (ii) ένα ή περισσότερους ετεροκυκλικούς δακτυλίους που διαθέτουν στο σημείο σύνδεσης ομάδα ή άτομο ικανό να δράσει ως δέκτης σε δεσμό υδρογόνου με τον υποδοχέα (π.χ. καρβοξυλική ομάδα, βασικό άζωτο, λακταμικό οξυγόνο κλπ.), (iii) μια αλκυλική αλυσίδα, η οποία συνδέεται με τον αζωτούχο ετεροκυκλικό δακτύλιο.

#### 4.2.3 Προετοιμασία των φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών

Οι δομές των πιθανών αναστολέων (Εικόνες 14 και 15 ) σχεδιάστηκαν και υποβλήθηκαν περαιτέρω στον αλγόριθμο LigPrep, ο οποίος είναι διαθέσιμος από το υπολογιστικό πακέτο της εταιρείας Schrödinger, μέσω του οποίου διατηρείται η συγκεκριμένη στερεοχημεία του κάθε μορίου [235]. Η κατάλληλη επεξεργασία των καταστάσεων πρωτονίωσης των ενώσεων επιτεύχθηκε σε φυσιολογικό pH (~7,4), όπου εκτελούνται οι *in vitro* δοκιμές στα ένζυμα, επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Hammett και Taft, μαζί μ' ένα εργαλείο ιονισμού, για τη δημιουργία χημικά ευαίσθητων τριδιάστατων μοντέλων. Επιπλέον, το πρόγραμμα MacroModel χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση των γεωμετριών και την εκτέλεση διαμορφωτικής αναζήτησης των δομών των προσδετών, διασφαλίζοντας παράλληλα ότι τα χειρόμορφα κέντρα διατήρησαν

τις σωστές χειρομορφίες. Οι προκύπτουσες διαμορφώσεις των προσδετών ελαχιστοποιήθηκαν περαιτέρω με τη χρήση του MacroModel, επιλέγοντας ως πεδίο δυνάμεων το OPLS\_2005 [49], και ως διαλύτη το νερό, ενώ για το στάδιο ελαχιστοποίησης της ενέργειας επιλέχθηκε ο αλγόριθμος PRCG με βαθμίδα ελαχιστοποίησης  $0.01 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

#### **4.3 Προετοιμασία των κρυσταλλογραφικών δομών της Mpro και της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2**

Οι δομές των πρωτεϊνών του ιού SARS-CoV-2 πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά χρησιμοποιώντας την εφαρμογή “Protein Preparation Wizard” του προγράμματος Maestro της εταιρείας Schrödinger [236]. Χρησιμοποιήθηκαν κρυσταλλικές δομές της Mpro και της πρωτεΐνης S, που διατίθενται στη διαδικτυακή βάση δεδομένων Πρωτεϊνών (PDB) [237] με PDB id 6LU7 και 6M0J αντίστοιχα [66][238]. Αυτή η διαδικασία περιλάμβανε προσθήκη των ατόμων υδρογόνου, συμπλήρωση πλευρικών αλυσίδων και βρόχων, η οποία επιτεύχθηκε με τη χρήση του προγράμματος Prime [239] και εκχώρηση μερικών φορτίων χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων OPLS\_2005 [169]. Εκτελέστηκε μια διαδικασία ελαχιστοποίησης, κατά την οποία μπορεί να περιοριστεί η κίνηση των βαρέων ατόμων, ελαχιστοποίηση των ηλεκτροστατικών απώσεων και διαμορφωτικών στερικών αλληλεπιδράσεων, και διασφαλίζοντας παράλληλα ότι το τελικό αποτέλεσμα παραμένει σχετικά κοντά στην αρχική γεωμετρία των δομών εισόδου. Επιπλέον, βελτιστοποιήθηκε η γεωμετρία των δεσμών υδρογόνου με τη χρήση της εφαρμογής “Protein Preparation Wizard” [236]. Ακολουθώντας τη συγκεκριμένη διαδικασία διασφαλίστηκε ότι οι δομές των πρωτεϊνών είναι κατάλληλα προετοιμασμένες ώστε να πραγματοποιηθεί η Μοριακή Πρόσδεση, επιτρέποντας ακριβείς προβλέψεις των αλληλεπιδράσεων δέσμευσης με τους προσδέτες.

#### **4.4 Πειράματα Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης**

Οι μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης πραγματοποιήθηκαν μέσω του λογισμικού Schrödinger Glide/XP [240] χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης (IFD), η οποία λαμβάνει υπόψη την ευελιξία τόσο του

προσδέτη όσο και της πρωτεΐνης, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο τις διαμορφωτικές αλλαγές τόσο των προσδετών όσο και της πρωτεΐνης, ώστε να προσαρμόζονται περισσότερο μεταξύ τους [241]. Στις άκαμπτης πρόσδεσης, οι θέσεις των ατόμων της πρωτεΐνης παραμένουν σταθερές και μόνο οι βαθμοί ελευθερίας στρέψης του προσδέτη επιτρέπεται να αλλάζουν κατά την πρόσδεση. Οι μελέτες IFD πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας δύο πλαίσια: ένα εξωτερικό πλαίσιο που καθορίζει τον όγκο στον οποίο υπολογίζονται τα δυναμικά πλέγματος και ένα εσωτερικό πλαίσιο που καθορίζει τον όγκο στον οποίο αναζητά το κέντρο του προσδέτη. Για τις δομές των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν, οι διαστάσεις του εξωτερικού πλαισίου ορίστηκε σε  $26 \times 26 \times 26 \text{ \AA}^3$ , ενώ το εσωτερικό πλαίσιο ορίστηκε στο προεπιλεγμένο μέγεθος ( $10 \times 10 \times 10 \text{ \AA}^3$ ) για τον ορισμό καθεμιάς από τις θέσεις πρόσδεσης που μελετήθηκαν.

Οι περιοχές πρόσδεσης στις οποίες επικεντρωθήκαμε σε αυτή τη μελέτη περιλάμβαναν συγκεκριμένα αμινοξέα, τα οποία διαδραμάτισαν κρίσιμους ρόλους στις σχηματιζόμενες αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης - προσδέτη. Πιο συγκεκριμένα, για τη Μpro του ιού SARS-CoV-2, η περιοχή πρόσδεσης χαρακτηρίζεται από αμινοξέα-κλειδιά, συμπεριλαμβανομένων των His41, Met49, Asn142, Met165, Glu166, Leu167, Pro168, Phe185, Gln189 και Ala191 (Εικόνα 16) [242] [243]. Όσον αφορά στην πρωτεΐνη S, η οποία είναι ενωμένη με ACE2, οι μελέτες IFD πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης. Η πρώτη περιοχή πρόσδεσης ορίζεται στην ίδια πρωτεΐνη S (αλυσίδα E), περιλαμβάνοντας συγκεκριμένα τα αμινοξέα Phe338, Glu340, Val341, Phe342, Asn343, Arg346, Tyr351, Arg355 και Asp364 [242]. Η δεύτερη περιοχή πρόσδεσης, εντοπίζεται εντός του ACE2 (αλυσίδα A), η οποία ορίζεται από τα αμινοξέα Met152, Ala153, Asn154, Ser155, Leu156, Arg161, Leu248, Tyr252, Leu266, Gly268, Leu27, Tyr279, Ser280 και Leu281. Τέλος, η τρίτη περιοχή πρόσδεσης εντοπίζεται στην ένωση της πρωτεΐνης S και του ACE2, την οποία αναφέρουμε ως «νέα θέση πρόσδεσης». Η εν λόγω περιοχή ορίστηκε με ακρίβεια από τα αμινοξέα Lys26, Asp30, Val93, Pro389, Arg408, K417, Phe555, Asn556 και Arg559, όπως προτείνεται από τη μελέτη των Durdagi *et al.* [243].

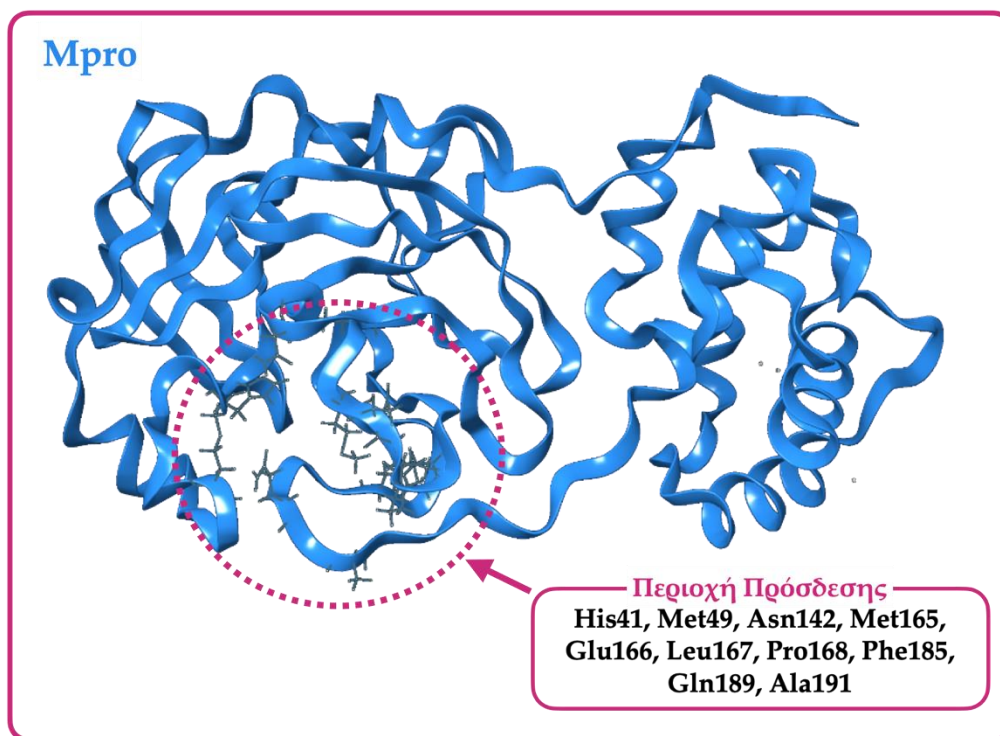
Κατά τους υπολογισμούς Μοριακής Πρόσδεσης κάνοντας χρήση του Glide, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία της πρωτεΐνης με περιορισμένη

βελτιστοποίηση (constrained refinement) καθώς και η βελτιστοποίηση χαμηλής ενέργειας των πλευρικών αλυσίδων με επιλεγόμενο πεδίο δυνάμεων το OPLS\_2005 [169].

Πραγματοποιήθηκε επίσης αυτόματη περικοπή των πλευρικών αλυσίδων με βάση τους παράγοντες B (B factors), καθώς και βελτίωση τους με τη χρήση Prime [239]. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε η βαθμολογία πρόσδεσης (ή συγγένεια δέσμευσης) με επιπλέον ακρίβεια (XP GScore) για κάθε προσδέτη, ενώ η συνάρτηση βαθμολόγησης XP GScore λαμβάνει υπόψη διάφορους παράγοντες, όπως τον τύπο δεσμού, ηλεκτροστατικές, van der Waals και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που αναπτύχθηκαν για τον σχηματισμό του συμπλέγματος «πρωτεΐνης – προσδέτη». Τέλος, η επιλογή "ελαχιστοποίηση μετά την πρόσδεση" (post docking minimization) ενεργοποιήθηκε, διατηρώντας το μέγιστο δέκα θέσεις ανά προσδέτη.

#### **4.4.1 Αποτελέσματα πειραμάτων Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης στην Mpro του ιού SARS-CoV-2**

Σε αυτή τη μελέτη, ο πρωταρχικός μας στόχος ήταν να εμβαθύνουμε στις συγγένειες δέσμευσης μεταξύ μιας προσεκτικά επιλεγμένης επιλογής φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών φαρμάκων και των περιοχών πρόσδεσής τους τόσο στην MPro όσο και στην πρωτεΐνη S του ιού SARS-CoV-2.



**Εικόνα 16.** Η τριδιάστατη (3D) δομή της Mpro (PDB id: 6LU7), με διακεκομμένο κύκλο προσδιορίζονται τα αμινοξέα που απαρτίζουν την περιοχή πρόσδεσης για τα πειράματα IFD.

Στη MPro, η περιοχή πρόσδεσης αποτελείται από συγκεκριμένα αμινοξέα, τα οποία εντοπίζονται κυρίως στον Τομέα II και στην περιοχή βρόχου (Εικόνα 16). Από τα αποτελέσματα της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης τρία φυσικά προϊόντα εμφάνισαν τις υψηλότερες συγγένειες δέσμησης με την MPro του SARS-CoV-2, καθώς και αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα – κλειδιά της περιοχής πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, το ροσμαρινικό οξύ εμφάνισε ενέργεια δέσμησης  $-9.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ , η κουρκουμίνη  $-8.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  και η κερκετίνη  $-7.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Πίνακας 1).

**Πίνακας 1.** Οι συγγένειες δέσμησης που προέκυψαν από τα πειράματα IFD των φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών στην Mpro του ιού SARS-CoV-2.

Φυσικό προϊόν/Αντιυπερτασικό	Συγγένεια Δέσμησης ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )
Κανναβιδιολικό οξύ	-5.9

<b>Κανναβιγερολικό οξύ</b>	-5.4
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	-7.3
<b>Κερκετίνη</b>	-7.8
<b>Κουρκουμίνη</b>	-8.5
<b>Ροσμαρινικό οξύ</b>	-9.5
<b>Σαλβιανολικό οξύ β</b>	-
<b>Επροσαρτάνη</b>	-5.7
<b>Τελμισαρτάνη</b>	-
<b>Ιρμπεσαρτάνη</b>	-2.9
<b>Καντεσαρτάνη</b>	-5.4
<b>Ολμεσαρτάνη</b>	-
<b>Βαλσαρτάνη</b>	-
<b>Αζιλσαρτάνη</b>	-6.7
<b>Λοσαρτάνη</b>	-6.7

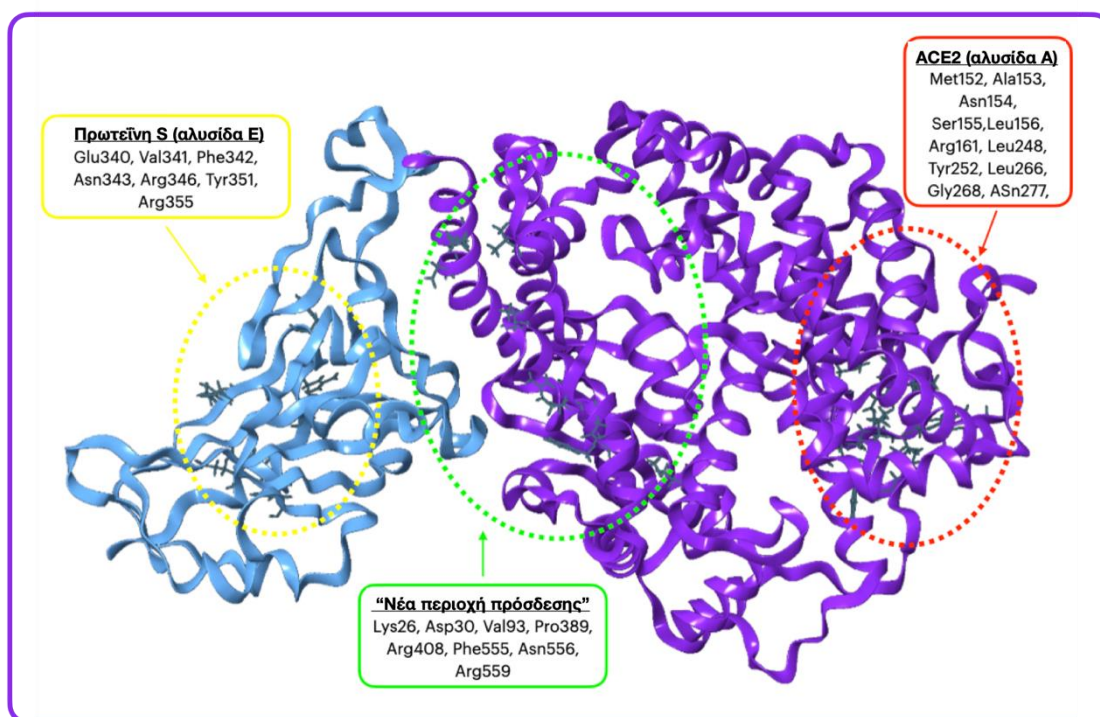
Το ροσμαρινικό οξύ σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ser46, Thr25 και His41(Εικόνα 17), επιβεβαιώνοντας την ισχυρή δεσμευτική του ικανότητα. Η κουρκουμίνη σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου με τα Thr24, Thr25 και His41 ενώ η κερκετίνη σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου με τα Thr24, Thr25, Asn142 και Gln189 (Εικόνα 17). Συνολικά, τα αποτελέσματα της IFD υποδεικνύουν ότι το ροσμαρινικό οξύ, η κουρκουμίνη και η κερκετίνη παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενες δυνατότητες ως θεραπευτικοί παράγοντες για την Mpro λόγω των ισχυρών δεσμευτικών τους συγγενειών και των ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων. Οι προσδεμένες διαμορφώσεις όλων των μελετώμενων ενώσεων παρατίθενται στο Παράρτημα I.





#### 4.4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης στην πρωτεΐνη S του ιού SARS-CoV-2

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες IFD στην κρυσταλλωμένη πρωτεΐνη S που είναι ενωμένη με το ACE2 (PDB id 6M0J) σε τρεις διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης (Εικόνα 18). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων IFD για την πρώτη περιοχή (πρωτεΐνη S) πρόσδεσης έδειξαν ότι το σαλβιανολικό οξύ β, η κερκετίνη και το ροσμαρινικό οξύ παρουσίασαν τις χαμηλότερες βαθμολογίες πρόσδεσης, με τιμές  $-11.1$ ,  $-10.4$  και  $-9.9$  kcal mol<sup>-1</sup>, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, το σαλβιανολικό οξύ β σχημάτισε αρκετούς δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Glu150, Leu156, Ala251, Asn277 και Ser280, καθώς και μια αλληλεπίδραση π-π με την Tyr252 (Εικόνα 19). Η κερκετίνη, από την άλλη, σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ala153 και Ser280, ενώ το ροσμαρινικό οξύ σχημάτισε δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Asn154, Asp157, Leu266, Gly268 και Ser280 (Εικόνα 19).



Εικόνα 18. Η τριδιάστατη (3D) δομή της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2 (PDB id 6M0J), με διακεκομμένο κύκλο προσδιορίζονται τα αμινοξέα που απαρτίζουν τις εκάστοτε περιοχές πρόσδεσης για τα πειράματα IFD.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων IFD της δεύτερης περιοχής πρόσδεσης. (ACE2) έδειξαν ότι το σαλβιανολικό οξύ β πέτυχε την πιο ευνοϊκή βαθμολογία πρόσδεσης ( $-14.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) και σχημάτισε αρκετούς δεσμούς υδρογόνου με βασικά αμινοξέα όπως Thr345, Arg346, Ala352, Asn354, Arg355, και Ser399. Επιπλέον, σχημάτισε μια γέφυρα άλατος με την Arg346 και μια αλληλεπίδραση π-κατιόντος με τη Lys356, οι οποίες υποδηλώνουν μια ισχυρή δέσμευση μεταξύ του σαλβιανολικού οξέος και της πρωτεΐνης S (Εικόνα 19). Το ροσμαρινικό οξύ πέτυχε βαθμολογίες πρόσδεσης  $-11.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  και επίσης σχημάτισε ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού αρκετών δεσμών υδρογόνου με βασικά αμινοξέα όπως Val341, Ala348, Ser399 και Asn450, καθώς και μια γέφυρα άλατος με Arg346 (Εικόνα 19).

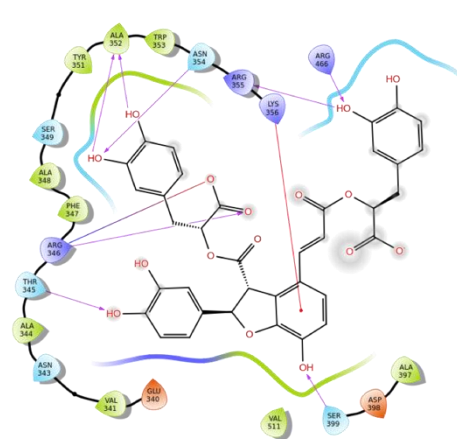
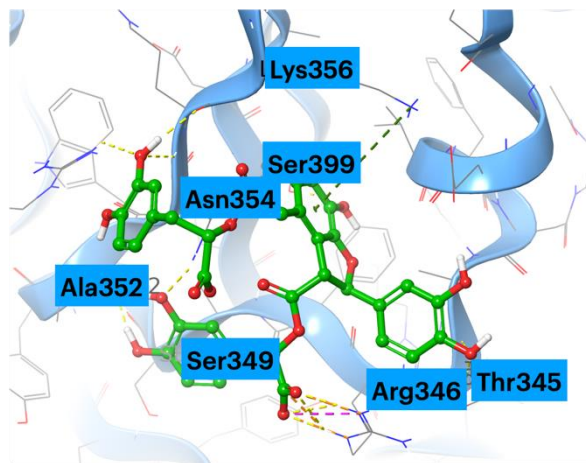
Η ανάλυση IFD της «νέας περιοχής πρόσδεσης» έδειξε ότι και πάλι το σαλβιανολικό οξύ β είχε τη χαμηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης ( $-10.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Αυτό το αποτέλεσμα αποδίδεται σε διάφορες αλληλεπιδράσεις που σχηματίστηκαν από το σαλβιανολικό οξύ β με βασικά αμινοξέα. Συγκεκριμένα, το σαλβιανολικό οξύ β σχημάτισε αρκετούς δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Ala386, Ala387, Arg393, Arg408, Asp420 και Arg559. Επιπλέον, σχημάτισε μια γέφυρα άλατος με την Arg408 και μια αλληλεπίδραση π-κατιόντος με τη Lys417 (Εικόνα 19). Οι προσδεμένες διαμορφώσεις όλων των μελετώμενων ενώσεων παρατίθενται στο Παράρτημα Ι. Οι βαθμολογίες πρόσδεσης των αποτελεσμάτων IFD παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 που ακολουθεί.

**Πίνακας 2. Τα αποτελέσματα του IFD για τις τρεις διακριτές περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2 του ιού SARS-CoV-2 (PDB id: 6M0J). Οι συγγένειες δέσμευσης εκφράζονται σε μονάδες  $\text{kcal mol}^{-1}$ .**

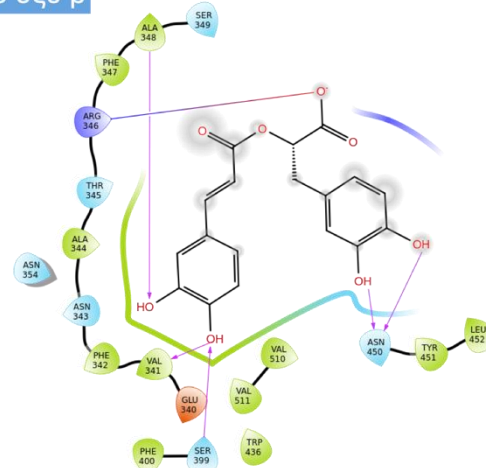
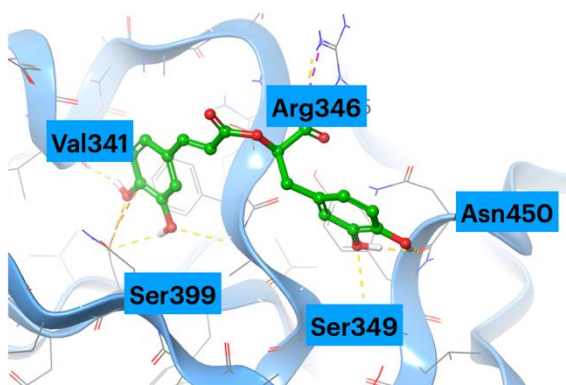
Φυσικό προϊόν / Αντιυπερτασικό	Συγγένεια Πρόσδεσης Πρωτεΐνη S ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	Συγγένεια Πρόσδεσης ACE2 ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	Συγγένεια Πρόσδεσης «Νέα περιοχή πρόσδεσης» ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) <sup>1</sup>
Κανναβιδιολικό οξύ	-4.9	-7.7	-4.0
Κανναβιγερολικό οξύ	-6.0	-6.9	-5.9

Καφεϊκό οξύ	-7.1	-7.4	-4.7
Κερκετίνη	-7.7	-10.4	-7.7
Κουρκουμίνη	-7.3	-7.0	-6.6
Ροσμαρινικό οξύ	-11.1	-9.9	-8.3
Σαλβιανολικό οξύ β	-14.2	-11.1	-10.0
Λοσαρτάνη	-6.0	-7.1	-5.1
Τελμισαρτάνη	-3.8	-8.4	-3.6
Ιρμπεσαρτάνη	-3.3	-3.9	-2.8
Καντεσαρτάνη	-3.4	-3.6	-3.4
Ολμεσαρτάνη	-7.2	-4.8	-5.0
Βαλσαρτάνη	-4.2	-4.4	-3.0
Αζιλοσαρτάνη	-6.7	-3.5	-5.4
Επροσαρτάνη	-4.9	-7.1	-6.4

### 1η περιοχή πρόσδεσης - πρωτεΐνη S

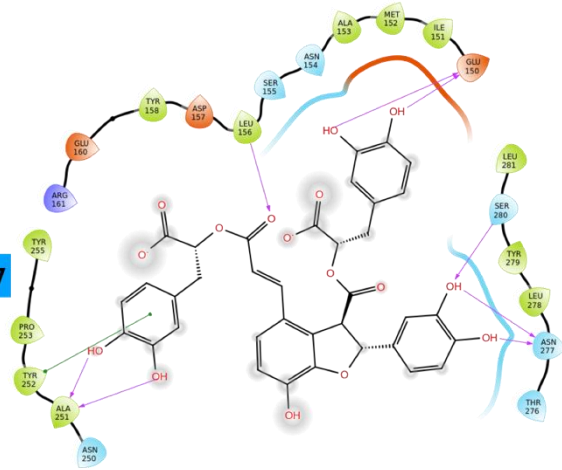
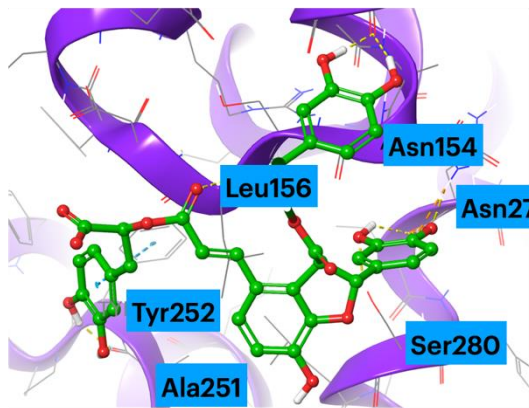


### Σαλβιανολικό οξύ β

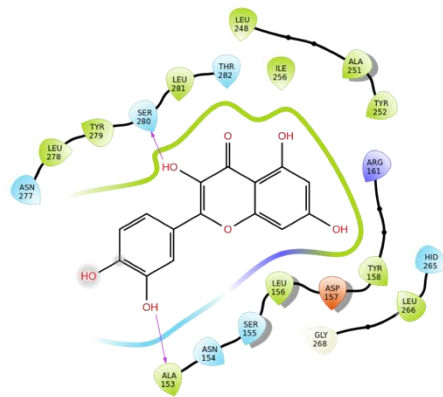
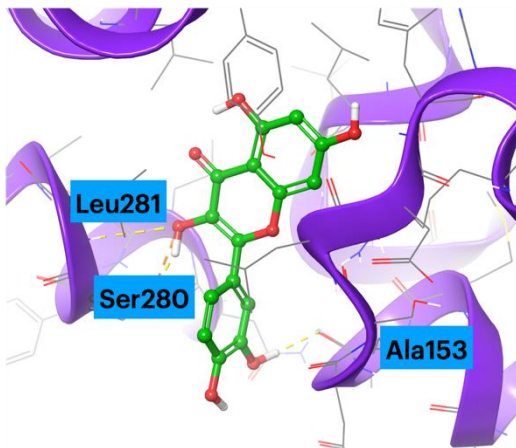


### Ροσμαρινικό οξύ

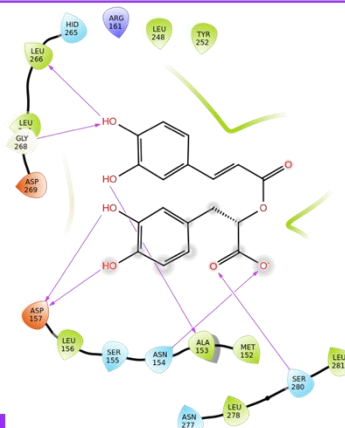
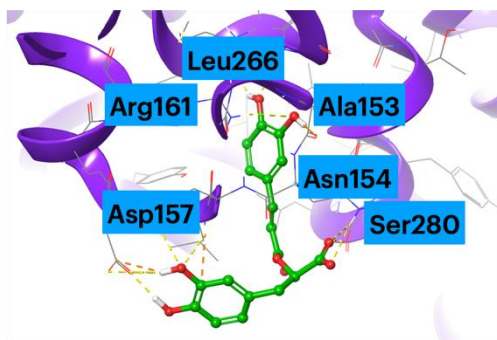
## 2η περιοχή πρόσδεσης - ACE2



## Σαλβιανολικό οξύ β

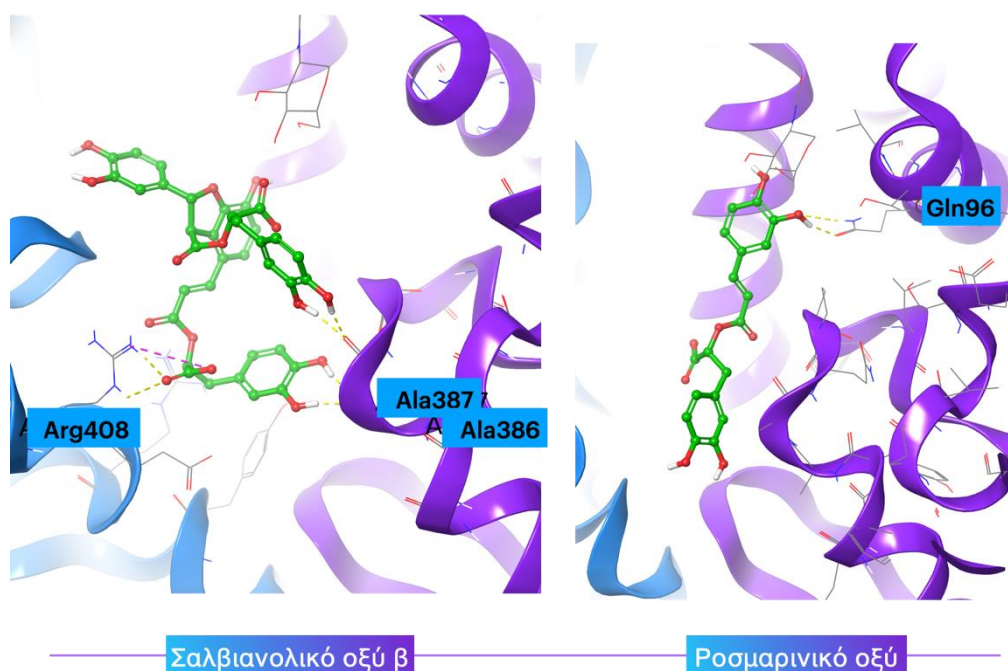


## Κερκετίνη



## Ροσμαρινικό οξύ

### 3η περιοχή πρόσδεσης - ένωση πρωτεΐνης S & ACE2



**Εικόνα 19.** Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύχθηκαν από τα πειράματα IFD για τα τρία φυσικά προϊόντα που εμφάνισαν τις ευνοϊκότερες προσδέσεις με την πρωτεΐνη S για καθεμία από τις τρεις μελετώμενες περιοχές πρόσδεσης.

#### 4.5 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Η Μοριακή Δυναμική είναι μια ισχυρή υπολογιστική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη της δομικής συμπεριφοράς των μακρομορίων και την παροχή πληροφοριών σχετικά με τη δυναμική των συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης-προσδέτη». Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις MD για να αξιολογηθεί η σταθερότητα των συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης - φυσικού προϊόντος», τα οποία προήλθαν από τα πειράματα IFD, καθώς και για τον χαρακτηρισμό των κύριων αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στη συμπλοκοποίηση «πρωτεΐνη-προσδέτη» για το κάθε χημικό σύστημα υπό μελέτη.

Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, επιλέχθηκε από τα πειράματα IFD η ευνοϊκότερη ενεργειακά προσδεσμένη διαμόρφωση των συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης-προσδέτη» ως αρχική θέση για τις προσομοιώσεις MD. Χρησιμοποιήθηκε το πεδίο δυνάμεων OPLS\_2005 προκειμένου να περιγραφούν οι διαμοριακές δυνάμεις που διέπουν τον σχηματισμό των συμπλεγμάτων [169], ενώ οι μεγάλης εμβέλειας ηλεκτροστατικές



αλληλεπιδράσεις υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τη μέθοδο Σωματιδιακού Πλέγματος Ewald (Particle Mesh Ewald, PME) και η απόσταση πλέγματος ρυθμίστηκε στα 0,8 Å. Οι Van der Waals και οι μικρής εμβέλειας ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις περιορίστηκαν στα 9,0 Å. Προκειμένου να προετοιμαστεί το σύστημα για τις προσομοιώσεις MD, τα συμπλέγματα «πρωτεΐνης - προσδέτη» ενυδατώθηκαν πλήρως με ρητό (explicit) διαλύτη μοντελοποιημένων μορίων ύδατος TIP3P (Transferable Intermolecular Potential 3-Point) [244] χρησιμοποιώντας κυβική μονάδα κυψέλης και εφαρμόζοντας περιοδικές συνθήκες σε όλες τις κατευθύνσεις. Να σημειωθεί ότι η χρήση μοντελοποίησης με ρητό διαλύτη είναι αρκετά ακριβής επειδή θεωρούνται οι μοριακές λεπτομέρειες κάθε διαλυμένου μορίου. Οι διαστάσεις του κουτιού προσομοίωσης ήταν  $10^3$  Å και η ηλεκτρική ουδετερότητα του συνολικού φορτίου του συστήματος επιτεύχθηκε με την προσθήκη ιόντων  $\text{Na}^+$ . Μια σταθερή συγκέντρωση άλατος ( $c=0,15\text{M}$ /κυτταρική συγκέντρωση) επιτεύχθηκε με την προσθήκη επιπλέον ιόντων  $\text{Na}^+$  και  $\text{Cl}^-$  στο χημικό σύστημα. Το επιδιαλυτωμένο σύστημα αρχικά ελαχιστοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μια υβριδική μέθοδο αλγορίθμων Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (LBFGS) [245], ενώ οι επόμενες διεργασίες της θέρμανσης και της εξισορρόπησης εφαρμόστηκαν από το προεπιλεγμένο πρωτόκολλο χαλάρωσης που παρέχεται από το πακέτο προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής Desmond.

Συγκεκριμένα, το προεπιλεγμένο πρωτόκολλο Desmond περιλαμβάνει πέντε βήματα χαλάρωσης. Αρχικά, το σύστημα θερμάνθηκε στο σύνολο NVT χρησιμοποιώντας δυναμική Brownian στα  $\sim 10$  K με μικρά χρονικά βήματα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσομοίωση 12 ps στο κανονικό σύνολο με τη χρήση θερμοστάτη Berendsen στην ίδια θερμοκρασία. Τα άτομα μη υδρογόνου διαλυμένης ουσίας συγκρατήθηκαν και στα δύο στάδια.

Το επόμενο βήμα του πρωτοκόλλου περιλαμβάνει μια προσομοίωση 12 ps στο σύνολο NPT χρησιμοποιώντας θερμοστάτη Berendsen και βαροστάτη προκειμένου να διατηρηθεί μια σταθερή θερμοκρασία και πίεση στους 10 K και 1 atm, αντίστοιχα. Τέλος, τα δύο τελευταία βήματα χαλάρωσης του συνόλου NPT περιλάμβαναν προσομοίωση 12 ps με θερμοστάτη και βαροστάτη Berendsen, ώστε να επιτευχθεί η θερμοκρασία στόχος των 310 K (θερμοκρασία σώματος), ενώ ταυτόχρονα διατηρήθηκε η πίεση σταθερή στην 1 atm. Τα άτομα

της διαλυμένης ουσίας μη υδρογόνου συγκρατήθηκαν σε όλα τα προαναφερθέντα στάδια χαλάρωσης, εκτός από το τελευταίο βήμα, το οποίο περιλαμβάνει προσομοίωση 24 ps στο σύνολο NPT (θερμοστάτης Berendsen και barostat), όπου δεν εφαρμόστηκαν περιορισμοί στο χημικό σύστημα [246].

Οι εξισώσεις κίνησης ενσωματώθηκαν χρησιμοποιώντας τον ολοκληρωτή πολλαπλών βημάτων RESPA (multistep RESPA integrator) για τις δεσμικές και τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις με όριο αποκοπής 9 Å. Ένα εξωτερικό χρονικό βήμα 6.0 fs χρησιμοποιήθηκε για τις μη δεσμικές αλληλεπιδράσεις που ξεπερνούσαν το όριο των 9 Å.

Τέλος, η φάση παραγωγής πραγματοποιήθηκε για 200ns σε όλα τα εξισορροπημένα συστήματα στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, χρησιμοποιώντας κάρτα γραφικών GPU για την υλοποίηση του Desmond, η οποία επιτρέπει τον ταχύτερο υπολογισμό της προσομοίωσης παρέχοντας ένα κατάλληλο μέγεθος δείγματος για την ανάλυση του τρόπου δέσμευσης του μορίου στην κοιλότητα της πρωτεΐνης [245].

Η ανάλυση τροχιάς πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εργαλείων ανάλυσης του Desmond. Η δομική ανάλυση περιλάμβανε την αξιολόγηση της σύγκλισης της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (Root Mean Square Deviation, RMSD) στους Ca άνθρακες του σκελετού την πρωτεΐνης καθώς και όλων των βαρέων ατόμων του προσδέτη σε σχέση με τις αρχικές συντεταγμένες του συστήματος (θέση «πρωτεΐνης-προσδέτη» που προέκυψε από τις μελέτες IFD). Ως μέτρο της σύγκλισης του συστήματος χρησιμοποιήθηκε το RMSD των ατόμων Ca της βασικής πρωτεΐνης. Επιπλέον, η διακύμανση της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (Root Mean Square Fluctuation, RMSF) των ατόμων άνθρακα Ca του σκελετού της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης τοπικής δομικής ευελιξίας σε όλη την ανάλυση τροχιάς, παρέχοντας πληροφορίες για δυναμικές αλλαγές εντός του συστήματος.

Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκε συμπληρωματική ανάλυση δεσμών υδρογόνου προκειμένου να προσδιοριστούν οι βασικές αλληλεπιδράσεις δεσμών H που διέπουν τη δέσμευση των προσδετών στην περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Οι υπόλοιπες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις (γέφυρες άλατος,  $\pi$ -κατιόν, αλληλεπιδράσεις  $\pi$ - $\pi$ ) που σχηματίζονται μεταξύ της πρωτεΐνης και του

προσδέτη σε κάθε σύμπλεγμα αξιολογούνται ποσοτικά από το εργαλείο ανάλυσης Desmond Trajectory [247].

#### 4.6 Υπολογισμοί MM-GBSA

Για ν' αποκτηθεί μια πληρέστερη εικόνα σχετικά με την εκτίμηση της ενέργειας δέσμευσης μεταξύ της πρωτεΐνης και του προσδέτη πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί MM-GBSA. Η υπολογιστική προσέγγιση MM-GBSA συνδυάζει τη μοριακή μηχανική (MM), η οποία περιγράφει τις διαμοριακές και μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις των μορίων, με το μοντέλο Generalized Born (GB) που λαμβάνει υπόψη τον διαλύτη. Αυτό επιτυγχάνεται, υπολογίζοντας τις ενεργειακές διαφορές μεταξύ δεσμικών και μη δεσμικών καταστάσεων, μαζί με τις συνεισφορές διαλυτοποίησης.

Στην παρούσα μελέτη, η ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης ( $\Delta G$ ) του κάθε συμπλέγματος «πρωτεΐνης – φυσικού προϊόντος» που μελετήθηκε με προσομοιώσεις MD, υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Prime της εταιρείας Schrödinger [239]. Για κάθε σύμπλεγμα «πρωτεΐνης – φυσικού προϊόντος» υπολογίστηκε ο μέσος όρος των λαμβανόμενων ενεργειακών τιμών MM-GBSA και η τυπική απόκλιση χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο `thermal_mmgsa.py`.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα των υπολογισμών του  $\Delta G$  μέσω της υπολογιστικής προσέγγισης MM-GBSA παρατίθενται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3. Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας  $\Delta G$  των μελετώμενων συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης – φυσικού προϊόντος».**

Φυσικό προϊόν	Mpro	MM-GBSA Πρωτεΐνη S 1η περιοχή πρόσδεσης	$\Delta G$ (kcal mol <sup>-1</sup> ) Πρωτεΐνη S 2η περιοχή πρόσδεσης	Πρωτεΐνη S 3η περιοχή πρόσδεσης
Κουρκουμίνη	- 47.5 ± 4.0	-	-	-
Κερκετίνη	- 33.8 ± 5.2	-	- 41.0 ± 6.1	-
Ροσμαρινικό οξύ	- 45.2 ± 3.6	- 41.2 ± 4.4	- 41.0 ± 3.8	- 40.4 ± 9.1
Σαλβιανολικό οξύ β	-	- 56.5 ± 4.9	- 42.6 ± 5.8	- 35.3 ± 5.1



#### 4.7 Αποτελέσματα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής χρησιμοποιήθηκαν:

✓ **Σύγκλιση της τετραγωνικής ρίζας της μέσης απόκλισης (RMSD)**

Μέσω του RMSD (Root Mean Square Deviation) προσδιορίζεται ποσοτικά η μέση χωρική διαφορά μεταξύ των ατομικών θέσεων ενός μοριακού συστήματος, συνήθως μιας πρωτεΐνης ή ενός προσδέτη, σε σύγκριση με μια δομή αναφοράς. Το RMSD είναι ένα κρίσιμο εργαλείο για την ανάλυση των δομικών αλλαγών και την αξιολόγηση της σταθερότητας των μορίων σε συνάρτηση με τον χρόνο. Στο πλαίσιο των προσομοιώσεων πρωτεϊνών, το RMSD μας βοηθά να παρακολουθούμε τη δομική δυναμική, την εξισορρόπηση και τη συνολική δομική συμπεριφορά των μακρομορίων. Οι υψηλές τιμές RMSD υποδηλώνουν σημαντικές δομικές αποκλίσεις, ενώ οι χαμηλές τιμές RMSD υποδηλώνουν δομική σταθερότητα.

Το RMSD για το κάθε πλαίσιο  $x$  δίδεται από τον τύπο:

$$RMSD_x = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r'_i(t_x) - r_i(t_{ref}))^2}$$

όπου  $N$  είναι ο αριθμός των ατόμων,  $t$  είναι ο χρόνος αναφοράς, (συνήθως το πρώτο πλαίσιο χρησιμοποιείται ως αναφορά και θεωρείται ο χρόνος  $t=0$ ), το  $r'_i$  είναι η θέση των επιλεγμένων ατόμων στο πλαίσιο  $x$  μετά την υπέρθεση στο πλαίσιο αναφοράς, όπου το πλαίσιο  $x$  καταγράφεται τη χρονική στιγμή  $t$ . Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα πλαίσια της τροχιάς προσομοίωσης.

✓ **Η διακύμανση της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSF)**

Μέσω της διακύμανσης της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (Root Mean Square Fluctuation, RMSF) κατανοείται η ευελιξία ή η διακύμανση των ατόμων μέσα σε ένα μακρομοριακό σύστημα. Με το RMSF μετράται η απόκλιση των θέσεων των ατόμων από τις μέσες θέσεις τους κατά τη διάρκεια μιας προσομοίωσης MD. Οι υψηλές τιμές RMSF υποδεικνύουν ότι αυτά τα άτομα είναι πολύ

εύκαμπτα και παρουσιάζουν σημαντικές διακυμάνσεις, ενώ οι χαμηλές τιμές RMSF υποδεικνύουν σχετικά άκαμπτες περιοχές. Επιπρόσθετα, το RMSF βοηθά στον εντοπισμό συγκεκριμένων αμινοξέων ή περιοχών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική λειτουργία ενός μακρομορίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αμινοξέα που εμφανίζουν υψηλή διακύμανση αντιστοιχούν συχνά σε ενεργές περιοχές, περιοχές πρόσδεσης ή περιοχές που εμπλέκονται σε διαμορφωτικές αλλαγές.

Το RMSF για το αμινοξύ  $i$  δίδεται από τον τύπο:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t=1}^T \langle r_i'(t) - r_i(t_{ref}) \rangle^2}$$

όπου  $T$  είναι ο χρόνος τροχιάς κατά τον οποίο υπολογίζεται το RMSF,  $t$  είναι ο χρόνος αναφοράς,  $r$  είναι η θέση του αμινοξέος αναφοράς  $i$ ,  $r'$  είναι η θέση των ατόμων στο αμινοξύ  $i$  μετά την υπέρθεση στο αμινοξύ αναφοράς, οι γωνιακές αγκύλες υποδεικνύουν ότι ο μέσος όρος της τετραγωνικής απόστασης λαμβάνεται από την επιλογή των ατόμων στο αμινοξύ.

#### ✓ Αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – προσδέτη

Καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, δίνεται η δυνατότητα παρακολούθησης των αλληλεπιδράσεων της πρωτεΐνης με τον προσδέτη. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κύριους τύπους: τους δεσμούς υδρογόνου, τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις και τις γέφυρες ύδατος.

Οι δεσμοί υδρογόνου (δεσμοί H) είναι ζωτικής σημασίας για τη δέσμευση του προσδέτη, επηρεάζοντας την εξειδίκευση του φαρμάκου. Τέσσερις υποτύποι: δότης ή δέκτης σκελετού, και δότης ή δέκτης πλευρικής αλυσίδας. Η απόσταση 2,5 Å (D—H···A), η γωνία δότη  $\geq 120^\circ$ , και η γωνία δέκτη  $\geq 90^\circ$  (H···A—X) αποτελούν τα γεωμετρικά κριτήρια για τον σχηματισμό δεσμού υδρογόνου.

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν τρεις υποτύπους:  $\pi$  - κατιόντος,  $\pi$ - $\pi$ , και άλλες μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Το γεωμετρικό κριτήριο σχηματισμού  $\pi$  - κατιόντος είναι η απόσταση 4.5 Å μεταξύ αρωματικών και φορτισμένων ομάδων, για τις  $\pi$ - $\pi$  αλληλεπιδράσεις, οι αρωματικές ομάδες πρέπει να είναι στοιβαγμένες μέτωπο προς μέτωπο ή αντικρουστά ή μέτωπο με άκρη. Οι υπόλοιπες μη ειδικές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται μεταξύ της πλευρική αλυσίδα των ανθράκων του αμινοξέος και του προσδέτη εντός απόστασης 3.6 Å.

Οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις σχηματίζονται όταν αντίθετα φορτισμένα άτομα πλησιάζουν εντός απόστασης 3.7 Å, εξαιρουμένων των δεσμών υδρογόνου. Εδώ παρατηρούνται δυο υποτύποι που διαμεσολαβούνται από τον πρωτεϊνικό σκελετό ή πλευρικές αλυσίδες.

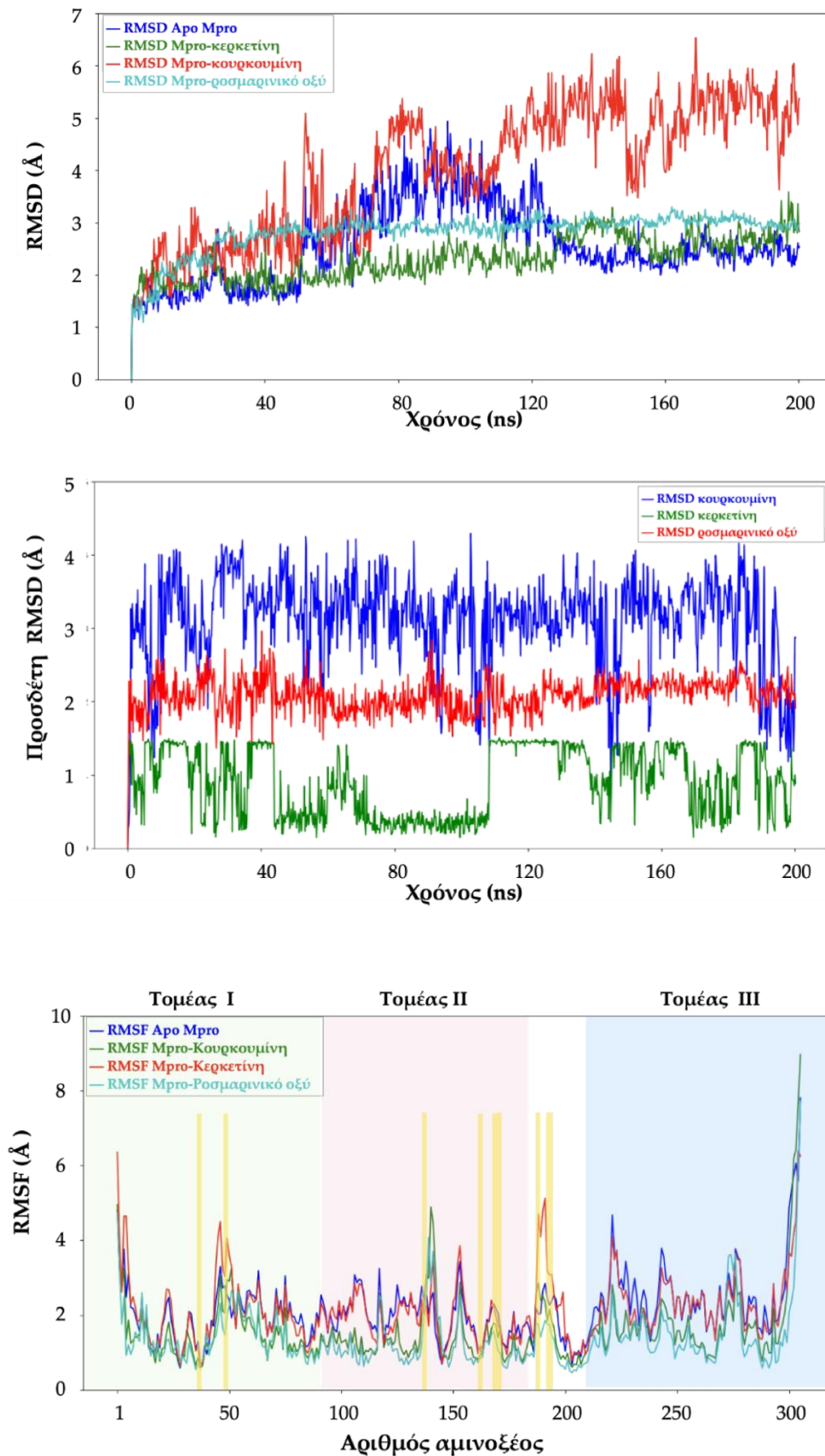
Τέλος, οι γέφυρες ύδατος είναι αλληλεπιδράσεις «πρωτεΐνης-προσδέτη» με δεσμούς υδρογόνου μέσω της διαμεσολάβησης μορίου ύδατος. Η γεωμετρία του δεσμού υδρογόνου είναι ελαφρώς πιο ήπια από τον τυπικό ορισμό του δεσμού H.

Στην παρούσα μελέτη, η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων «πρωτεΐνης-προσδέτη» πραγματοποιήθηκε για τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης καθώς παρατηρήθηκε εξισορρόπηση των μελετώμενων συστημάτων. Η πιο αντιπροσωπευτική διαμόρφωση των συμπλεγμάτων «Mpro – φυσικών προϊόντων» και «πρωτεΐνης S – φυσικών προϊόντων» κατά τις προσομοιώσεις MD προέκυψαν μέσω ομαδοποίησης (clustering) και παρατίθενται στο Παράρτημα II.

#### **4.7.1 Ανάλυση Μοριακής Δυναμικής συμπλεγμάτων «Mpro – φυσικών προϊόντων»**

Το RMSD του συμπλέγματος «Mpro-ροσμαρινικού οξέος» αποκαλύπτει σταθερή διαμορφωτική συμπεριφορά καθ' όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, με μέση τιμή RMSD  $2.8 \pm 0.4$  Å για το σύμπλεγμα και  $2.1 \pm 0.2$  Å για το ροσμαρινικό οξύ (Εικόνα 20). Αντίθετα, η από-πρωτεΐνη της Mpro παρουσιάζει διακυμάνσεις μεταξύ 50 και 120 ns, με μέση τιμή  $2.5 \pm 0.8$  Å. Επιπλέον, το RMSF επιδεικνύει ένα πιο σταθερό σύστημα σε σύγκριση με την από-πρωτεΐνη της Mpro (Εικόνα 20). Για να αποκτήσουμε μια πιο ενδελεχή κατανόηση της

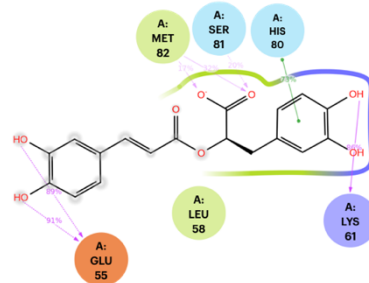
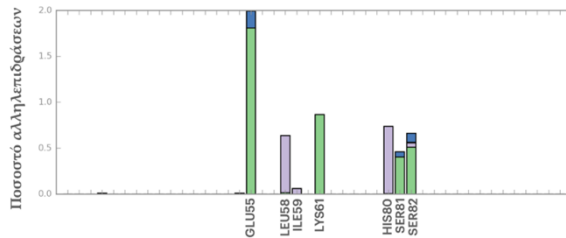
σταθερότητας του συμπλέγματος «προσδέτη-πρωτεΐνης», εξετάσαμε προσεκτικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Mpro και του ροσμαρινικού οξέος κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης, μια περίοδο όπου το σύστημα είχε φτάσει σε ισορροπία. Η ανάλυση μας αποκάλυψε τον σχηματισμό πολυάριθμων δεσμών υδρογόνου, με πιο κυρίαρχες τις αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα Glu55, Lys61, Ser81 και Met82 (δεσμοί H) καθώς και Leu58 (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια αλληλεπίδραση στοίβαξης π-π με το αμινοξύ His80. Επιπλέον, σχηματίστηκαν γέφυρες ύδατος με τα αμινοξέα Ser81 και Met82, υπογραμμίζοντας τον κρίσιμο σταθεροποιητικό ρόλο αυτών των αλληλεπιδράσεων εντός του συμπλέγματος (Εικόνα 20), όπως αποτυπώνεται στην επικρατέστερη διαμόρφωση «Mpro-ροσμαρινικού οξέος», η οποία προέκυψε μέσω ομαδοποίησης (clustering) με βάση το RMSD. Η διαμόρφωση αυτού του συμπλέγματος διαφέρει σημαντικά σε σύγκριση με την αρχική θέση πρόσδεσης (Εικόνα 22), όπου το ροσμαρινικό οξύ αλληλεπιδρά κυρίως με τα αμινοξέα Thr25, His41, Cys44 και Ser46, ένδειξη της σημαντικής ευελιξίας και κίνησης αυτού του μορίου εντός της περιοχής πρόσδεσης. Αυτό υποδεικνύεται επίσης συγκρίνοντας και τις δύο διαμορφώσεις μέσω υπέρθεσής τους (Εικόνα 22). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι η αρχική διαμόρφωση πρόσδεσης μοιάζει πολύ με αυτή που προτείνεται στα πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης των Shahhamzhehi *et al.* [248]. Για μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση του συμπλέγματος «πρωτεΐνη-προσδέτη», πραγματοποιήσαμε υπολογισμούς MM-GBSA για να εκτιμήσουμε την ολική ενέργεια πρόσδεσης. Οι υπολογισμοί MM-GBSA έδωσαν μια εξαιρετικά ευνοϊκή ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης  $-45.2 \pm 3.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ , υποδεικνύοντας μια ισχυρή και σταθερή αλληλεπίδραση μεταξύ ροσμαρινικού οξέος και Mpro (Πίνακας 3). Τα ευρήματά μας ευθυγραμμίζονται με αυτά των Shahhamzhehi *et al.*, σύμφωνα με τα οποία το ροσμαρινικό οξύ εμφάνισε μια συγγένεια δέσμευσης (Kd) 15,47  $\mu\text{M}$  στη Mpro του SARS-CoV-2. Επιπλέον, η έρευνά τους έδειξε ότι το ροσμαρινικό οξύ συνδέεται με τη Mpro του SARS-CoV-2 με τιμή IC50 9.43  $\mu\text{M}$  [248].



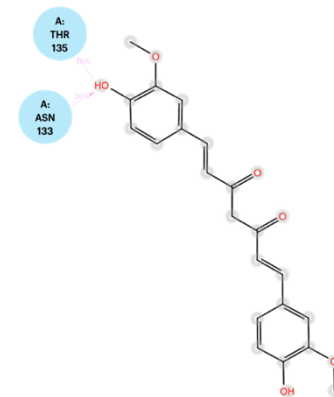
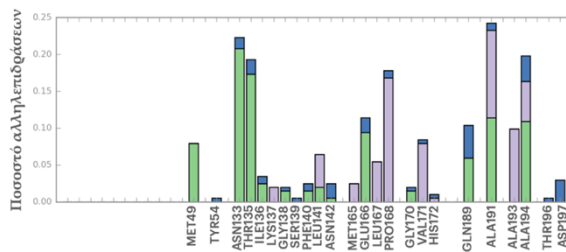
Εικόνα 20. Το διάγραμμα RMSD της από-πρωτεΐνης Mpro, τα σύμπλοκα «Mpro-φυσικά προϊόντα» και το RMSF είναι ευθυγραμμισμένα με τα άτομα Ca της πρωτεΐνης.

Το RMSD των προσδετών (ροσμαρινικό οξύ, κουρκουμίνη και κερκετίνη) ευθυγραμμίζεται με τις αρχικές τους συντεταγμένες του προσδέτη. Τα σκιασμένα πράσινα, ροζ και γαλάζια χρώματα υποδεικνύουν τις πρωτεϊνικές περιοχές I, II και III, αντίστοιχα, ενώ οι κίτρινες γραμμές ορίζουν τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης.

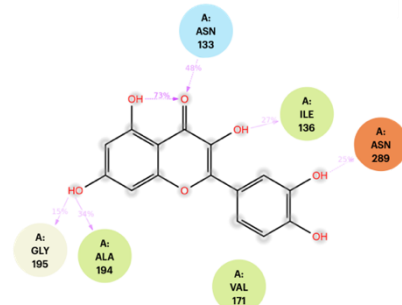
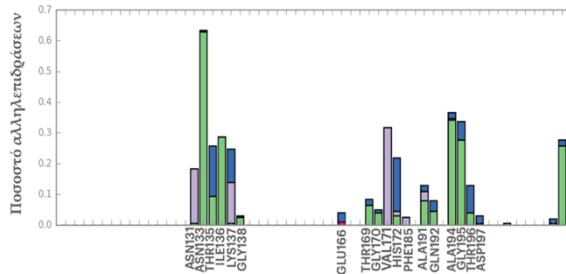
### Μpro - ροσμαρινικό οξύ



### Μpro - κουρκουμίνη



### Μpro - κερκετίνη



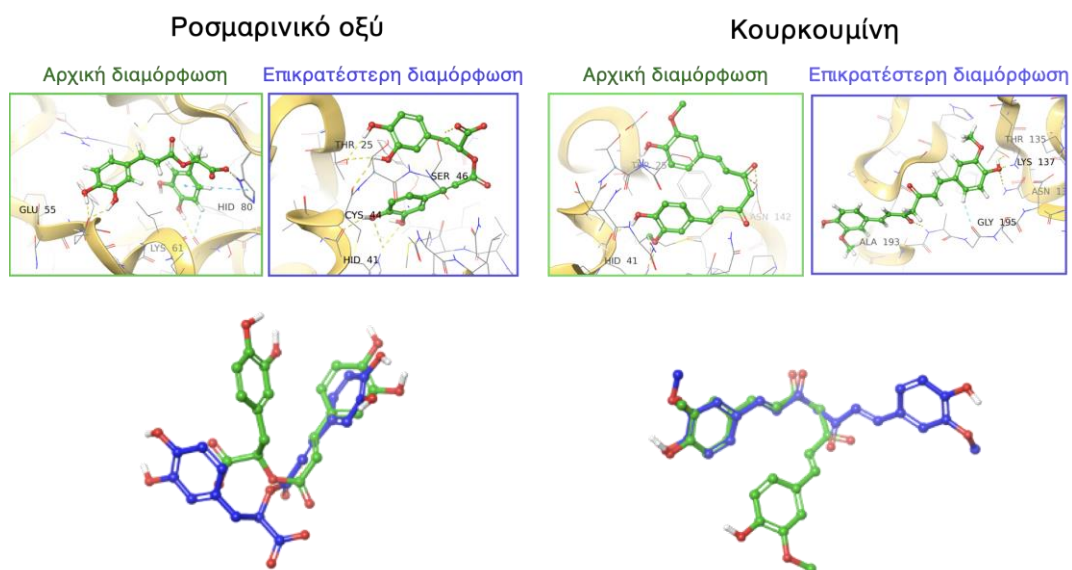
■ Δεσμοί-Η ■ Υδρόφοβες ■ Ιοντικές ■ Γέφυρες ύδατος

(α)

(β)

Εικόνα 21. Η ανάλυση αλληλεπιδράσεων για τα συμπλέγματα «Μpro – προσδέτη» κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. (α) Οι αλληλεπιδράσεις «Μpro – προσδέτη» κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους: Δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα), υδρόφοβες (μωβ χρώμα), ιοντικές (ματζέντα χρώμα) και γέφυρες ύδατος(μπλε χρώμα). (β) Το 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων των προσδετών με τα αμινοξέα της Μpro. Απεικονίζονται μόνο οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται περισσότερο από το 15,0% του χρόνου προσομοίωσης που αναλύθηκε.

Η ανάλυση τροχιάς του συμπλέγματος «Mpro-κουρκουμίνης» αποκαλύπτει διαμορφωτική ευελιξία καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου της προσομοίωσης, με υψηλή μέση τιμή RMSD  $4.0 \pm 1.2 \text{ \AA}$  για το σύμπλεγμα και  $3.1 \pm 0.6 \text{ \AA}$  για την κουρκουμίνη (Εικόνα 20). Αυτή η συμπεριφορά είναι σύμφωνη με την ανάλυση RMSF, η οποία δείχνει αξιοσημείωτες διακυμάνσεις (Εικόνα 20). Επίσης, η παρατήρηση αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω από την ανάλυση αλληλεπιδράσεων με τη Mpro, καθώς η κουρκουμίνη αλληλεπιδρά κυρίως με τα αμινοξέα Asn133 και Thr135 (Εικόνα 21), που επισημαίνονται επίσης στην επικρατέστερη διαμόρφωση μέσω ανάλυσης clustering με βάση το RMSD (Εικόνα 22). Αυτή διαμόρφωση υπογραμμίζει την ευελιξία της κουρκουμίνης μέσα στην περιοχή πρόσδεσης, σε σύγκριση με τη διαμόρφωση του αρχικού συμπλέγματος, καθώς οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Thr25, His41 και Asn142 δεν παρατηρούνται πλέον (Εικόνα 22). Τα παραπάνω υποδεικνύονται και από την υπέρθεση των δύο διαμορφώσεων (Εικόνα 22). Είναι ενδιαφέρον ότι παρά την παρατηρούμενη αστάθεια, οι υπολογισμοί MM-GBSA έδειξαν συνολική τιμή ελεύθερης ενέργειας  $-47.5 \pm 4.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ , υποδεικνύοντας μια ισχυρή και σταθερή αλληλεπίδραση μεταξύ Mpro και κουρκουμίνης (Πίνακας 3). Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με τις *in silico* και *vitro* μελέτες των Bahum *et al.*, όπου η κουρκουμίνη αναγνωρίστηκε ως ένας από τους κορυφαίους πέντε πιο ισχυρούς αναστολείς της Mpro του SARS-CoV-2. Αξίζει να σημειωθεί ότι το εύρημα αυτό ισχύει ακόμη και αν η κουρκουμίνη επέδειξε κάποιο βαθμό κινητικότητας κατά την περίοδο προσομοίωσης [249].



Εικόνα 22. Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης της αρχικής (πράσινο χρώμα) και

**επικρατέστερης διαμόρφωσης (μπλε χρώμα) των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής των δυο φυσικών προϊόντων, του ροσμαρινικού οξέος και της κουρκουμίνης, τα οποία εμφάνισαν τιμή RMSD μεγαλύτερη των 2 Å.**

Η ανάλυση MD του συμπλέγματος «Mpro – κερκετίνης» αποκάλυψε μια σταθερή αλληλεπίδραση μεταξύ κερκετίνης και Mpro. Συγκεκριμένα, το RMSD του συμπλέγματος «Mpro-κερκετίνης» έδειξε ένα σταθερό σύστημα καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου προσομοίωσης, εκτός από τα 125-160 ns, όπου παρατηρήθηκαν κάποιες διακυμάνσεις. Οι μέσες τιμές RMSD ήταν  $2.3 \pm 0.4$  Å για το σύμπλεγμα και  $0.9 \pm 0.5$  Å για την κερκετίνη. Αξίζει να ειπωθεί ότι η ανάλυση RMSD για το σύμπλεγμα εμφάνισε μικρές διακυμάνσεις, πιθανώς λόγω της μικρής δομής του προσδέτη. Το RMSF επέδειξε επίσης συνολική σταθερότητα, με εξαίρεση μια διακύμανση στα αμινοξέα 140-145 στον τομέα II, παρόλο που αυτά τα αμινοξέα δεν αποτελούν μέρος της περιοχής πρόσδεσης, σε σύγκριση με τη μορφή από πρωτεΐνης της πρωτεΐνης S (Εικόνα 20). Επιπλέον, η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ Mpro και κερκετίνη αποκάλυψε τον σχηματισμό πολλαπλών δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και γεφυρών ύδατος, με τα αμινοξέα Asn133, Ile136, Ala194, Glu195 και Asp289 (Εικόνα 21). Επιπλέον, οι υπολογισμοί MM-GBSA υπογράμμισαν την ισχύ της δέσμευσης, όπως αποδεικνύεται από τη χαμηλή συνολική ενεργειακή τιμή  $-33.8 \pm 5.2$  kcal mol<sup>-1</sup> (Πίνακας 3). Γεγονός που συμφωνεί με τα ευρήματα των Bahun *et al.*, τα οποία παρείχαν αποδείξεις για την ισχύ της κερκετίνης ως αναστολέα του SARS-CoV-2. Η έρευνά τους επιβεβαίωσε αυτή την αποτελεσματικότητα, αποκαλύπτοντας IC50 23.4 μM [249].

#### **4.7.2 Ανάλυση Μοριακής Δυναμικής συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης S – φυσικών προϊόντων»**

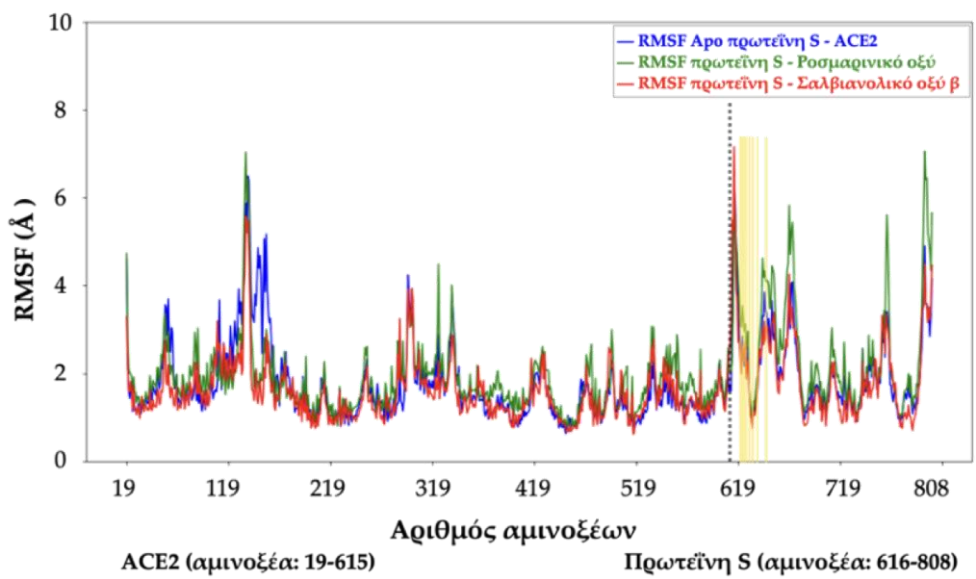
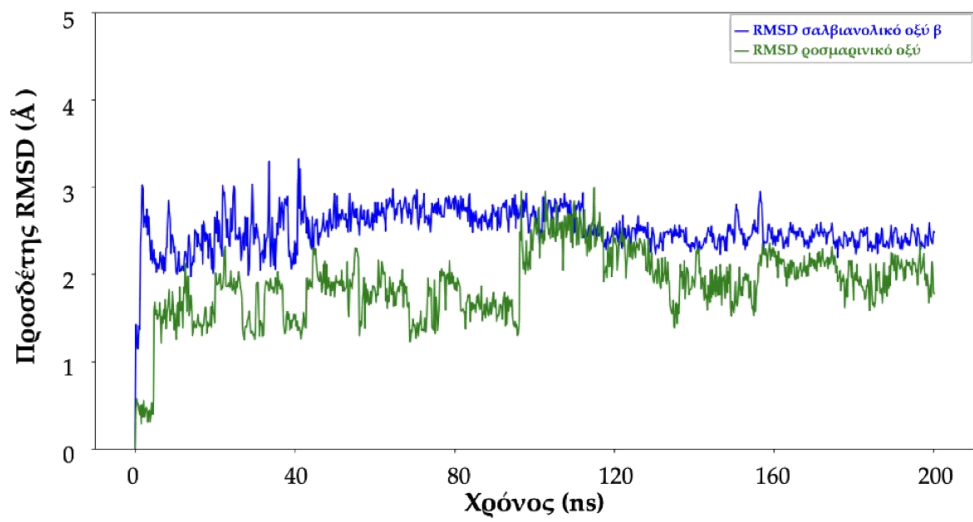
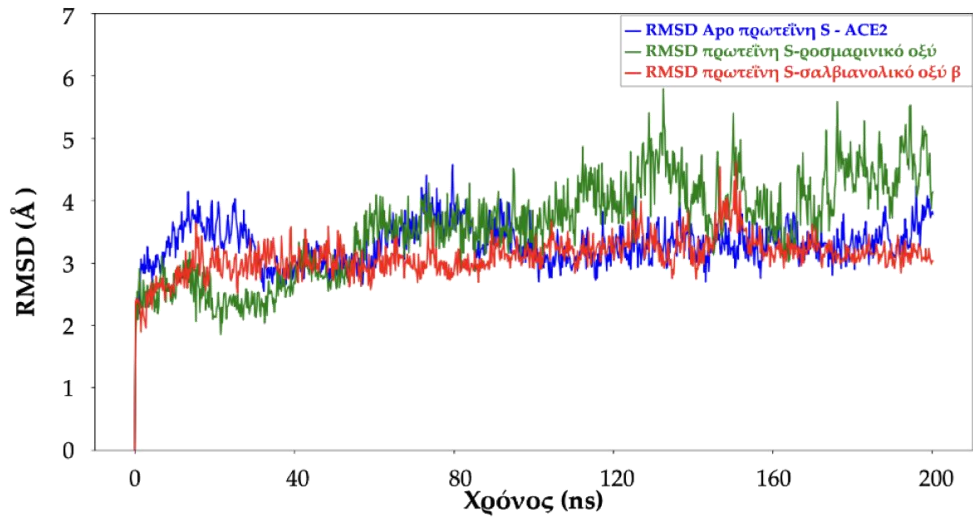
##### **4.7.2.1 Πρώτη περιοχή πρόσδεσης – Πρωτεΐνη S**

Από τα πειράματα IFD στην πρωτεΐνη S ενωμένης με το ACE2, για την πρώτη περιοχή πρόσδεσης, η οποία εντοπίζεται στην πρωτεΐνη S (αλυσίδα E), ξεχώρισαν το σαλβιανολικό οξύ β και το ροσμαρινικό οξύ.

Το RMSD του συμπλέγματος «πρωτεΐνης S - σαλβιανολικού οξέος β» υποδεικνύει τον σχηματισμό ενός σταθερού συμπλόκου καθ' όλη τη διάρκεια



του χρόνου προσομοίωσης, με μόνη εξαίρεση τα 150-160 ns, όπου παρατηρούνται κάποιες διακυμάνσεις (Εικόνα 23). Σε σύγκριση με την από-πρωτεΐνη S, η οποία εμφάνισε μέση τιμή RMSD  $3.2 \pm 0.4$  Å, στο υπό μελέτη σύμπλεγμά της με σαλβιανολικό οξύ β, η πρωτεΐνη εμφάνισε μέση τιμή RMSD  $3.1 \pm 0.3$  Å, ενδεικτικό ενός συστήματος που είναι διαμορφωτικά σταθερό. Το RMSD του σαλβιανολικού οξέος β εμφάνισε σύγκλιση με μέση τιμή RMSD  $3.7 \pm 0.4$  Å και μερικές μικρές διακυμάνσεις από 0 έως 40 ns. Επιπλέον, η ανάλυση RMSF για το σύμπλεγμα «πρωτεΐνης S - σαλβιανολικού οξέος β» εμφάνισε ελαφρές διακυμάνσεις κοντά στο αμινοξύ 619, αλλά γενικά είχε συμπεριφορά παρόμοια με αυτή της μορφής από-πρωτεΐνης (Εικόνα 23). Επιπλέον, η ανάλυση αποκάλυψε τον σχηματισμό πολλών κρίσιμων αλληλεπιδράσεων, οι οποίες περιλαμβάνουν πολλαπλούς δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και γέφυρες ύδατος με διάφορα αμινοξέα, με τις κυριότερες να σχηματίζονται με τα αμινοξέα Thr345, Arg346, Asn354, Arg355, Asn450 και Arg46 (Εικόνα 24). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις υπογραμμίζουν συνολικά τη σταθερή φύση του συμπλόκου «πρωτεΐνης S - σαλβιανολικού οξέος β», η οποία εμφανίζεται στην επικρατέστερη διαμόρφωση του συμπλέγματος και διατηρούνται σε σχέση με τη διαμόρφωση του αρχικού συμπλέγματος (Εικόνες 25, Π2.1). Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές στις διαμορφώσεις κατά την υπέρθεση των δυο διαμορφώσεων (Εικόνα 25). Επιπλέον, οι υπολογισμοί μας MM-GBSA απέδωσαν μια συνολική τιμή ελεύθερης ενέργειας για το σύστημα  $-56.5 \pm 4.9$  kcal mol<sup>-1</sup>, επιβεβαιώνοντας περαιτέρω τη σταθερότητα αυτής της πρόσδεσης (Πίνακας 3). Συνολικά, τα ευρήματά μας έδειξαν ότι η δέσμευση μεταξύ του σαλβιανολικού οξέος β και της πρωτεΐνης SARS-CoV-2 S στην πρώτη θέση δέσμευσης οδηγεί στον σχηματισμό ενός σταθερού συμπλέγματος, παρά ορισμένες διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στην ανάλυση MD. Τέλος, στη μελέτη που διεξήχθη από τους Hu *et al.*, το σαλβιανολικό οξύ β βρέθηκε να παρουσιάζει την υψηλότερη συγγένεια δέσμευσης μεταξύ των ενώσεων που δοκιμάστηκαν, εμφανίζοντας μια αξιοσημείωτη συγγένεια για τον ψευδοϊό ακίδας 2019-nCoV. Επιπλέον, το σαλβιανολικό β έδειξε την πιο ισχυρή δράση στον ψευδοϊό κατά της 2019-nCoV, αναστέλλοντας αποτελεσματικά την είσοδό του σε κύτταρα ACE2h [250].

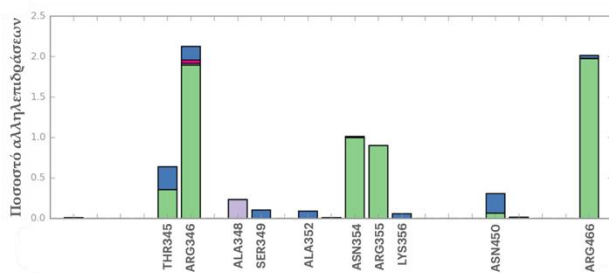


**Εικόνα 23.** Το διάγραμμα RMSD της από-πρωτεΐνης ακίδας, τα σύμπλοκα «πρωτεΐνη S-φυσικά προϊόντα» και το RMSF είναι ευθυγραμμισμένα με τα άτομα Ca της πρωτεΐνης. Το RMSD των προσδετών (ροσμαρινικό οξύ και σαλβιανολικό οξύ β) ευθυγραμμίζεται με τις αρχικές τους συντεταγμένες του προσδέτη. Οι κίτρινες γραμμές ορίζουν τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης.

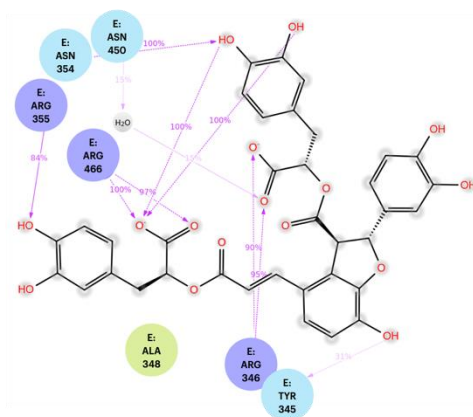
Το επόμενο σύμπλεγμα που μελετήθηκε μέσω προσομοιώσεων MD, ήταν της πρωτεΐνης S με το ροσμαρινικό οξύ. Το RMSD του συμπλέγματος «πρωτεΐνης S-ροσμαρινικού οξέος» αποκάλυψε ένα σταθερά πιο ευέλικτο σύστημα σ' όλη την προσομοίωση. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν πολυάριθμες διακυμάνσεις, που οδήγησαν σε μια μέση τιμή RMSD  $3.6 \pm 0.8 \text{ \AA}$ , υψηλότερη από την τιμή της από-πρωτεΐνης  $3.2 \pm 0.4 \text{ \AA}$  (Εικόνα 23). Αντίθετα, το ίδιο το ροσμαρινικό οξύ παρουσίασε μέση τιμή RMSD  $1.9 \pm 0.7 \text{ \AA}$  με αξιοσημείωτες διακυμάνσεις. Η ανάλυση RMSF έδειξε αρκετές έντονες κορυφές, δίνοντας περαιτέρω έμφαση στην αυξημένη δυναμική σε σύγκριση με την από-πρωτεΐνη, η οποία εμφανίζεται συνεπής με τα αποτελέσματα RMSD (Εικόνα 23). Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων κατά τη διάρκεια αυτής της σταθερής περιόδου αποκάλυψε κυρίαρχες αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένα αμινοξέα, κυρίως με τα Glu516, Leu517 και His519 (Εικόνα 24). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις υποδηλώνουν ότι το ροσμαρινικό οξύ μετατοπίστηκε ελαφρά από την αρχική του θέση, όπως αποδεικνύεται στην επικρατέστερη διαμόρφωση του συμπλέγματος «πρωτεΐνης S - ροσμαρινικού οξέος» (Εικόνες 25, Π2.1). Επιπρόσθετα, αυτό αποδείχθηκε συγκρίνοντάς την με την αρχική διαμόρφωση, όπου παρατηρήθηκαν αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Val341, Arg346, Ala348, Ser349, Ser399 και Asn450 (Εικόνα 25). Τέλος, ο υπολογισμός της συνολικής ελεύθερης ενέργειας του συστήματος μέσω MM-GBSA έδωσε μια τιμή  $-41.2 \pm 4.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Πίνακας 3).

## 1η περιοχή πρόσδεσης - πρωτεΐνη S

### Πρωτεΐνη S - σαβιανολικό οξύ β

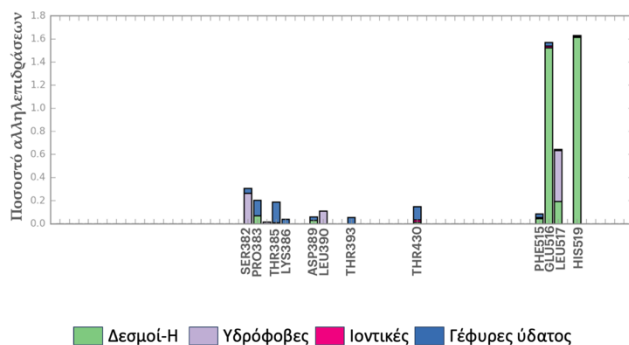


(α)



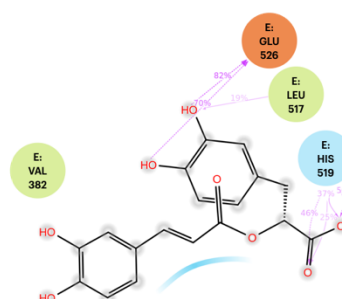
(β)

### Πρωτεΐνη S - ροσμαρινικό οξύ



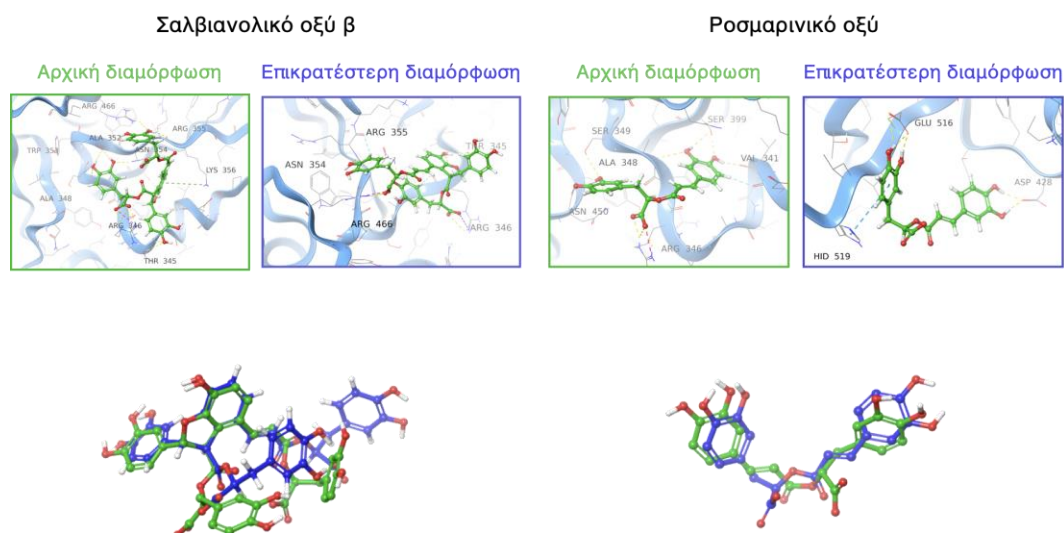
■ Δεσμοί-H ■ Υδρόφοβες ■ Ιοντικές ■ Γέφυρες ύδατος

(α)



(β)

**Εικόνα 24.** Η ανάλυση αλληλεπιδράσεων για τα συμπλέγματα «πρωτεΐνης S – προσδέτη» κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. (α) Οι αλληλεπιδράσεις «πρωτεΐνης S-προσδέτη» κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους: Δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα), υδρόφοβες (μωβ χρώμα), ιοντικές (ματζέντα χρώμα) και γέφυρες ύδατος(μπλε χρώμα). (β) Το 2D διάγραμμα αλληλεπιδράσεων των προσδετών με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης S. Απεικονίζονται μόνο οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται περισσότερο από το 15,0% του χρόνου προσομοίωσης που αναλύθηκε.



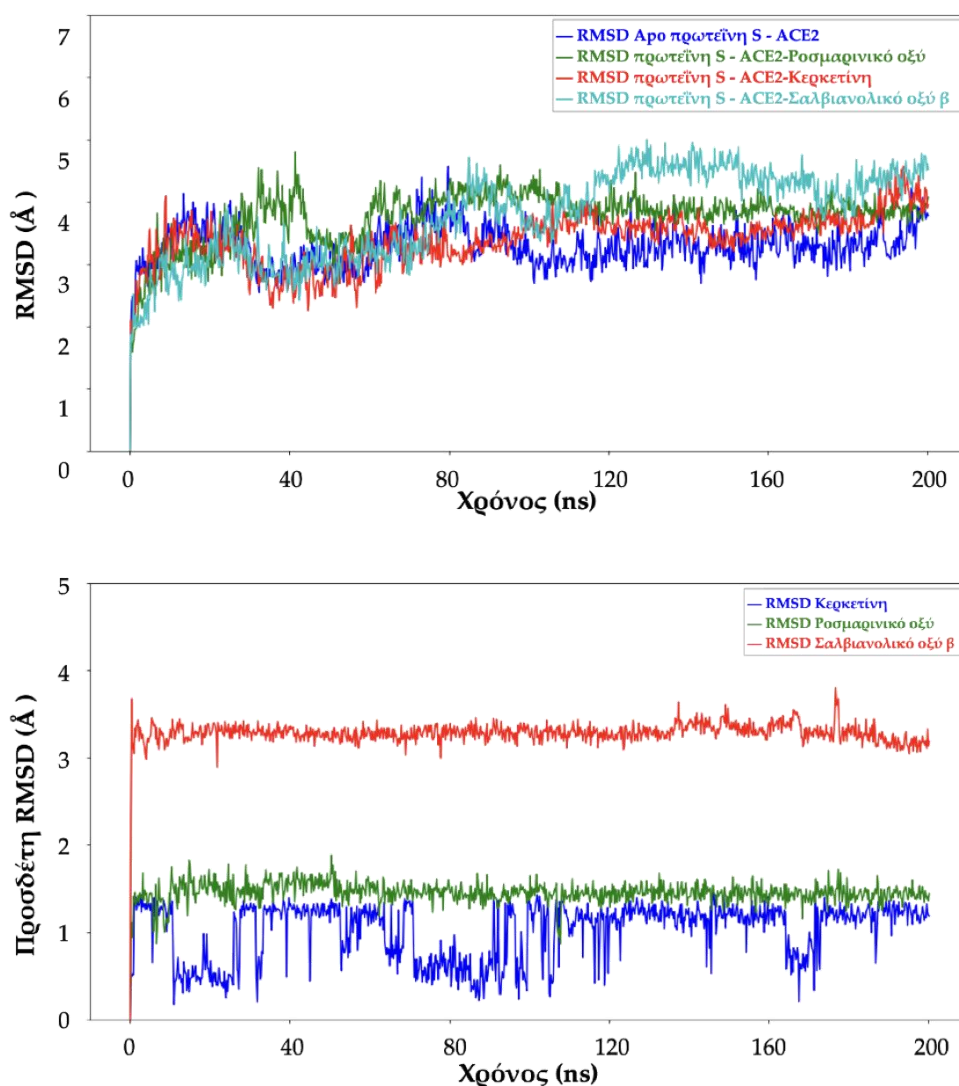
**Εικόνα 25.** Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης της αρχικής (πράσινο χρώμα) και επικρατέστερης διαμόρφωσης (μπλε χρώμα) των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής των δυο φυσικών προϊόντων, του σαλβιανολικού οξέος β και του ροσμαρινικού, τα οποία εμφάνισαν τιμή RMSD μεγαλύτερη των 2 Å.

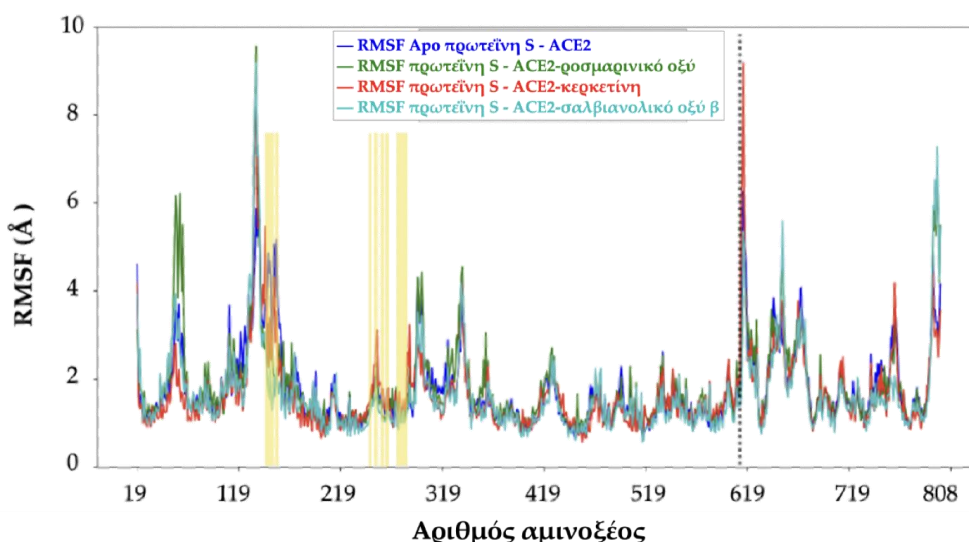
#### 4.7.2.2 Δεύτερη περιοχή πρόσδεσης – ACE2

Σύμφωνα με τα πειράματα IFD στην πρωτεΐνη S ενωμένης με το ACE2, για τη δεύτερη περιοχή πρόσδεσης, η οποία εντοπίζεται στο ACE2 (αλυσίδα A), το σαλβιανολικό οξύ β, η κερκετίνη, και το ροσμαρινικό οξύ εμφάνισαν τις ευνοϊκότερες ενέργειες πρόσδεσης.

Στην περίπτωση του συμπλέγματος «ACE2 - σαλβιανολικού οξέος β», η ανάλυση RMSD αποκάλυψε ένα ευέλικτο σύστημα καθ' όλη την προσομοίωση, που χαρακτηρίζεται από υψηλότερη μέση τιμή RMSD  $3.7 \pm 0.7$  Å σε σύγκριση με την τιμή RMSD της από-πρωτεΐνης, η οποία ήταν κατά μέσο όρο  $3.2 \pm 0.4$  Å (Εικόνα 26). Αντίθετα, η ανάλυση RMSD ( $3,2 \pm 0,4$  Å) του σαλβιανολικού οξέος β στην αρχή της προσομοίωσης έδειξε διαμορφωτικές αλλαγές νωρίς στην προσομοίωση, οι οποίες σταθεροποιήθηκαν με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, η ανάλυση RMSF του υπό διερεύνηση συμπλόκου έδειξε σημαντικές διακυμάνσεις σε ορισμένα αμινοξέα, υπογραμμίζοντας την ευελιξία αυτών των ειδικών θέσεων αμινοξέων (Εικόνα 26). Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτά τα αμινοξέα δεν εμπλέκονται άμεσα στην περιοχή πρόσδεσης του συμπλέγματος ούτε σχημάτισαν αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων του συμπλέγματος αποκάλυψε τον σχηματισμό αρκετών

αλληλεπιδράσεων με τα αμινοξέα Arg161, Lys247, Ala251 και Tyr252, που εντοπίζονται κοντά στο ACE2 (αλυσίδα A), καθώς και με το Lys458, που εντοπίζεται στην πρωτεΐνη S (αλυσίδα E) (Εικόνες 27, 28). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις διέφεραν από την αρχική διαμόρφωση του συμπλέγματος, υποδεικνύοντας την ελαφρά μετατόπιση στην τοποθέτηση εντός της συγκεκριμένης περιοχής, καθώς δεν παρατηρήθηκαν πλέον αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Glu150, Asn154, Leu156, Ala251, Tyr252, Asn277 και Ser 280 (Εικόνα 28). Επίσης, αυτό είναι ξεκάθαρο υπερθέτοντας τις δυο διαμορφώσεις τους (Εικόνα 28). Τέλος, οι υπολογισμοί MM-GBSA επιβεβαίωσαν τη σταθερότητα του συμπλέγματος, όπως αποδεικνύεται από τη συνολική τιμή ελεύθερης ενέργειας  $-42.6 \pm 5.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Πίνακας 3).





. Εικόνα 26. Το διάγραμμα RMSD της από-πρωτεΐνης ακίδας, των συμπλόκων «ACE2-φυσικών προϊόντων» και το RMSF είναι ευθυγραμμισμένα με τα άτομα Ca της πρωτεΐνης. Το RMSD των προσδετών (ροσμαρινικό οξύ, σαλβιανολικό οξύ β και κερκετίνη) ευθυγραμμίζεται με τις αρχικές τους συντεταγμένες του προσδέτη. Οι κίτρινες γραμμές ορίζουν τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης.

Η ανάλυση του RMSD για το σύμπλεγμα «ACE2 - κερκετίνης» αποκάλυψε αρκετές αξιοσημείωτες διακυμάνσεις, ιδιαίτερα εμφανείς μεταξύ 80 και 200 ns. Η μέση τιμή RMSD για το σύμπλεγμα ήταν ίση με  $3.4 \pm 0.4 \text{ \AA}$ , η οποία αντικατοπτρίζει στενά την τιμή RMSD για τη απο-πρωτεΐνης ( $3.2 \pm 0.4 \text{ \AA}$ ) (Εικόνα 26). Αντίθετα, η κερκετίνη εμφάνισε μέση τιμή RMSD  $1.0 \pm 0.3 \text{ \AA}$ , εμφανίζοντας διακυμάνσεις σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης. Επιπλέον, η ανάλυση RMSF υπογράμμισε την ευελιξία ορισμένων αμινοξέων, παρά το γεγονός ότι αυτά τα αμινοξέα δεν ήταν ούτε μέρος της περιοχής πρόσδεσης, ούτε σχημάτισαν κυρίαρχες αλληλεπιδράσεις με το συγκεκριμένο σύμπλεγμα. Αρκετοί τύποι αλληλεπιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων των δεσμών υδρογόνου, των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, των ιοντικών αλληλεπιδράσεων και των υδάτινων γεφυρών παρατηρήθηκαν. Οι πιο εμφανείς αλληλεπιδράσεις σχηματίστηκαν με τα αμινοξέα Asn149, His265, Gly268 και Asp615 (Εικόνα 27), όπως απεικονίζεται στην επικρατέστερη διαμόρφωση του συμπλέγματος (Εικόνα Π2.1). Η συνολική ελεύθερη ενέργεια του συστήματος ποσοτικοποιήθηκε σε  $-40.9 \pm 6.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Πίνακας 3).

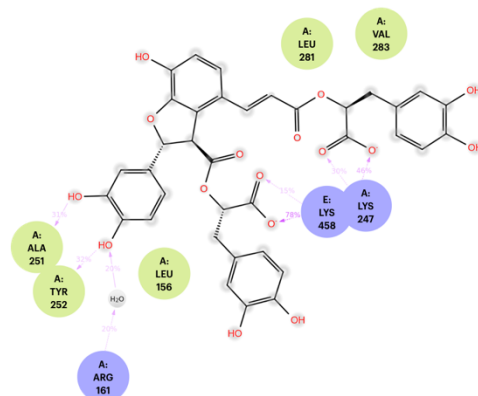
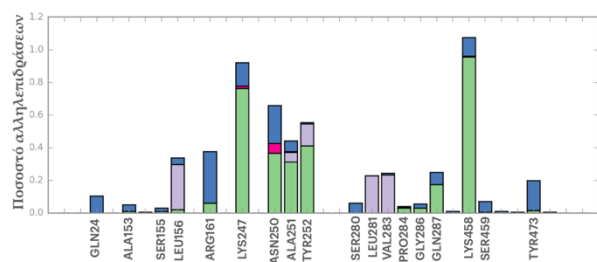
Τέλος, πραγματοποιήσαμε προσομοιώσεις MD για να διερευνήσουμε το σύμπλεγμα «ACE2 – ροσμαρινικού οξέος» στη δεύτερη θέση δέσμευσης. Η

ανάλυση RMSD του συμπλέγματος «ACE2 – ροσμαρινικού οξέος» αποκάλυψε αξιοσημείωτες διακυμάνσεις, οι οποίες παρατηρήθηκαν κυρίως μέχρι τα 80 ns. Ωστόσο, από 80 έως 200 ns, το σύστημα διατήρησε τη σταθερότητά του, με μέση τιμή RMSD  $3.7 \pm 0.4 \text{ \AA}$  (Εικόνα 26). Αυτό υποδηλώνει ότι το σύμπλεγμα έφτασε σε μια σταθερή διαμόρφωση κατά τη διάρκεια αυτής της μεταγενέστερης περιόδου. Αντίθετα, το ίδιο το ροσμαρινικό οξύ εμφάνισε μέση τιμή RMSD  $1.4 \pm 0.1 \text{ \AA}$  σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, υποδεικνύοντας τη σταθερότητα του εντός της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, η ανάλυση RMSF του συμπλέγματος που μελετήθηκε έμοιαζε πολύ με αυτήν της απο-πρωτεΐνης, με εξαίρεση κάποιες αξιοσημείωτες διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στα αμινοξέα 38-42. Αυτές οι διακυμάνσεις στη συγκεκριμένη περιοχή ήταν οι μόνες διακριτές αποκλίσεις από το συνολικό πρότυπο σταθερότητας που παρατηρήθηκε στο σύμπλεγμα. Η ανάλυση αλληλεπιδράσεων έδειξε αρκετές σχηματιζόμενες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ιοντικές αλληλεπιδράσεις και γέφυρες ύδατος. Μεταξύ αυτών των αλληλεπιδράσεων, εκείνες με τα αμινοξέα Asn157, Leu156 και Asn277 ήταν οι επικρατέστερες, οι οποίες επίσης καταγράφηκαν και μέσω clustering του συμπλέγματος «ACE2-ροσμαρινικού οξέος» (Εικόνα 27, Π2.1). Η συνολική σταθερότητα του συστήματος επιβεβαιώθηκε από τη συνολική τιμή ελεύθερης ενέργειας  $-41.0 \pm 3.8 \text{ kcal mol}^{-1}$  μέσω υπολογισμών MM-GBSA (Πίνακας 3)..

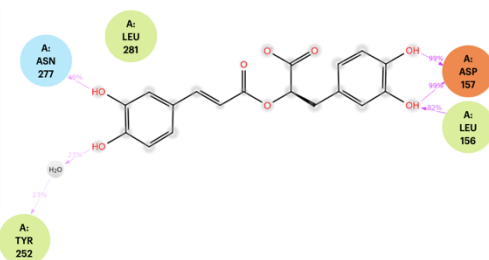
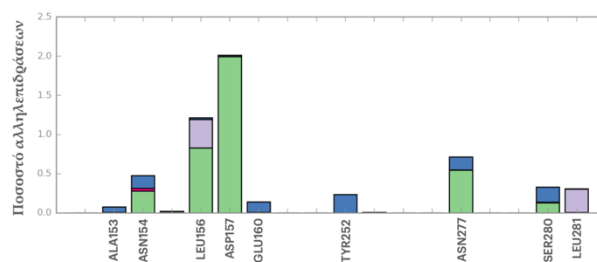


## 2η περιοχή πρόσδεσης - ACE2

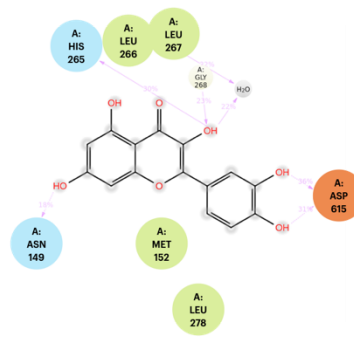
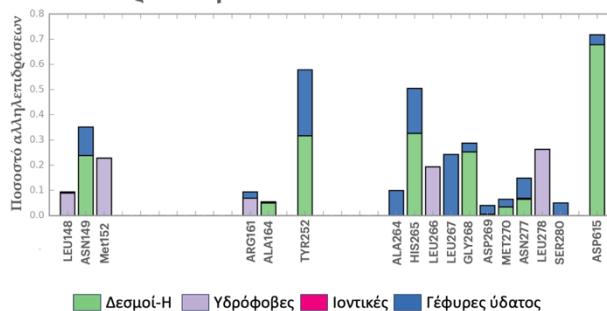
ACE2 - σαβιανολικό οξύ β



ACE2 - ροσμαρινικό οξύ



ACE2 - κερκετίνη

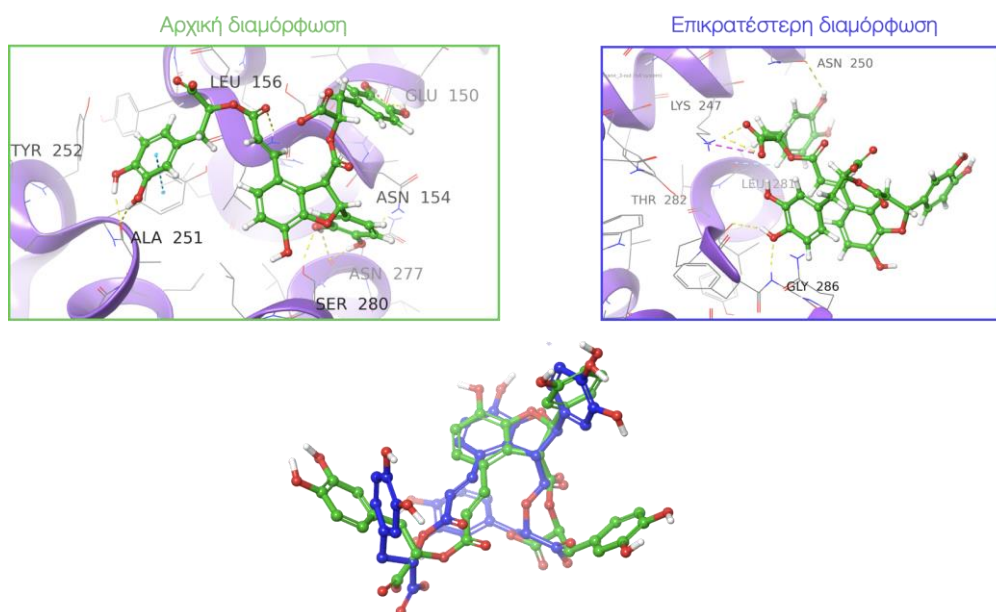


■ Δεσμοί-H ■ Υδρόφοβες ■ Ιοντικές ■ Γέφυρες ύδατος  
 (α)

(β)

Εικόνα 27. (α) Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων για τα συμπλέγματα «ACE2 – προσδέτη» για τη δεύτερη περιοχή πρόσδεσης κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – προσδέτη κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους: Δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα), υδρόφοβοι (μωβ χρώμα), ιοντικοί (ματζέντα χρώμα) και γέφυρες νερού (μπλε χρώμα). (β) Το 2D διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων του προσδέτη με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2. Απεικονίζονται μόνο οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν περισσότερο από το 15,0% του χρόνου προσομοίωσης.

## Σαλβιανολικό οξύ β



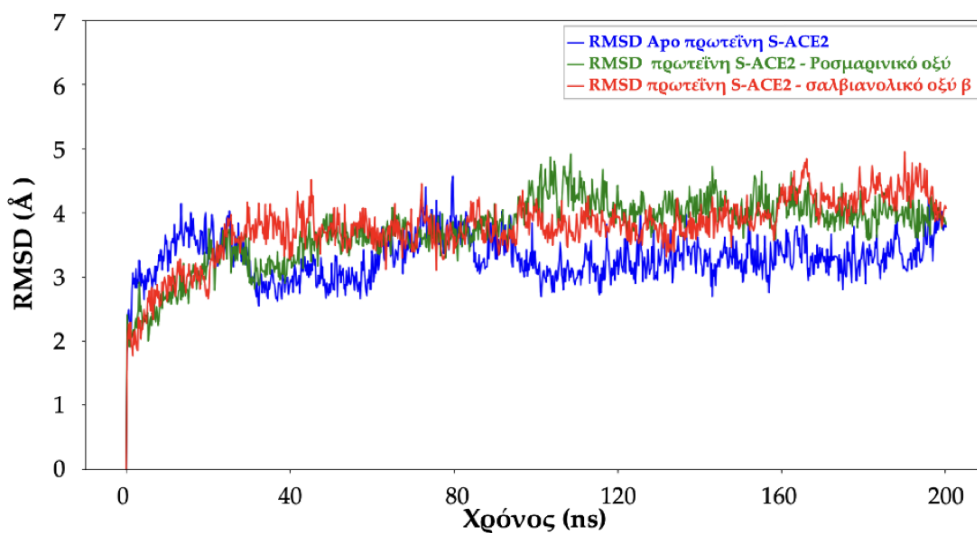
**Εικόνα 28.** Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης της αρχικής (πράσινο χρώμα) και επικρατέστερης διαμόρφωσης (μπλε χρώμα) των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής του σαλβιανολικού οξέος β, το οποίο εμφάνισε τιμή RMSD μεγαλύτερη των 2 Å.

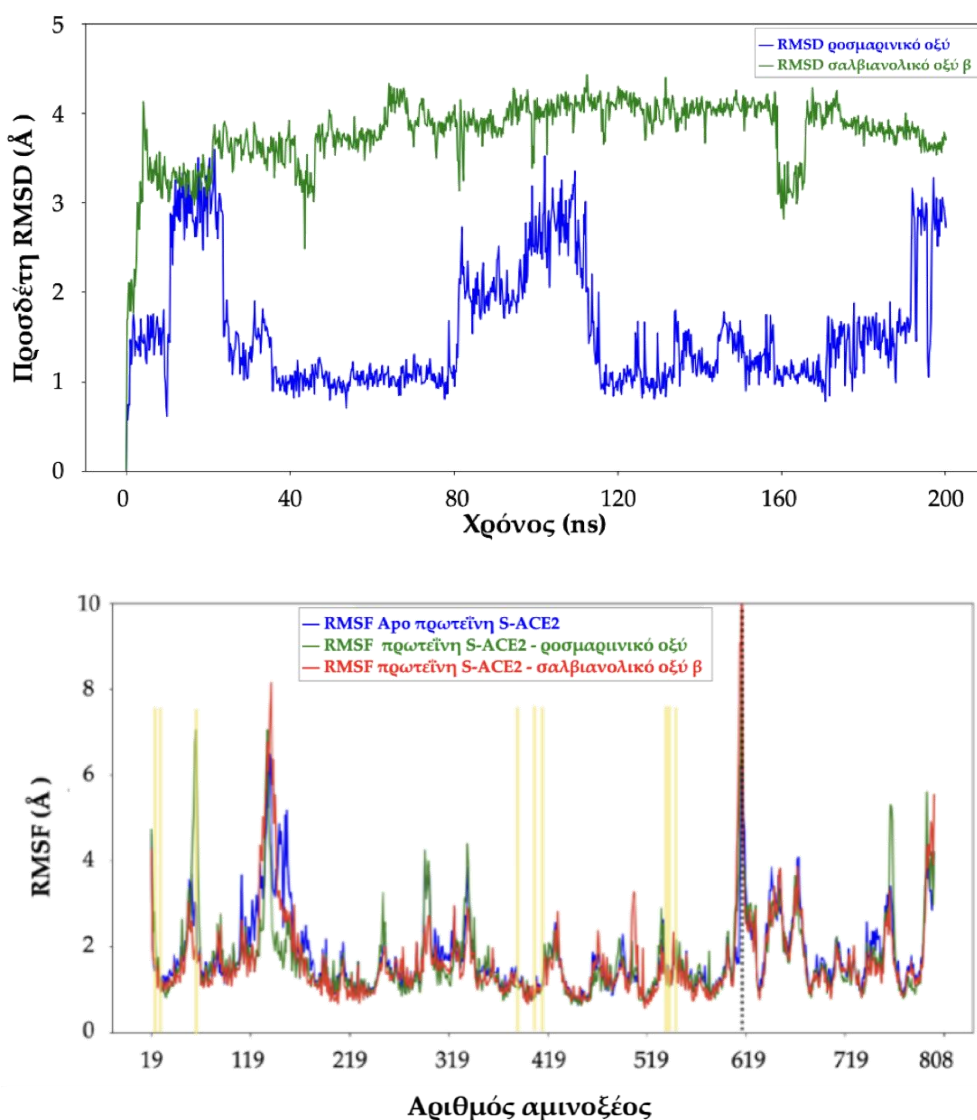
### 4.7.2.3 Τρίτη περιοχή πρόσδεσης – «Νέα περιοχή πρόσδεσης»

Πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις MD για να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης S ενωμένης και του σαλβιανολικού οξέος β, καθώς και της πρωτεΐνης S και του ροσμαρινικού οξέος, στην τελευταία περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης S.

Η ανάλυση RMSD του συμπλόκου «πρωτεΐνης S-σαλβιανολικού οξέος β» έδειξε σταθερότητα πρωτεΐνης, που χαρακτηρίζεται από μέση τιμή RMSD  $3.8 \pm 0.5$  Å σε όλη την προσομοίωση (Εικόνα 29). Το ίδιο το σαλβιανολικό οξύ β εμφάνισε μέσο όρο RMSD  $3.7 \pm 0.4$  Å, με αξιοσημείωτες διακυμάνσεις να εμφανίζονται σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία, συγκεκριμένα, 20, 70, 80 και 100 ns και κατά το διάστημα από 155 έως 165 ns. Επιπλέον, η ανάλυση RMSF αυτού του συμπλόκου αντικατόπτριζε στενά τη συμπεριφορά της από-πρωτεΐνης, με εξαίρεση τις πιο έντονες διακυμάνσεις που παρατηρήθηκαν στα αμινοξέα 115 και 600 (Εικόνα 29). Τα συγκεκριμένα αμινοξέα εμφάνισαν πιο έντονες διακυμάνσεις σε σύγκριση με το συνολικό πρότυπο σταθερότητας που

παρατηρήθηκε στο σύμπλεγμα. Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μας αποκάλυψε διάφορους τύπους αλληλεπιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ιοντικών αλληλεπιδράσεων και γεφυρών νερού, που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα που αποτελούν τη περιοχή πρόσδεσης. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτες ήταν οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίστηκαν με τα αμινοξέα Arg408, Gln409, Thr415, Lys417, Asp420 και Tyr421 στην πρωτεΐνη S (αλυσίδα E), καθώς και το αμινοξύ Asp30 στο ACE2 (αλυσίδα A), οι οποίες συμβάλλουν σε ένα μοτίβο αλληλεπίδρασης (Εικόνες 30, Π2.1), όπως αποτυπώνεται στην επικρατέστερη διαμόρφωση συμπλόκου «πρωτεΐνης S-σαλβιανολικού οξέος β» (Εικόνα Π2.1). Ωστόσο, παρατηρήθηκε μια ελαφρά μετατόπιση σε σχέση με την αρχική διαμόρφωση, καθώς οι αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Ala386, Ala387, Arg408 και Arg559 δεν διατηρήθηκαν (Εικόνες 31, Π2.1). Αυτό τονίστηκε επίσης με την υπέρθεση των δύο διαμορφώσεων (Εικόνα 31). Η συνολική ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης του συστήματος, που προσδιορίστηκε μέσω των υπολογισμών MM-GBSA, υπολογίστηκε ως ίση με  $-35.3 \pm 5.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ , υπογραμμίζοντας την εύνοια του σχηματισμού του συμπλέγματος (Πίνακας 3).





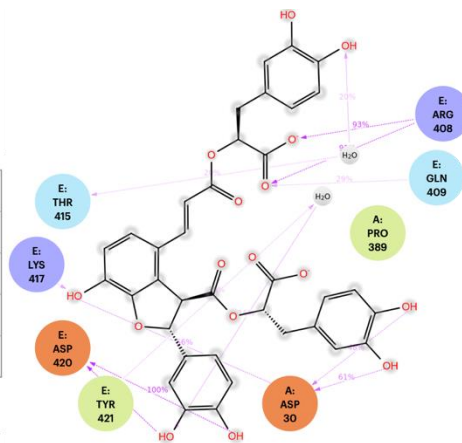
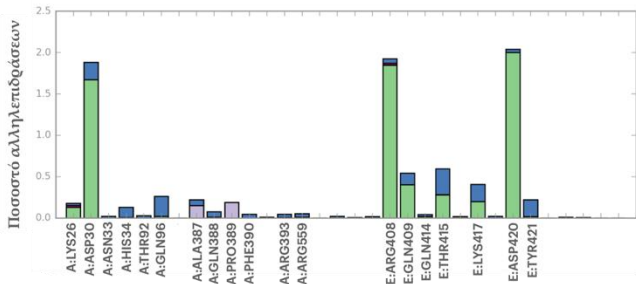
**Εικόνα 29.** Το διάγραμμα RMSD της από-πρωτεΐνης ακίδας, των συμπλόκων «πρωτεΐνης S-φυσικών προϊόντων» και το RMSF είναι ευθυγραμμισμένα με τα άτομα Ca της πρωτεΐνης. Το RMSD των προσδετών (ροσμαρινικό οξύ και σαλβιανολικό οξύ β) ευθυγραμμίζεται με τις αρχικές τους συντεταγμένες του προσδέτη. Οι κίτρινες γραμμές ορίζουν τα αμινοξέα της περιοχής πρόσδεσης.

Η ανάλυση RMSD του συμπλέγματος «S πρωτεΐνης - ροσμαρινικού οξέος» φανέρωσε τη διαμορφωτική ευελιξία της πρωτεΐνης, που χαρακτηρίζεται από μέση τιμή RMSD  $3.7 \pm 0.5 \text{ \AA}$  σε όλη την προσομοίωση (Εικόνα 29). Αντίθετα, η μέση τιμή RMSD για το ίδιο το ροσμαρινικό οξύ υπολογίστηκε ίση με  $1.6 \pm 0.7 \text{ \AA}$ , με τις περισσότερες αλλαγές να παρατηρούνται κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων χρονικών διαστημάτων, συγκεκριμένα, από 80 έως 110 ns και από 190 έως 200 ns. Επιπλέον, η ανάλυση RMSF αυτού του συμπλέγματος

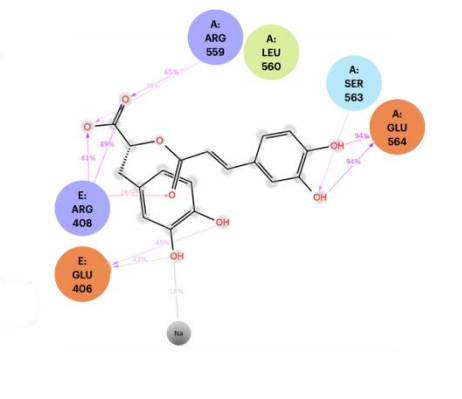
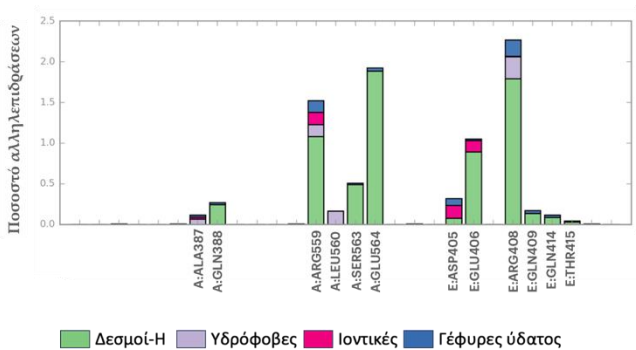
αντικατοπτρίζει στενά τη συμπεριφορά της από-πρωτεΐνης, με μερικές εμφανείς εξαιρέσεις. Οι πιο έντονες διακυμάνσεις αφορούσαν τα αμινοξέα 45 και 600, που αντιπροσωπεύουν αποκλίσεις από το συνολικό πρότυπο σταθερότητας που παρατηρήθηκε στο σύμπλεγμα. Για να διασαφηνίσουμε την επιλεκτικότητα και τα πρότυπα αλληλεπίδρασης προσδέτη, προσδιορίσαμε τον συνολικό αριθμό αλληλεπιδράσεων «πρωτεΐνης-προσδέτη» για τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. Ταυτοποιήθηκαν πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα εντός της περιοχής πρόσδεσης, συμπεριλαμβανομένων δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ιοντικών αλληλεπιδράσεων και γέφυρες ύδατος. Οι πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις του ροσμαρινικού οξέος παρατηρήθηκαν με τα αμινοξέα της S πρωτεΐνης Glu406 και Arg408, καθώς και με τα Arg559, Ser563 και Glu564 στο ACE2 (Εικόνες 30, Π2.1), που δεν περιλαμβάνουν πλέον το Gln96 σε σχέση με την αρχική διαμόρφωση (Εικόνα 31), που υποδεικνύει τη διαμορφωτική αλλαγή του ροσμαρινικού οξέος κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, καθώς και από την υπέρθεση της αρχικής και της επικρατέστερης διαμόρφωσης (Εικόνα 31). Τέλος, η συνολική τιμή ελεύθερης ενέργειας υπολογίστηκε ως ίση με  $-40.4 \pm 9.1 \text{ kcal mol}^{-1}$  (Πίνακας 3).

### 3η περιοχή πρόσδεσης

Πρωτεΐνη S - σαλβιανολικό οξύ β



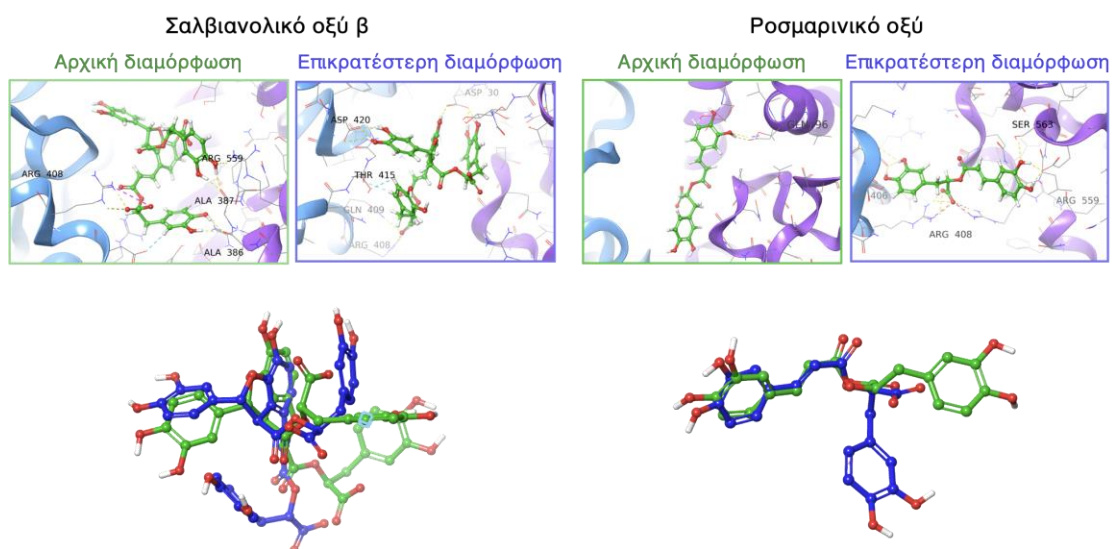
Πρωτεΐνη S - ροσμαρινικό οξύ



(α)

(β)

Εικόνα 30. (α) Η ανάλυση των αλληλεπιδράσεων για τα συμπλέγματα «πρωτεΐνη S – προσδέτη» για την Τρίτη περιοχή πρόσδεσης κατά τα τελευταία 40 ns της προσομοίωσης. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης – προσδέτη κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις τύπους: Δεσμοί υδρογόνου (πράσινο χρώμα), υδρόφοβοι (μωβ χρώμα), ιοντικοί (ματζέντα χρώμα) και γέφυρες νερού (μπλε χρώμα). (β) Το 2D διάγραμμα των αλληλεπιδράσεων του προσδέτη με τα αμινοξέα της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2. Απεικονίζονται μόνο οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν περισσότερο από το 15,0% του χρόνου προσομοίωσης.



**Εικόνα 31.** Τα αποτελέσματα της υπέρθεσης της αρχικής (πράσινο χρώμα) και επικρατέστερης διαμόρφωσης (μπλε χρώμα) των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής των δυο φυσικών προϊόντων, του σαλβιανολικού οξέος β και του ροσμαρινικού, τα οποία εμφάνισαν τιμή RMSD μεγαλύτερη των 2 Å.

#### 4.8. Αναζήτηση ενώσεων με βάση τη δομική ομοιότητα

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της Μοριακής Πρόσδεσης και των προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής προχωρήσαμε στο επόμενο στάδιο, το οποίο ήταν η αναζήτηση ενώσεων που παρουσιάζουν δομική ομοιότητα με την κερκετίνη, το ροσμαρινικό οξύ και το σαλβιανολικό οξύ β μέσω του Enalos Suite της εταιρείας NovaMechanics Ltd.

Το Enalos Suite είναι μια πλατφόρμα Χημειοπληροφορικής για την ανακάλυψη φαρμάκων, η οποία αναπτύχθηκε από την εταιρεία NovaMechanics Ltd μέσω της οποίας επιτρέπεται η χρήση ισχυρών μοντέλων με υψηλή προγνωστική ισχύ σύμφωνα με τις αρχές του Οργανισμού Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) σχετικά με τη συλλογή, ανάλυση και αναφορά χημικών και τοξικολογικών δεδομένων. Αυτές οι αρχές είναι σημαντικές στη Χημειοπληροφορική, καθώς διευκολύνουν την ανταλλαγή χημικών πληροφοριών μεταξύ χωρών, προωθούν τη χρήση τυποποιημένων μεθόδων δοκιμών και ενισχύουν την αξιολόγηση ασφάλειας των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε διάφορες βιομηχανίες, συμπεριλαμβανομένων των φαρμακευτικής και της γεωργικής βιομηχανίας. Η συνάρτηση 'Similar

Compounds' που είναι διαθέσιμη στο Enalos Suite χρησιμοποιήθηκε για τη λήψη των ενώσεων που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων PubChem, οι οποίες είναι παρόμοιες με τα τρία προαναφερθέντα φυσικά προϊόντα. Ο συντελεστής Tanimoto, ένα δημοφιλές μέτρο ομοιότητας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ομοιότητας των μορίων από άποψη χημικής δομής. Αυτή η μέτρηση υπολογίζει τον υπό σύγκριση κοινό αριθμό των χημικών χαρακτηριστικών δύο μορίων. Ρυθμίζοντας το ποσοστό της επιθυμητής ομοιότητας στο 99%, εντοπίστηκαν συνολικά 115 παρόμοιες ενώσεις για το σαλβιανολικό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και την κερκετίνη [251, 252].

#### 4.8.1 Αποτελέσματα αναζήτησης ενώσεων με βάση τη δομή

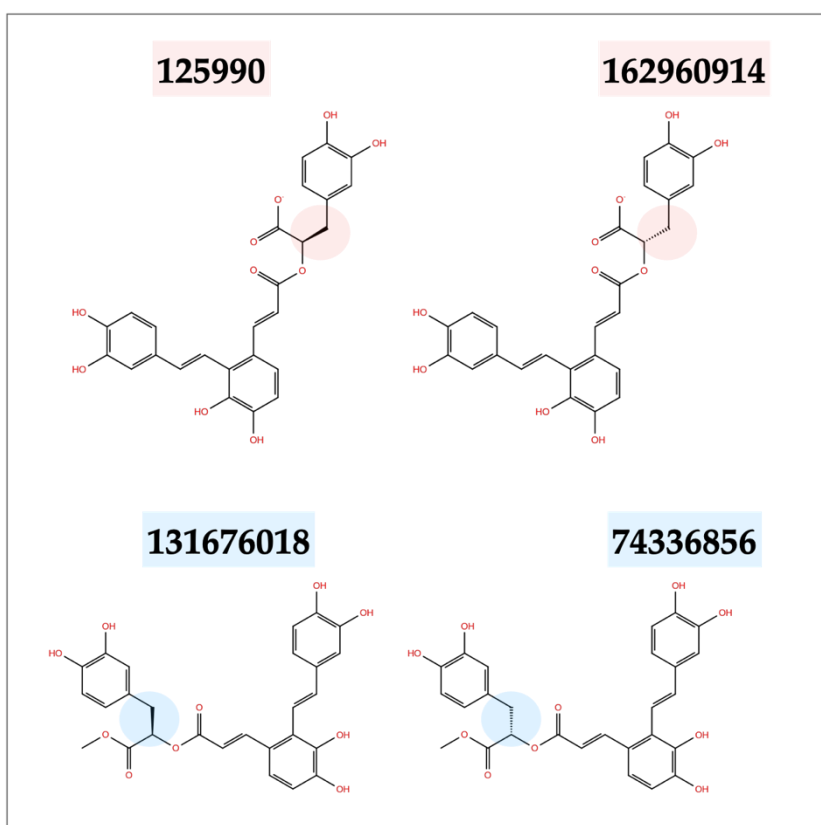
Η αναζήτηση ενώσεων με βάση τη δομική ομοιότητα που διεξήχθη με τη χρήση της Enalos suite κατέληξε στην ταυτοποίηση 115 ενώσεων με δομές παρόμοιες με το σαλβιανολικό οξύ β, το ροσμαρινικό οξύ, και την κερκετίνη. Αυτές οι ενώσεις στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε πειράματα Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης έναντι του ενζύμου Mpro και της πρωτεΐνης S του ιού SARS-CoV-2, χρησιμοποιώντας σταθερές τις παραμέτρους για όλες τις θέσεις πρόσδεσης.

Για το ένζυμο Mpro, τα αποτελέσματα IFD έδειξαν ότι οι ενώσεις με τα CID 131676018, 502233, 7439584, 125990 και 24812412 εμφάνισαν ισχυρές συγγένειες δέσμευσης, που κυμαίνονται από -16.5 έως -15.1 kcal mol<sup>-1</sup>. Για την πρώτη περιοχή πρόσδεσης στην πρωτεΐνη S, όπου εντοπίζεται στην ίδια την πρωτεΐνη S (αλυσίδα E), τα αποτελέσματα της IFD αποκάλυψαν ότι οι ενώσεις με CID 130345966, 5315615, 439589, 131676018 και 162859052 έδειξαν τις ισχυρότερες, συγγένειες δέσμευσης με εύρος από -14.8 έως -13.5 kcal mol<sup>-1</sup>.

Σχετικά με τη δεύτερη περιοχή πρόσδεσης, που εντοπίζεται στο ACE2 (αλυσίδα A), οι ενώσεις με CID, 133561492, 74539584, 390474 και 159600901, εμφάνισαν συγγένειες δέσμευσης που κυμαίνονται από -11.0 έως -9.5 kcal mol<sup>-1</sup>. Τέλος, τα αποτελέσματα του IFD για την τρίτη περιοχή πρόσδεσης, έδειξαν ελαφρώς χαμηλότερες τιμές συγγένειας δέσμευσης (-10.8 kcal mol<sup>-1</sup>), τις οποίες εμφάνισαν οι ενώσεις με CID 125990, 74336856, 74336856, 51352598 και 1427507360.



Επιπλέον, μέσω των πειραμάτων IFD διακρίναμε με επιτυχία δύο ενώσεις και τα αντίστοιχα εναντιομερή τους, τα οποία εμφάνισαν σταθερά ισχυρές συγγένειες δέσμησης σε όλες τις εξεταζόμενες πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, τα εναντιομερή 131676018/74336856 και 162960914/125990 (όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 32) εμφάνισαν συγγένειες δέσμησης εντός του ίδιου εύρους (όπως περιγράφεται στον Πίνακα 4). Στην επακόλουθη ανάλυση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ κάθε συμπλέγματος πρωτεΐνης (Mpro/S) - προσδέτη παρατηρήσαμε τον σχηματισμό πολυάριθμων επαφών (Εικόνα 33). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις αποσαφηνίζουν τις εξαιρετικές δεσμευτικές συγγένειες που παρατηρήθηκαν στη μελέτη μας.



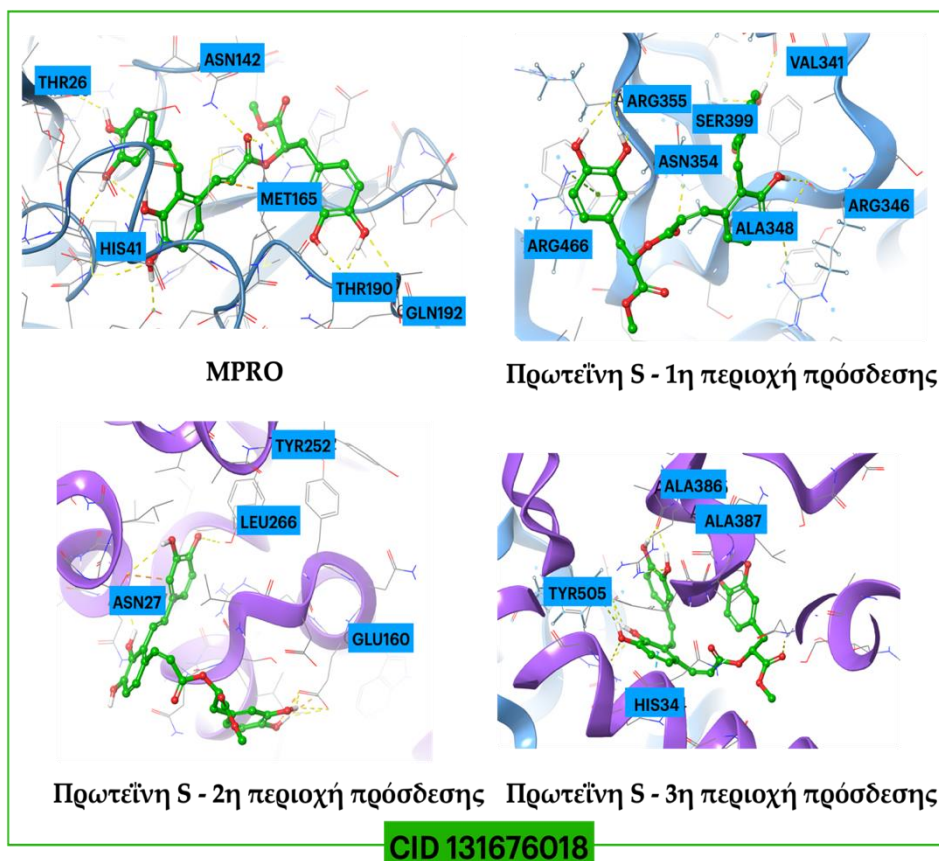
**Εικόνα 32.** Οι 2D δομές των δύο αναστολέων πολλαπλών στόχων για το SARS-CoV-2 και τα εναντιομερή τους.

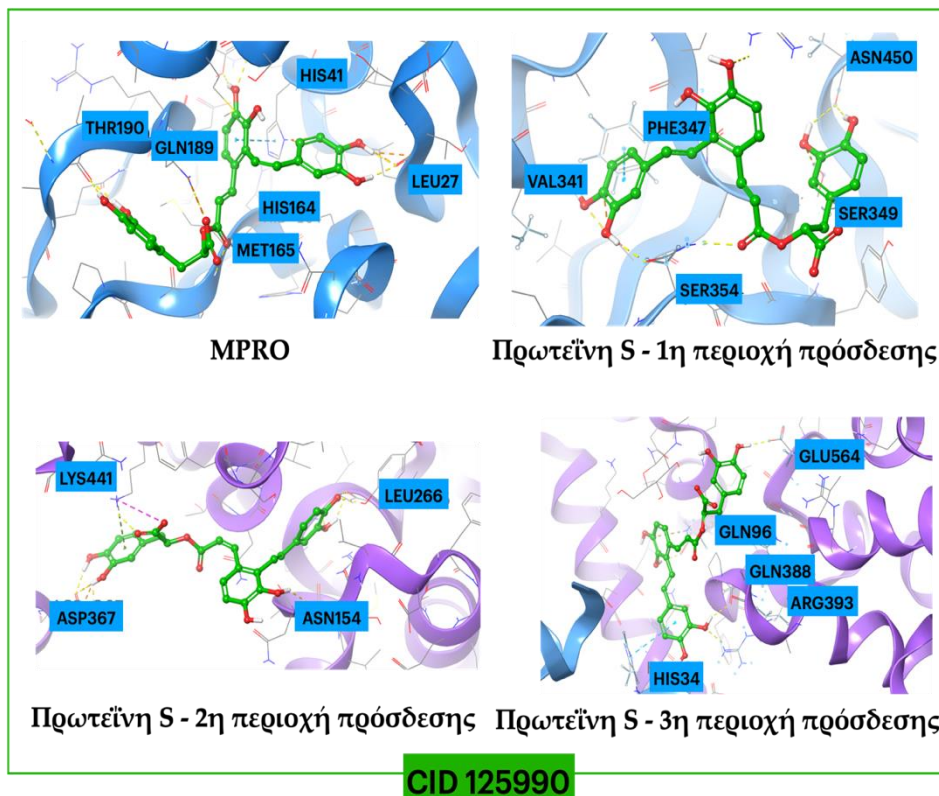
Τα προαναφερθέντα ευρήματα υπογραμμίζουν τη δυνατότητα τους να δράσουν ως αναστολείς πολλαπλών στόχων τόσο έναντι της Mpro όσο και της πρωτεΐνης S του ιού SARS-CoV-2. Αυτές οι ενώσεις όχι μόνο εμφάνισαν

ισχυρές συγγένειες δέσμευσης (όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 4), και σχημάτισαν αλληλεπιδράσεις με κρίσιμα αμινοξέα σε κάθε περιοχή πρόσδεσης, αλλά διαθέτουν και την αξιοσημείωτη ικανότητα να στοχεύουν και να αναστέλλουν ταυτόχρονα δύο βασικές πρωτεΐνες απαραίτητες για τις διαδικασίες αναπαραγωγής και εισόδου του ιού στα κύτταρα ξενιστές. Η διπλή ανασταλτική τους δράση τους τοποθετεί ως πολλά υποσχόμενους υποψηφίους για την θεραπεία της COVID-19.

**Πίνακας 4. Οι υπολογισμένες συγγένειες δέσμευσης (σε kcal mol<sup>-1</sup>) μέσω πειραμάτων IFD των επιλεγμένων ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν από αναζήτηση ομοιότητας στις περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης Mpro και S.**

Προσδέτης CID	Mpro	Πρωτεΐνη S 1η περιοχή πρόσδεσης	Πρωτεΐνη S 2η περιοχή πρόσδεσης	Πρωτεΐνη S 3η περιοχή πρόσδεσης
131676018	- 16.5	-13.7	- 8.2	- 8.9
74336856	- 13.7	- 10.5	- 9.6	- 10.9
162960914	- 15.4	- 10.6	- 9.0	- 9.7
125990	- 15.1	- 12.8	- 9.0	- 10.7





**Εικόνα 33.** Οπτικοποίηση των τριδιάστατων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων εντός των συμπλεγμάτων πρωτεΐνης Mpro/S - 131676018 και πρωτεΐνης Mpro/S -125990, που προέκυψαν από τα πειράματα IFD για κάθε περιοχή πρόσδεσης. Οι δεσμοί υδρογόνου αντιπροσωπεύονται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές, ενώ οι αλληλεπιδράσεις π - κατιόντων απεικονίζονται με πράσινο χρώμα.

## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

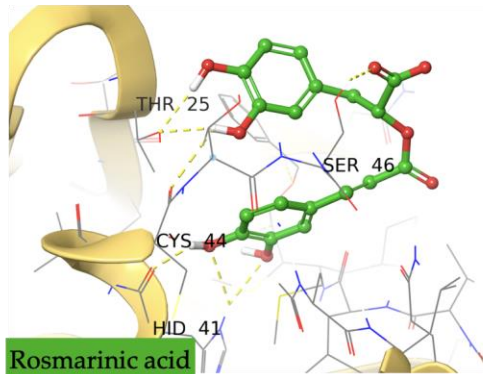
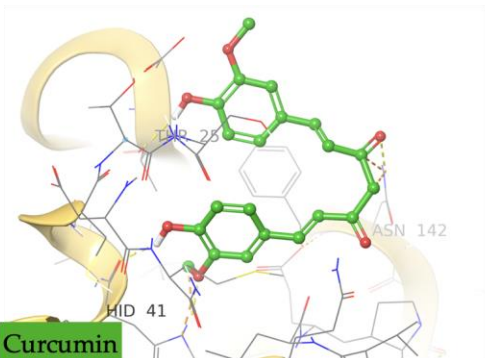
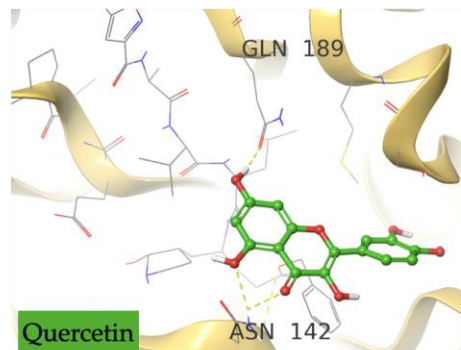
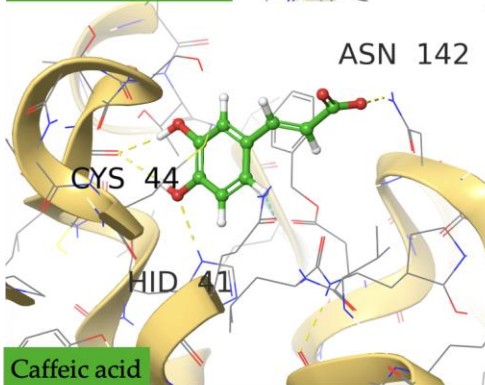
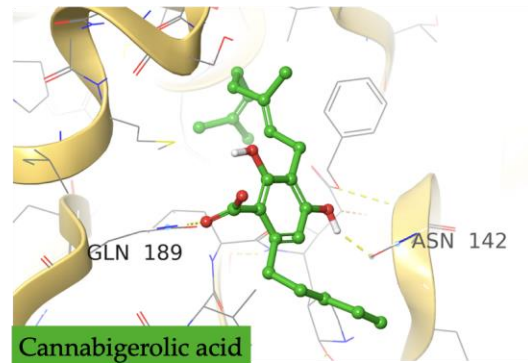
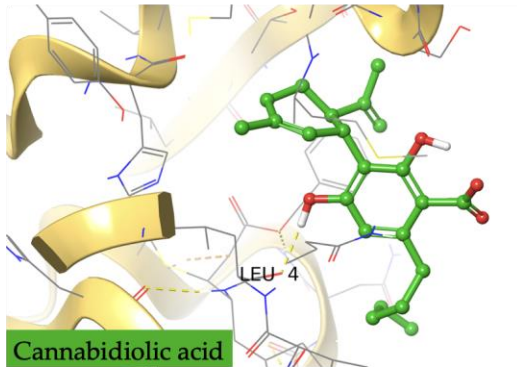
- ✓ Ο Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων και ευρύτερα οι *in silico* υπολογιστικές μέθοδοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμακευτικών ενώσεων καθώς μειώνουν σημαντικά τον χρόνο και το κόστος.
- ✓ Ο συνδυασμός υπολογιστικών μεθόδων, όπως της Μοριακής Πρόσδεσης και της Μοριακής Δυναμικής προσφέρει πολύτιμα πλεονεκτήματα στην ανακάλυψη φαρμάκων. Η Μοριακή Πρόσδεση χρησιμεύει ως αποτελεσματικό εργαλείο αρχικής επιλογής, εντοπίζοντας γρήγορα πιθανούς υποκαταστάτες και προβλέποντας τους τρόπους δέσμευσής τους καθώς και τις συγγένειες δέσμευσης. Στη συνέχεια, οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής παρέχουν μια ποιο ενδελεχή μελέτη των συμπλεγμάτων όσον αφορά τη σταθερότητά τους σε συνάρτηση με τον χρόνο αποκαλύπτοντας αλλαγές της διαμόρφωσης και των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη. Ο εν λόγω συνδυασμός αποτελεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση καθώς επιταχύνει τον σχεδιασμό φαρμάκων, ενισχύει την ανακάλυψη αποτελεσματικών καινοτόμων φαρμάκων, αλλά και ξεδιαλύνει περίπλοκους μοριακούς μηχανισμούς.
- ✓ Μέσω των πειραμάτων Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης φυσικών προϊόντων και αντιυπερτασικών κατά των πρωτεϊνών Mpro και της πρωτεΐνης S του ιού SARS-CoV-2 επετεύχθη μια πρώτη επιλογή, καθώς εντοπίστηκαν οι ενώσεις που εμφάνισαν την ισχυρότερη πρόσδεση.
  - Τα φυσικά προϊόντα: ροσμαρινικό οξύ, κερκετίνη και κουρκουμίνη ξεχώρισαν για την ευνοϊκότερη πρόσδεσή τους με τη Mpro, σύμφωνα με την ενέργεια πρόσδεσής τους, αλλά και με τις σχηματιζόμενες αλληλεπιδράσεις τους με κρίσιμα αμινοξέα όπως Thr25, His41, Ser46, His164, Gln189.
  - Τα φυσικά προϊόντα: σαλβιανολικό οξύ β, ροσμαρινικό οξύ και κερκετίνη εμφάνισαν την ισχυρότερη πρόσδεση με την πρωτεΐνη S ενωμένη με το ACE2 και στις τρεις διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης που μελετήθηκαν.

- ✓ Τα συμπλέγματα που εμφάνισαν την ευνοϊκότερη πρόσδεση σε κάθε περίπτωση μελετήθηκαν περαιτέρω μέσω προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής ώστε να επιτευχθεί μια εις βάθος μελέτη της σταθερότητάς.
  - Όσον αφορά τη Mpro, το ροσμαρινικό οξύ και η κερκετίνη εμφάνισαν σταθερότητα στην περιοχή πρόσδεσης. Ωστόσο, οι αλληλεπιδράσεις που κυριάρχησαν διαφοροποιήθηκαν από αυτές της Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης. Παρ' όλ' αυτά οι υπολογισμοί MM-GBSA επιβεβαίωσαν την ισχυρή πρόσδεσή τους.
  - Οι προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής για την πρωτεΐνη S με το ACE2 κατέληξαν στην επιλογή του ροσμαρινικού οξέος και του σαλβιανολικού οξέος β ως ισχυρών αναστολέων και για τις τρεις διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης (πρωτεΐνη S, ACE2, και στο σημείο ένωσής τους). Και εδώ παρατηρήθηκαν αν κυριαρχούν διαφορετικές αλληλεπιδράσεις σε σύγκριση με αυτών που παρατηρήθηκαν στα πειράματα Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης. Οι υπολογισμοί MM-GBSA συμφωνούν με τα αποτελέσματα της Μοριακής Δυναμικής, δηλαδή ότι πρόκειται για σταθερά συμπλέγματα.
- ✓ Η αναζήτηση ενώσεων που εμφανίζουν δομική ομοιότητα με τα φυσικά προϊόντα: κερκετίνη, ροσμαρινικό οξύ και σαλβιανολικό οξύ μέσω του Enalos Suite της εταιρείας NovaMechanics Ltd, παρήγαγε 115 ενώσεις. Οι ενώσεις μελετήθηκαν με πειράματα Επαγόμενης Μοριακής Πρόσδεσης στις ίδιες πρωτεΐνες και ίδιες περιοχές πρόσδεσης.
- ✓ Δυο ανάλογα του σαλβιανολικού οξέος εμφανίζονται ως εξαιρετικά υποσχόμενοι αναστολείς διπλής ανασταλτικής δράσης, καθώς ταυτόχρονα εμφανίζουν ισχυρή πρόσδεση κατά της Mpro και της πρωτεΐνης S ενωμένης με το ACE2.
- ✓ Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό βήμα προς την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών κατά της COVID-19. Αν και τα υπολογιστικά ευρήματα είναι πράγματι πολλά υποσχόμενα, είναι σημαντικό να τονίσουμε την ανάγκη περαιτέρω επικύρωσης μέσω *in vitro* και *in vivo* μελετών.

- ✓ Τέλος, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μας θυμίζουν τη συμβουλή του Ιπποκράτη, «Αφήστε την τροφή σας να είναι το φάρμακό σας και το φάρμακό σας να είναι η τροφή σας», μέσω της οποίας υπογραμμίζεται η σχέση μεταξύ διατροφής και υγείας. Τα φυσικά προϊόντα, όπως το σαλβιανολικό οξύ β, το ροσμαρινικό οξύ και η κερκετίνη πρέπει να αποτελούν μέρος της διατροφής μας ή να λαμβάνονται ως συμπληρώματα, καθώς από τα προκαταρκτικά *in silico* αποτελέσματα προσφέρουν δυνάμει πολλαπλά οφέλη για την υγεία.

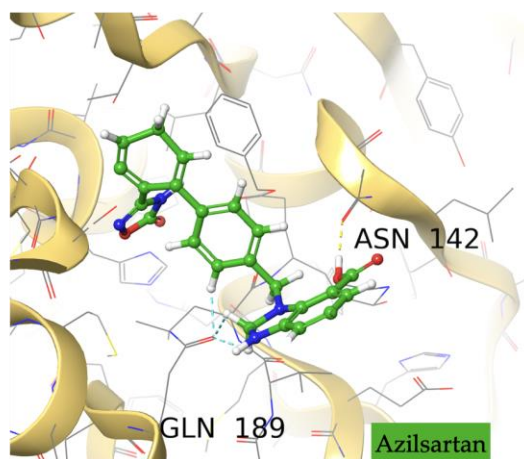
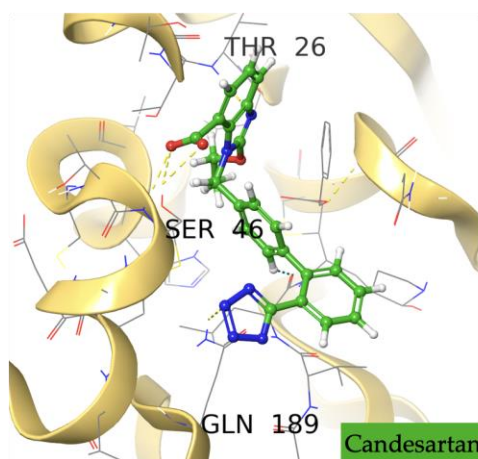
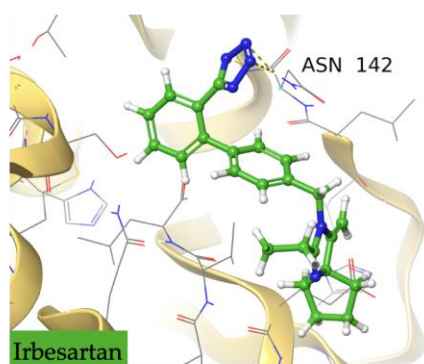
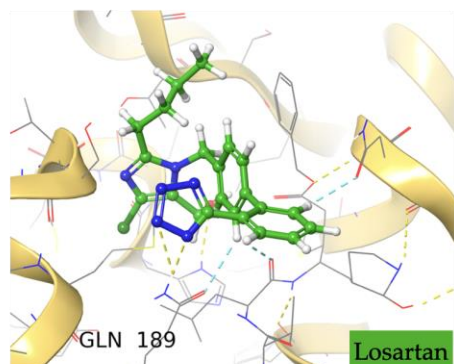
## Παράρτημα Ι

### IFD Μpro - φυσικά προϊόντα





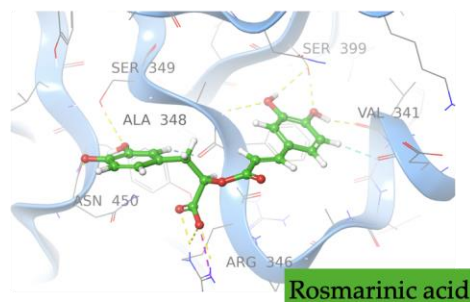
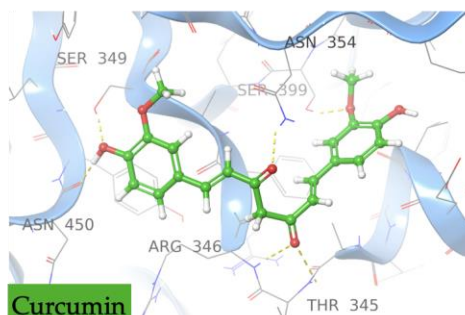
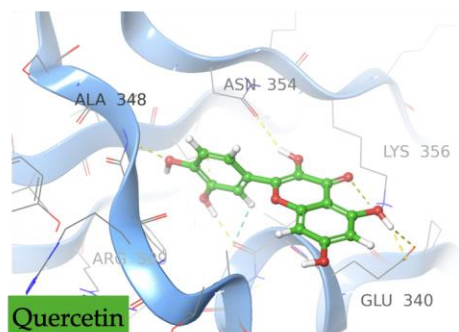
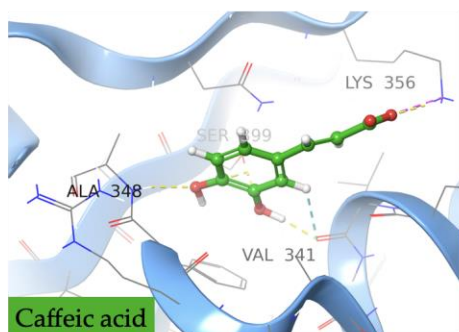
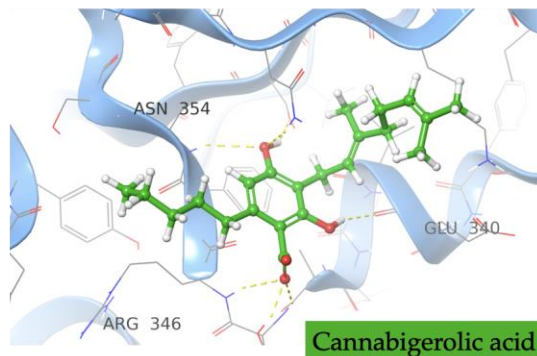
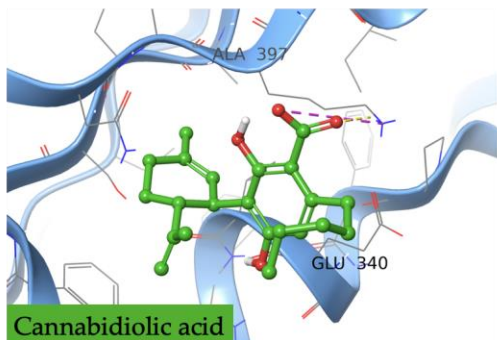
## IFD Μpro - σαρτάνες

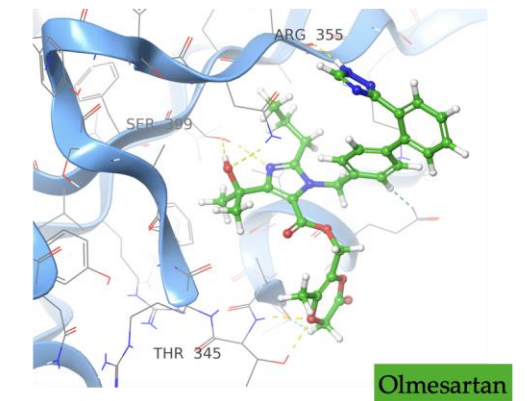
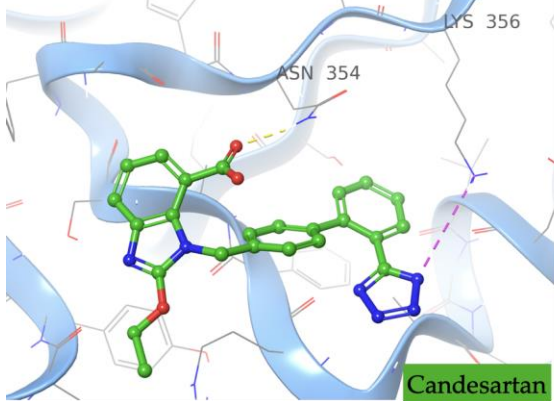
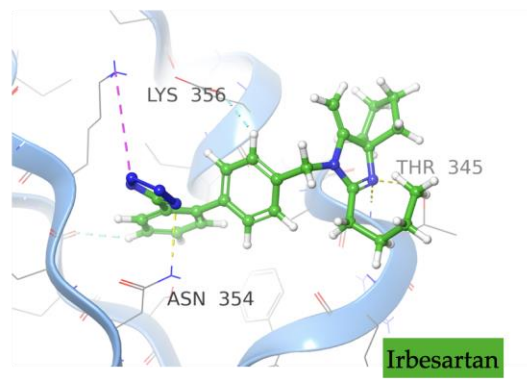
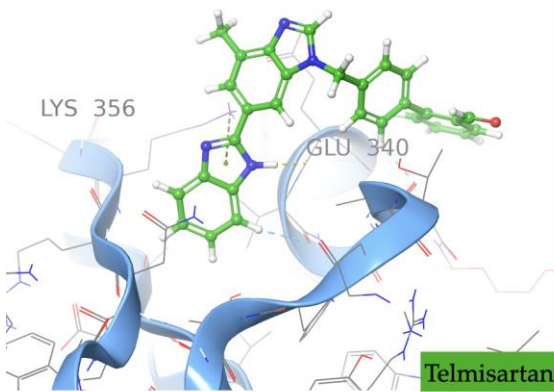
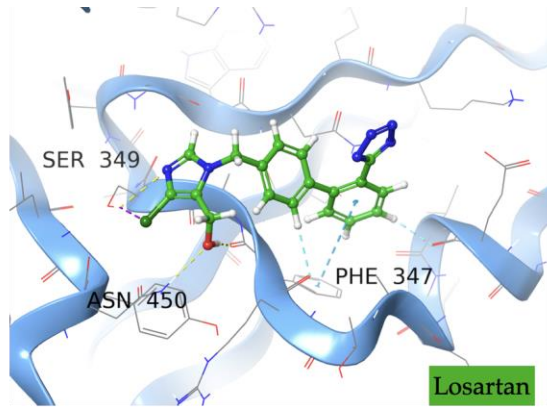
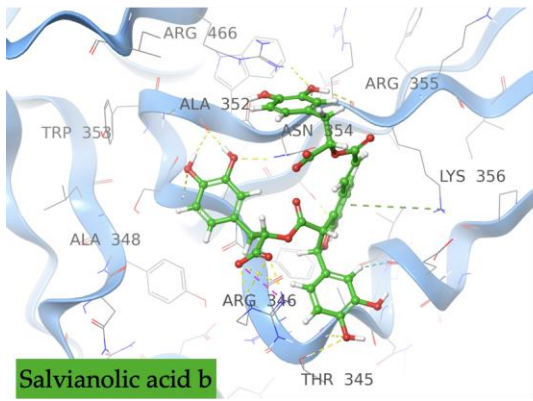


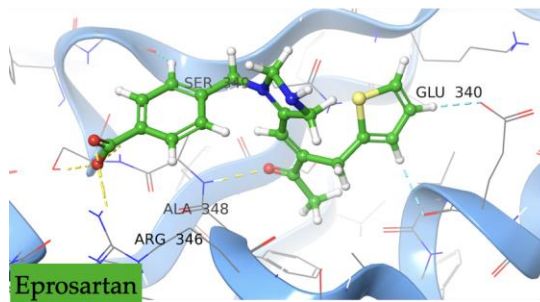
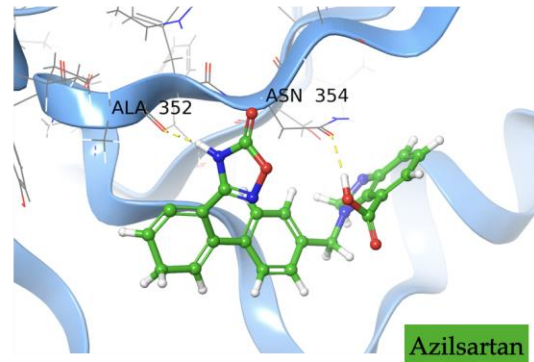
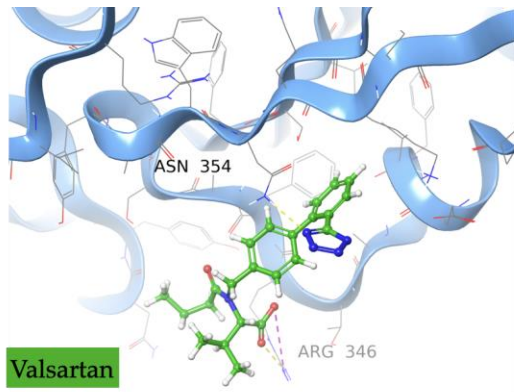
Εικόνα Π1.1. Οι προσδεμένες διαμορφώσεις συμπλεγμάτων «Μpro-φυσικών προϊόντων» και «Μpro-αντιυπερτασικών», οι οποίες προέκυψαν από τα πειράματα IFD. Η Μpro αναπαρίσται με τη μορφή κίτρινης κορδέλας (ribbon). Οι δεσμοί υδρογόνου αντιπροσωπεύονται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές και οι αρωματικοί δεσμοί υδρογόνου με γαλάζιες.



# IFD πρωτεΐνη S - 1η περιοχή πρόσδεσης

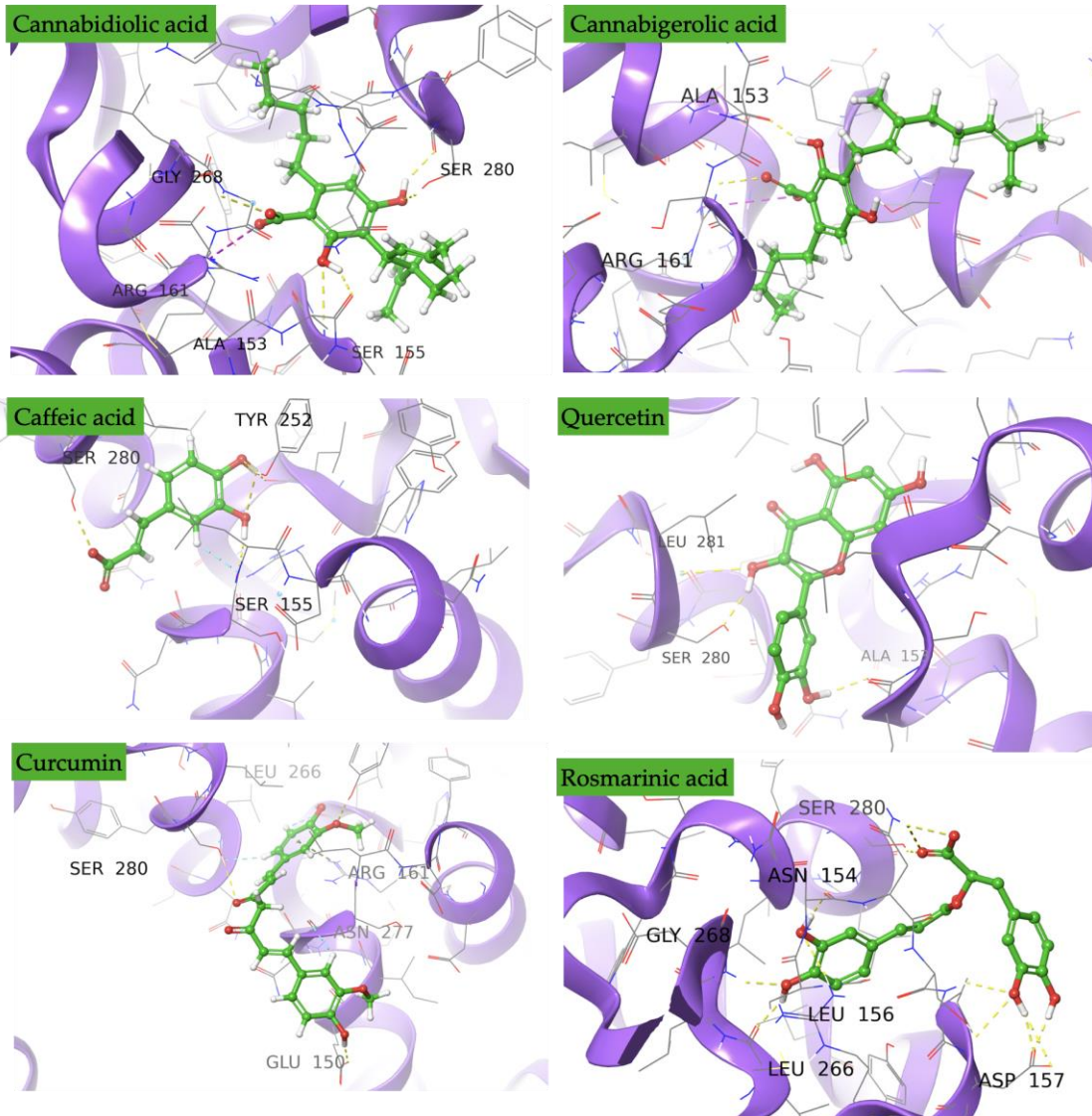




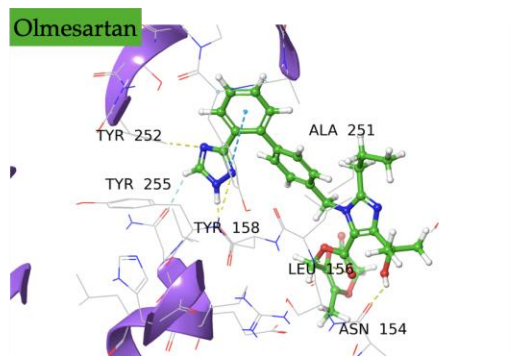
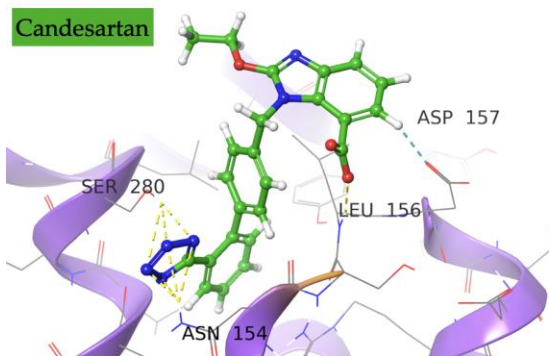
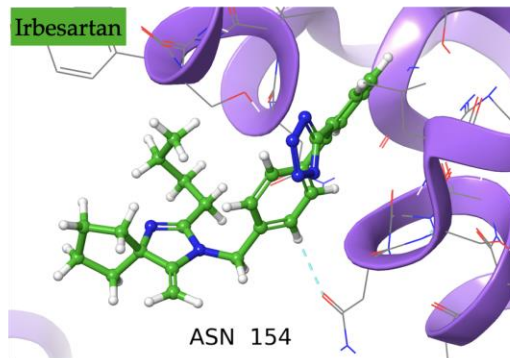
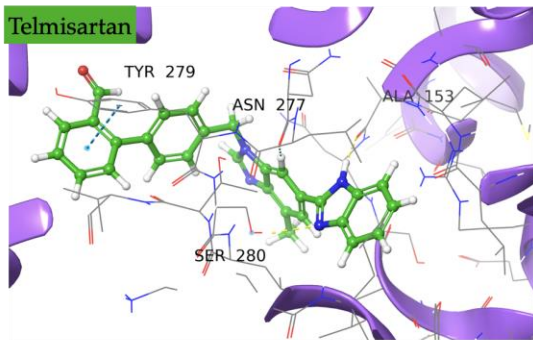
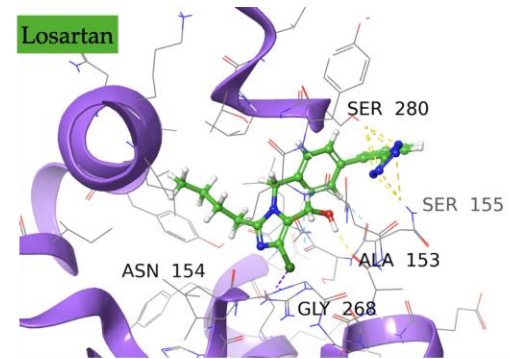
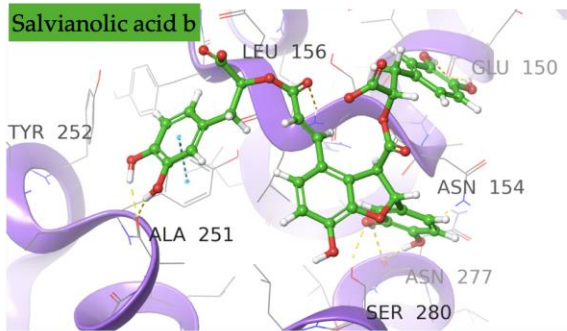


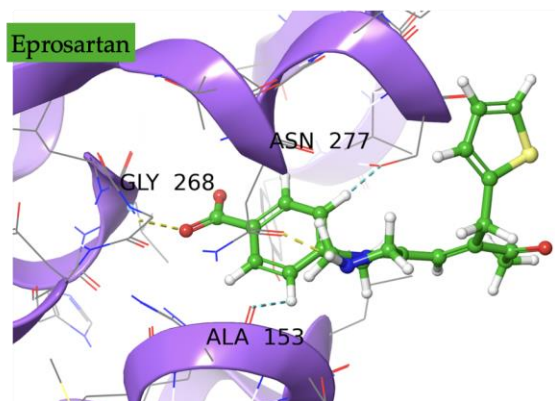
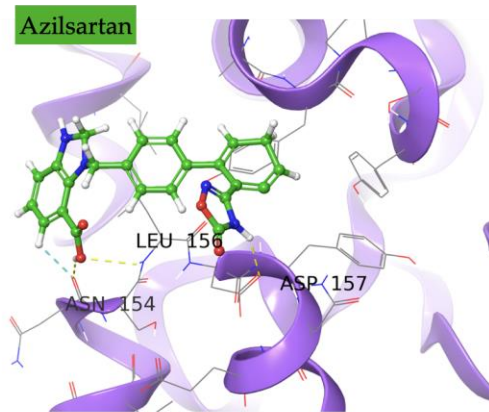
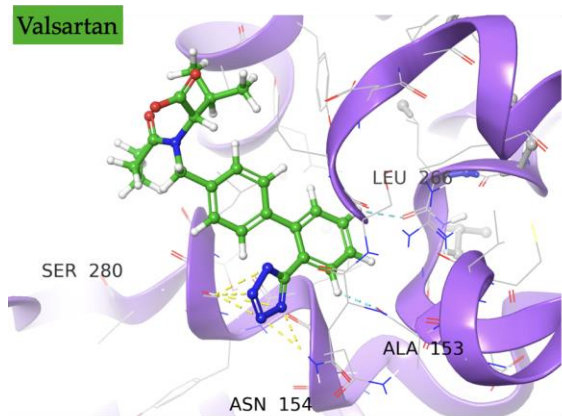
Εικόνα Π1.2. Οι προσδεμένες διαμορφώσεις των συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης S - φυσικών προϊόντων» και «S πρωτεΐνης-αντιυπερτασικών συμπλεγμάτων» για την πρώτη περιοχή πρόσδεσης που παρήχθησαν από τα πειράματα IFD. Με τη μορφή γαλάζιας κορδέλας αναπαρίσταται η πρωτεΐνη S (αλυσίδα E) όπου εντοπίζεται η πρώτη περιοχή πρόσδεσης. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές, οι αρωματικοί δεσμοί υδρογόνου με γαλάζιες, ενώ οι αλληλεπιδράσεις π-κατιόντων απεικονίζονται με πράσινο και γέφυρες άλατος με ματζέντα.

# IFD πρωτεΐνη S - 2η περιοχή πρόσδεσης



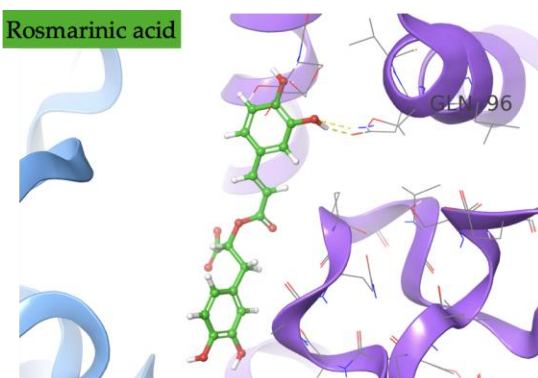
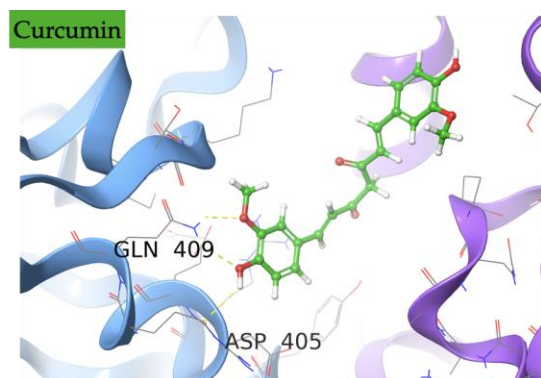
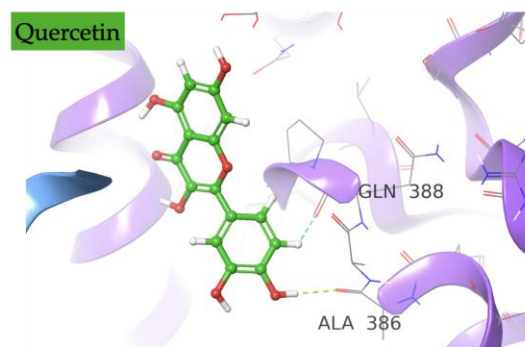
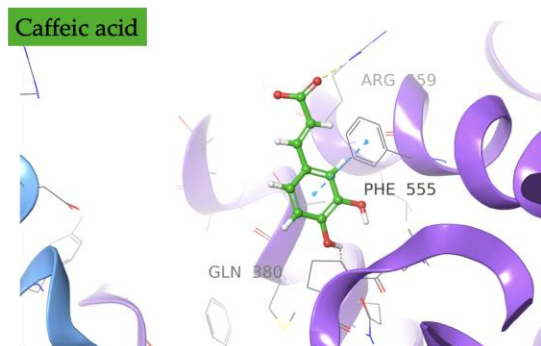
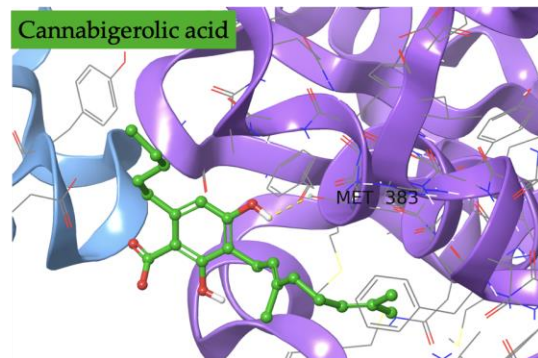
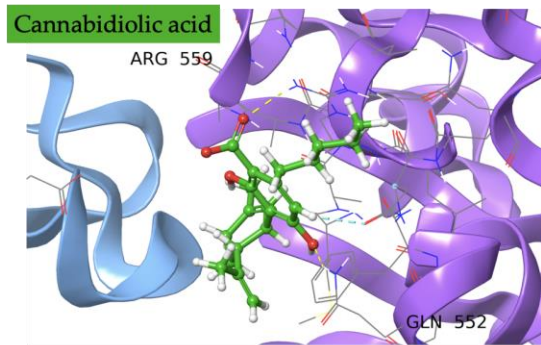




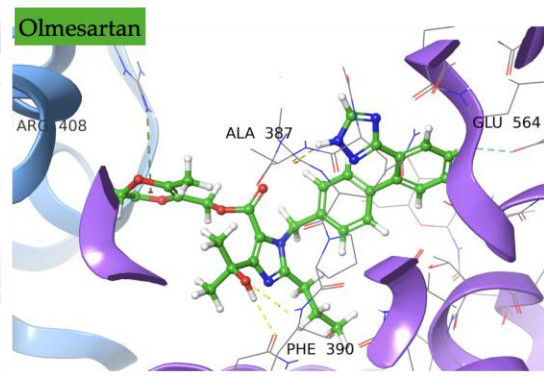
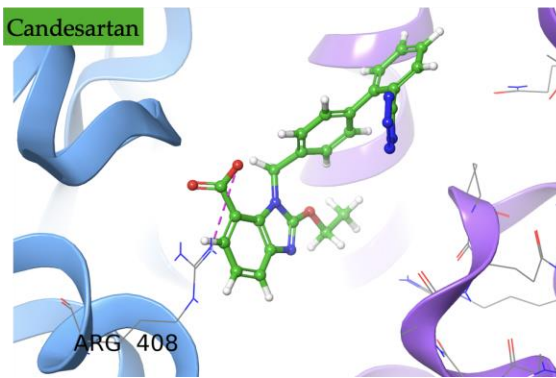
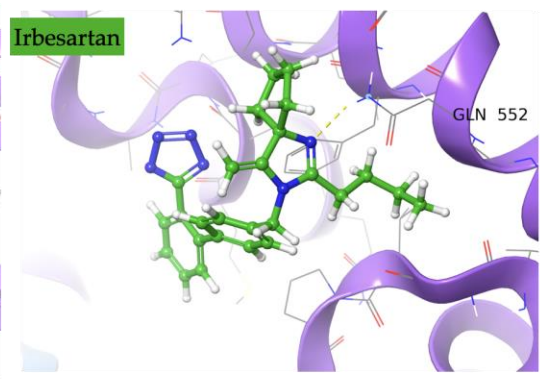
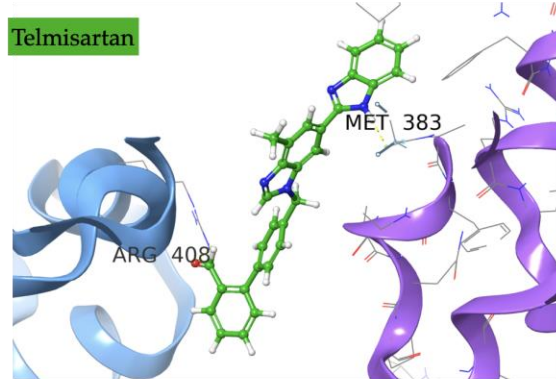
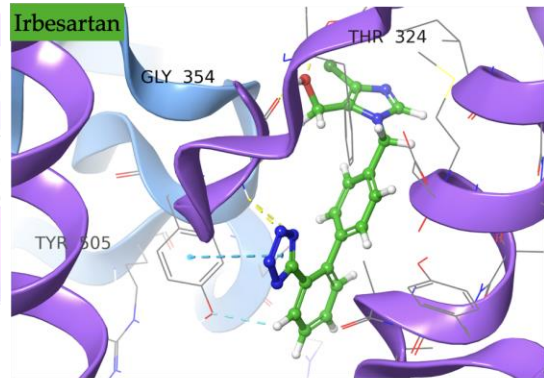
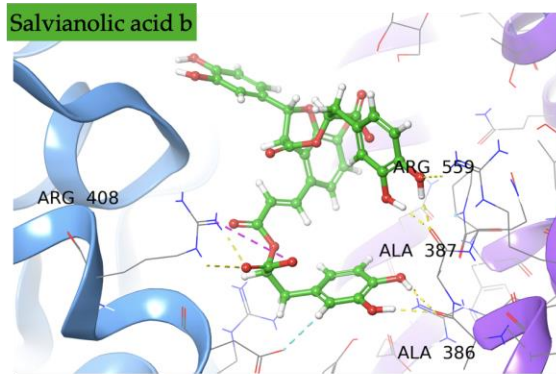


**Εικόνα Π1.3.** Οι προσδεμένες διαμορφώσεις των συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης S - φυσικών προϊόντων» και «S πρωτεΐνης-αντιυπερτασικών συμπλεγμάτων» για τη δεύτερη περιοχή πρόσδεσης που παρήχθησαν από τα πειράματα IFD. Με τη μορφή μωβ κορδέλας αναπαρίσταται το ACE2 (αλυσίδα A) όπου εντοπίζεται η δεύτερη περιοχή πρόσδεσης. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές, οι αρωματικοί δεσμοί υδρογόνου με γαλάζιες, ενώ οι αλληλεπιδράσεις π-κατιόντων απεικονίζονται με πράσινο και γέφυρες άλατος με ματζέντα.

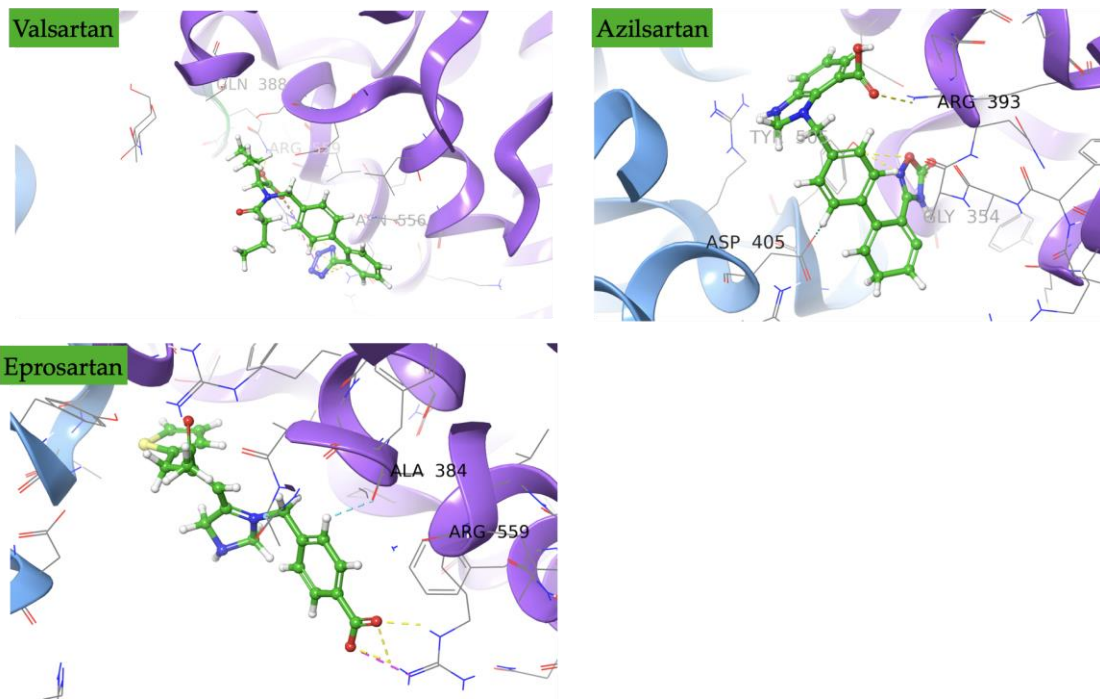
# IFD πρωτεΐνη S - 3η περιοχή πρόσδεσης







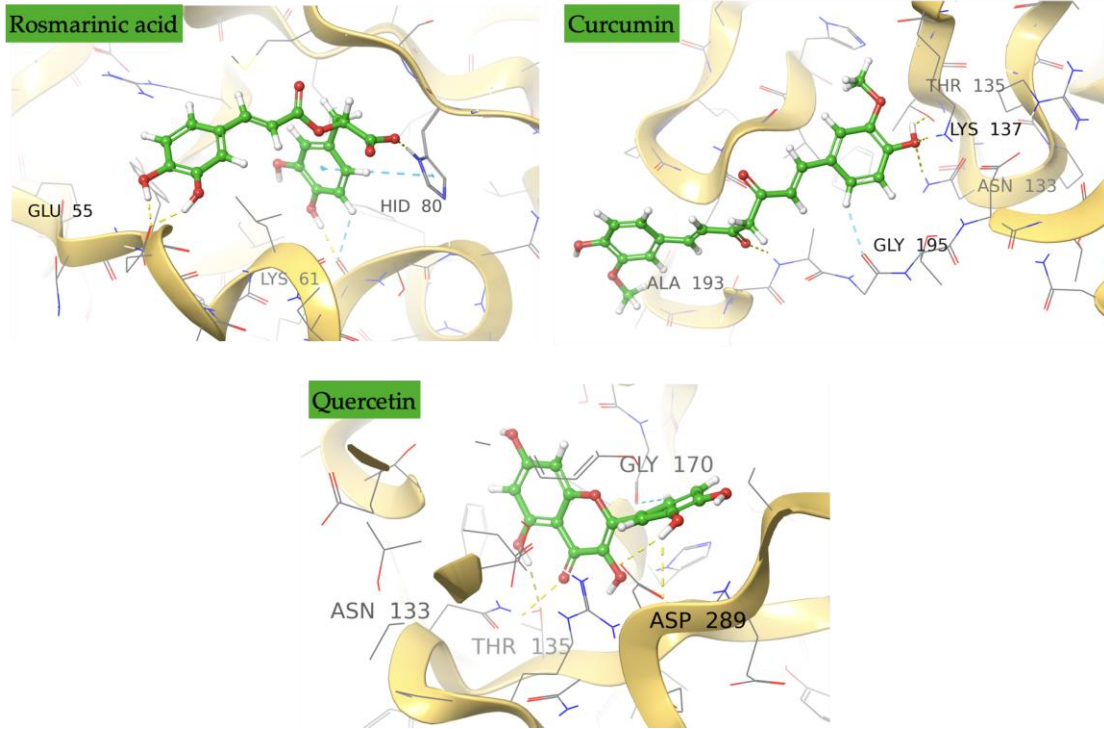




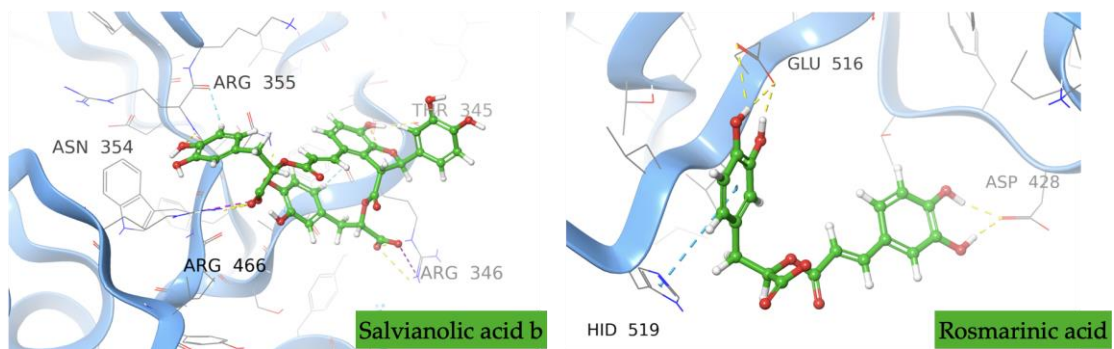
**Εικόνα Π1.4.** Οι προσδεμένες διαμορφώσεις των συμπλεγμάτων «πρωτεΐνης S - φυσικών προϊόντων» και «S πρωτεΐνης-αντιυπερτασικών συμπλεγμάτων» για την τρίτη περιοχή πρόσδεσης που παρήχθησαν από τα πειράματα IFD. Με τη μορφή γαλάζιας κορδέλας αναπαρίσταται η πρωτεΐνη S (αλυσίδα E) και με μωβ το ACE2 (αλυσίδα A), όπου εντοπίζεται η πρώτη περιοχή πρόσδεσης. Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές, οι αρωματικοί δεσμοί υδρογόνου με γαλάζιες, ενώ οι αλληλεπιδράσεις π-κατιόντων απεικονίζονται με πράσινο και γέφυρες άλατος με ματζέντα.

## Παράρτημα II

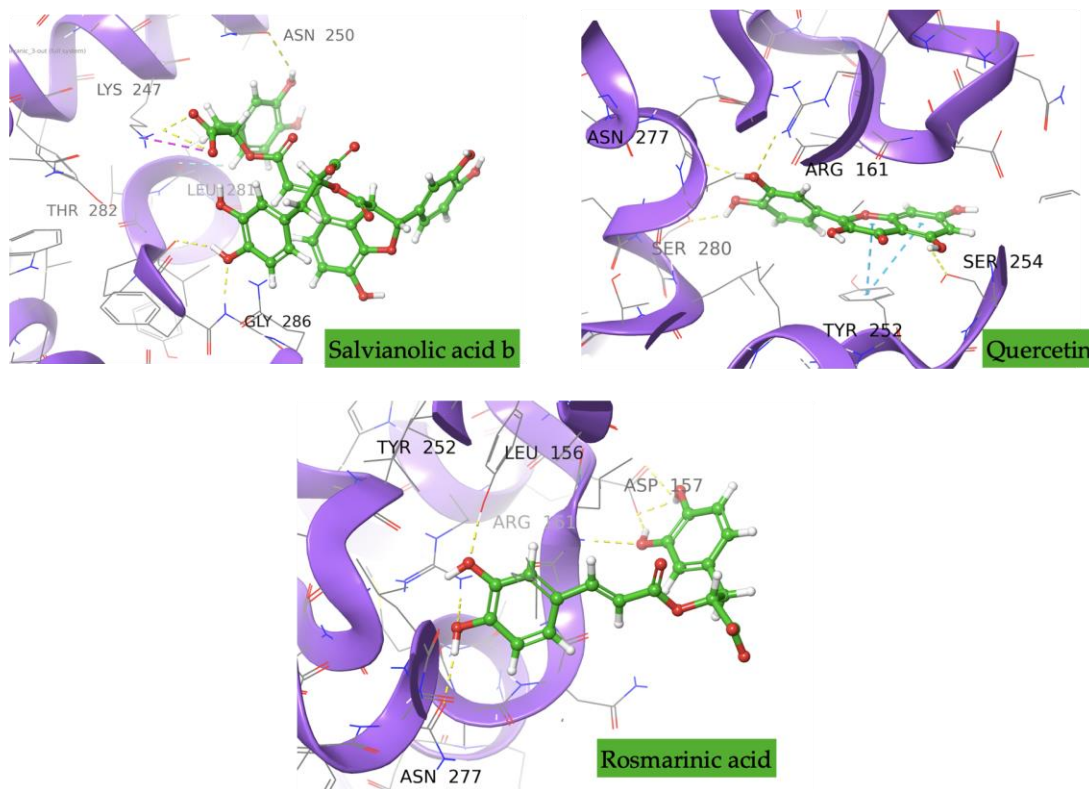
### Μπρο - φυσικά προϊόντα



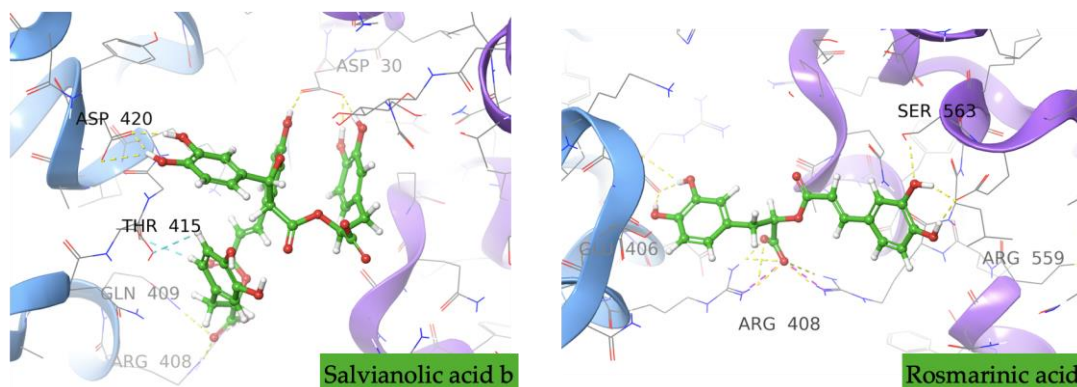
### Πρωτεΐνη S - 1η περιοχή πρόσδεσης



## Πρωτεΐνη S - 2η περιοχή πρόσδεσης



## Πρωτεΐνη S - 3η περιοχή πρόσδεσης



Εικόνα Π2.1. Η πιο αντιπροσωπευτική διαμόρφωση των συμπλεγμάτων «Μpro – φυσικών προϊόντων» και «πρωτεΐνης S – φυσικών προϊόντων» κατά τις προσομοιώσεις MD, οι οποίες προέκυψαν μέσω ομαδοποίησης (clustering). Οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται ως κίτρινες διακεκομμένες γραμμές, οι αρωματικοί δεσμοί υδρογόνου με ανοιχτό μπλε, ενώ οι αλληλεπιδράσεις π - κατιόντων απεικονίζονται με πράσινο χρώμα και οι γέφυρες άλατος επισημαίνονται με ματζέντα.

### Παράρτημα III

**Πίνακας Π1.** Τα αποτελέσματα του IFD για τις 116 ενώσεις που δημιουργήθηκαν μέσω της αναζήτησης ομοιότητας με βάση τη δομή για την περιοχή πρόσδεσης της Mpro (PDB ID: 6LU7) και για τις τρεις διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης της πρωτεΐνης S (PDB ID: 6M0J). Οι συγγένειες δέσμευσης εκφράζονται σε μονάδες kcal mol<sup>-1</sup>.

Ένωση (CID)	Mpro	Πρωτεΐνη S	ACE2	Νέα περιοχή πρόσδεσης
2889	-10.4	-6.9	-5.7	-5.7
5099	-13.3	-11.5	-	-7.4
65035	-12.0	-9.5	-7.7	-6.6
125990	-15.1	-12.8	-9.0	-10.8
146723	-11.3	-7.1	-6.7	5.4
390474	-11.3	-8.1	-10.0	-6.8
439589	-13.3	-14.7	-8.1	-7.4
502233	-15.4	-12.4	-9.0	-9.8
639655	-13.3	-11.5	-4.8	-5.9
3012090	-12.3	12.4	-8.0	-7.2
5280343	-12.0	-10.9	-7.7	-5.6
5281614	-11.0	-10.1	-9.5	-4.6
5281692	-11.2	-10.3	-9.3	-6.3
5281792	-11.8	-13.2	-7.7	-6.6
5281793	-14.0	-14.4	-7.7	-10.7
5315614	-13.2	-13.4	-8.2	-5.6
5315615	-13.3	-14.7	-4.8	-5.9
5319772	-11.5	-13.6	-4.8	-7.4
5469426	-11.3	-7.7	-6.3	-5.4
6124301	-13.5	-10.6	-8.2	-7.5
6479915	-12.3	-8.9	-8.0	-5.7
6604740	-12.8	-7.9	-8.1	7.4
9841799	-12.0	-9.7	-6.4	-6.3
9913656	-13.9	-9.7	-9.0	-8.0
10237698	-13.8	-8.9	-8.7	-8.1
10905440	-12.5	-9.1	-6.7	-7.1
10958864	-10.3	-8.5	-5.9	-6.7
10970786	-11.5	-9.6	-6.1	-7.4
11495229	-8.7	-2.1	-	-4.3
11640287	-11.4	-10.0	-6.7	-6.1
11953776	-13.7	-7.7	-8.3	-6.8
11956645	-12.0	-9.6	-7.3	-7.0
11956930	-12.7	-10.1	-7.9	-7.0
12305312	-11.4	-6.3	-6.2	-3.8
12309893	-10.6	-7.9	-5.3	-4.6
16082534	-11.4	-10.0	-	-6.1
21600688	-11.0	-6.3	-7.2	-7.0
24862412	-14.6	-14.3	-8.3	-8.0
24862413	-14.0	-13.2	-7.0	-9.4
24884282	-10.6	-9.1	-6.1	-5.2

25027450	-15.1	-13.1	-9.0	-7.5
25201609	-9.6	-10.9	-6.7	-8.2
25244691	-9.6	-10.9	-6.7	-8.2
25245604	-12.4	-13.0	-8.7	-7.7
29927682	-15.4	-9.7	-8.2	-7.5
44437692	-12.9	-12.3	-8.5	-6.0
44437696	-13.0	-11.0	-8.9	-6.7
45934363	-12.8	-7.9	-	-7.4
46782412	-11.4	-7.9	-7.9	-5.8
46906036	-11.1	-6.1	-	-5.5
49849859	-11.2	-10.6	-8.6	-5.3
49849860	-11.7	-10.1	-8.1	-4.7
51352598	-13.7	-12.3	-7.9	-10.9
53251006	-9.6	-7.5	-6.6	6.8
54277438	-12.7	-10.1	-8.2	-7.3
54758660	-10.7	-7.6	-9.3	-5.1
57328179	-12.3	-8.9	-8.0	-5.6
59112128	-11.0	-5.5	-5.5	-6.4
59574960	-9.3	-6.2	-8.4	-5.7
69680617	-13.8	-8.9	-8.1	-8.1
71699430	-8.3	-9.3	-7.0	-6.1
71699506	-9.1	-7.9	-6.2	-7.0
71699507	-10.2	-8.4	-9.2	-6.3
73038698	-12.6	-10.0	-7.6	-6.1
73153047	-12.0	-9.6	-7.7	-6.9
74336856	-13.7	-10.5	-9.6	-10.9
74413535	-11.4	-8.5	-6.9	-6.7
74539584	-15.1	-7.0	-10.9	-10.0
76511959	-11.5	-9.6	-8.4	-7.4
88462991	-10.7	-6.9	-7.2	-6.1
91069955	-11.2	-6.1	-7.2	-5.9
91412498	-11.5	-6.1	-6.3	-4.4
101792073	-11.5	-6.3	-6.1	5.1
101792074	-12.0	-6.3	-7.8	-5.4
124355854	-14.4	-9.4	-6.2	-9.0
124487414	-14.2	-9.5	-7.1	-9.2
129630417	-11.2	-9.0	-6.0	-4.7
129648032	-11.9	-8.3	-7.3	-5.3
129713895	-10.4	-	-4.9	-6.5
131676018	-16.5	-13.7	-8.2	8.9
133561492	-13.2	-11.6	-11.0	-8.1
138535294	-9.4	-11.4	-5.3	-4.2
141240288	-9.3	-11.5	-6.4	-5.3
147170730	-10.6	-6.5	-4.9	-2.8
153409103	-7.9	-	-5.1	-4.5
153530089	-11.6	-7.3	-4.0	-7.6
154074200	-11.9	-6.5	-	-5.0
156767820	-10.8	-	-5.6	-5.5
156767821	-11.0	-	-	-
156767823	-10.4	-5.9	-7.6	-6.9
162641822	-11.0	-6.5	-7.2	-6.8
162859050	-11.6	-8.4	-8.6	-6.0
162859051	-12.9	-8.4	-8.6	-6.0
162859053	-12.7	-10.1	-6.5	-7.0
162905073	-12.6	-7.5	-4.4	-6.7

<b>162905074</b>	-13.7	-7.7	-4.4	-6.8
<b>163001353</b>	-11.5	-9.6	-8.4	-7.4
<b>163001354</b>	-11.1	-10.2	-	-7.2
<b>163342012</b>	-10.6	-7.1	-9.3	-6.2
<b>100985949n1</b>	-11.1	-6.1	-5.1	-5.5
<b>100985950n1</b>	-12.0	-6.5	-5.9	5.8
<b>130345966n1</b>	-12.2	-14.8	-7.0	-5.9
<b>130345966n2</b>	-4.1	-2.7	-4.4	-2.1
<b>130367129n1</b>	-11.5	-	-5.6	-5.5
<b>131676119n1</b>	-12.0	-12.8	-7.4	-5.5
<b>131676119n2</b>	-12.0	-2.5	-3.3	-3.2
<b>142750760n1</b>	-13.8	-12.9	-8.6	-10.0
<b>159600901n1</b>	-10.8	-7.8	-9.5	-5.8
<b>16212154n1</b>	-12.0	-	-5.0	-3.8
<b>163332190n1</b>	-11.0	-6.3	-7.2	-7.0
<b>5284452n1</b>	-12.0	-10.8	-6.6	-5.6
<b>67304407n1</b>	-11.3	-6.4	-6.2	-5.7
<b>67304407n2</b>	-3.2	-2.3	-2.9	-1.1
<b>71311620n1</b>	-13.8	-8.5	-7.8	-10.0
<b>162859052</b>	-12.7	-13.6	-7.9	-7.3

---

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

---

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
2D	Διδιάστατος
3D	Τριδιάστατος
<i>Influenza A</i>	Γρίπη Α
Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity	Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός, Απέκκριση, Τοξικότητα
add hydrogens	Προσθήκη υδρογόνων
C-Terminal Domain	C-τελική περιοχή
Cheminformatic	Χημειοπληροφορική
Cryogenic Electron Microscopy Crystallography	Κρυογονική Ηλεκτρονική Μικροσκοπία
Electrostatic interactions	Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις
Energy minimization	Ελαχιστοποίηση Ενέργειας
Envelope	Φάκελος
Extra Precision	Εξαιρετική Ακρίβεια
Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
Force fields	Πεδία Δυνάμεων
Fragment-Based Drug Design	Σχεδιασμός φαρμάκου που βασίζεται σε θραύσματα
Genetic Algorithms	Γενετικοί Αλγόριθμοι
Hemagglutinin	Αιμοσυγκολλητίνη
High - Performance Computing	Υπολογιστές υψηλής απόδοσης
<i>in silico</i>	Υπολογιστικά
Induced Fit Docking	Επαγόμενη. Μοριακή Πρόσδεση

---

---

Ligand	Προσδέτης
Ligand - Based Drug Design	Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τον προσδέτη
Ligand pose	Πόζα πρόσδεσης
ligand preparation (ligprep)	Προετοιμασία προσδετών
Lipid Membrane / Lipid Bilayer	Λιπιδική μεμβράνη / Λιπιδική Διπλοστιβάδα
Lockdown	Καραντίνα
Main Protease	Κύρια Πρωτεάση
Membrane	Μεμβράνη
Minimization algorithms	Αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης
Molecular Docking	Μοριακή Πρόσδεση
Molecular Dynamics	Μοριακή Δυναμική
Monoclonal antibodies	Μονοκλωνικά αντισώματα
N-Terminal Domain	N- Τελική περιοχή
Neuraminidase	Νευραμινιδάση
Neutralizing antibodies	Εξουδετερωτικά αντισώματα
Nucleocapsid	Νουκλεοκαψίδιο
Open access	Ανοιχτή προσβασιμότητα
Open Reading Frames	Ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης
Optimization of hydrogen bonding network	Βελτιστοποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου
Periodic Boundary Conditions	Περιοδικές οριακές συνθήκες
Prontosil	Προντοσίλη
Protease Domain	Περιοχή πρωτεάσης
Protein Preparation Wizard	Εφαρμογή Προετοιμασίας Πρωτεΐνης
Quantitative Structure - Activity Relationship	Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης

---



---

Quantum Mechanics/Molecular Mechanics	Κβαντομηχανική / Μοριακή Μηχανική
Rational Drug Design	Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων
Receptor Binding Domain	Περιοχή Δέσμευσης Υποδοχέα
Region core	Περιοχή πυρήνα.
Replica exchange	Ανταλλαγή αντιγράφων
Repurposing	Επαναχρησιμοποίηση
RNA replicase / RNA-dependent RNA polymerase	Πολυμεράση RNA
Rotamer groups	Περιστρεφόμενες ή Διαμορφωμερές ομάδες
Screening	Διαλογή
Semi-Empirical Quantum Mechanical Methods	Ημιεμπειρικές Κβαντομηχανικές Μέθοδοι
Spike Protein	Πρωτεΐνη Ακίδα
Structure - Based Drug Design	Σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή
Systematic search	Συστηματική Αναζήτηση
Transmembrane	Διαμεμβραϊκό
Transmembrane Protease Serine 2	Διαμεμβρανική πρωτεάση σερίνης 2
Virtual Screening	Εικονική διαλογή (σάρωση)
X-ray Crystallography	Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

---

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

### Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

---

2D	Two Dimensional
3D	Three Dimensional
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ADMET	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Ala	Alanine
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
CHRAMM	Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
CID	Chemical Identifier
COVID-19	Coronavirus disease
cryo-EM	Cryogenic Electron Microscopy Crystallography
FDA	Food and Drug Administration
GLIDE	Grid-based Ligand Docking with Energetics
Gln	Glutamic acid
Glu	Glutamine
Gly	Glycine
GROMACS	GRONingen MAchine for Chemical Simulations
GROMOS	Groningen Molecular Simulation
GUI	Graphical User Interface
His	Histidine
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPC	High - Performance Computing
IFD	Induced Fit Docking
Ile	Isoleucine
LAMMPS	Large-scale Atomic/Molecular Massively Parallel Simulator
Leu	Leucine
MC	Monte Carlo
MD	Molecular Dynamics

---

---

Met	Methionine
MM-GBSA	Molecular Mechanics Generalized Born Area
MMFF	Merck Molecular Force Field
Mpro	Main proteasee
NAMD	Not Another Molecular Dynamics
OPLS	Optimized Potentials for Liquid Simulations
PDB	Prottein Data Bank
Phe	Phenylalanine
Pro	Proline
QM/MM	Quantum Mechanics/Molecular Mechanics
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
REMD	Replica Exchange Molecular Dynamics
RMSD	Root Mean Square Deviation
RMSF	Root Mean Square Fluctuation
SBDD	Structure-Based Drug Design
Ser	Serine
Thr	Threonine
UFF	Universal Force Field
Val	Valine
XP	Extra Precision

---

## Αναφορές

1. Μόσχοβου Καλλιόπη Τριδιάστατες Ποσοτικές Σχέσεις Δομής – Δράσης (3D-QSAR) Αδαμαντανικών Αναλόγων ως Αναστολείς του Ιοντικού Διαύλου του Ιού της Γρίπης Τύπου Α, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2018.
2. Κούρτη Αφροδίτη Ανίχνευση και Τυποποίηση Ιών Γρίπης σε λοιμώξεις του Αναπνευστικού συστήματος, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016.
3. Γρηγόριος Ζωίδης Νέα αζωτούχα παράγωγα του αδαμαντανίου με φαρμακολογική δράση, Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2006.
4. Kempieńska, B.M.; Woźniak, A.K. The influenza epidemic of 1889-90 in selected European cities - A picture based on the reports of two Poznań daily newspapers from the second half of the nineteenth century. *Med. Sci. Monit.* 2013, 19, 1131–1141, doi:10.12659/MSM.889469.
5. Engla, N.E.W.; Journal, N.D. The Persistent Legacy of the 1918 Influenza Virus. *N. Engl. J. Med.* 2009.
6. Bresalier, M. Uses of a pandemic: Forging the identities of influenza and virus research in interwar Britain. *Soc. Hist. Med.* 2012, 25, 400–424, doi:10.1093/shm/hkr162.
7. Honigsbaum, M. Revisiting the 1957 and 1968 influenza pandemics. *Lancet* 2020, 395, 1824–1826, doi:10.1016/S0140-6736(20)31201-0.
8. Sharp, P.M.; Hahn, B.H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011, 1, doi:10.1101/cshperspect.a006841.
9. Hancock, K.; Veguilla, V.; Lu, X.; Zhong, W.; Butler, E.N.; Sun, H.; Liu, F.; Dong, L.; DeVos, J.R.; Gargiullo, P.M.; et al. Cross-Reactive Antibody Responses to the 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus. *N. Engl. J. Med.* 2009, 361, 1945–1952, doi:10.1056/nejmoa0906453.
10. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.M.; Wang, W.; Song, Z.G.; Hu, Y.; Tao, Z.W.; Tian, J.H.; Pei, Y.Y.; et al. A new coronavirus associated with

- human respiratory disease in China. *Nature* 2020, 579, 265–269, doi:10.1038/s41586-020-2008-3.
11. Jiang, S.; Du, L.; Shi, Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. *Emerg. Microbes Infect.* 2020, 9, 275–277, doi:10.1080/22221751.2020.1723441.
  12. Zhou, P.; Yang, X. Lou; Wang, X.G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.L.; et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020, 579, 270–273, doi:10.1038/s41586-020-2012-7.
  13. Wang, M.Y.; Zhao, R.; Gao, L.J.; Gao, X.F.; Wang, D.P.; Cao, J.M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020, 10, 1–17, doi:10.3389/fcimb.2020.587269.
  14. Lai, C.C.; Shih, T.P.; Ko, W.C.; Tang, H.J.; Hsueh, P.R. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2020, 55, 105924, doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105924.
  15. Zhu, Z.; Lian, X.; Su, X.; Wu, W.; Marraro, G.A.; Zeng, Y. From SARS and MERS to COVID-19: A brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. *Respir. Res.* 2020, 21, 1–14, doi:10.1186/s12931-020-01479-w.
  16. Santos, I.D.A.; Grosche, V.R.; Rodrigues, F.; Bergamini, G.; Sabino-silva, R.; Carolina, A.; Jardim, G. Antivirals Against Coronaviruses: Candidate Drugs for SARS-CoV-2 Treatment? 2020, 11, doi:10.3389/fmicb.2020.01818.
  17. Naqvi, A.A.T.; Fatima, K.; Mohammad, T.; Fatima, U.; Singh, I.K.; Singh, A.; Atif, S.M.; Hariprasad, G.; Hasan, G.M.; Hassan, M.I. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*

- 2020, 1866, 165878, doi:10.1016/j.bbadis.2020.165878.
18. Firouzi, R.; Ashouri, M.; Mohammad, |; Karimi-Jafari, H. Structural insights into the substrate-binding site of main protease for the structure-based COVID-19 drug discovery. 2022, doi:10.1002/prot.26318.
  19. Mignone, F.; Gissi, C.; Liuni, S.; Pesole, G. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 2002, 3, 1–10, doi:10.1186/gb-2002-3-3-reviews0004.
  20. Raj, R. Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. *Biochem. Biophys. Reports* 2021, 25, 100847, doi:10.1016/j.bbrep.2020.100847.
  21. Zhang, Q.; Xiang, R.; Huo, S.; Zhou, Y.; Jiang, S.; Wang, Q.; Yu, F. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021, 6, doi:10.1038/s41392-021-00653-w.
  22. Gordon, D.E.; Jang, G.M.; Bouhaddou, M.; Xu, J.; Obernier, K.; White, K.M.; O'Meara, M.J.; Rezelj, V. V.; Guo, J.Z.; Swaney, D.L.; et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* 2020, 583, 459–468, doi:10.1038/s41586-020-2286-9.
  23. Walls, A.C.; Park, Y.J.; Tortorici, M.A.; Wall, A.; McGuire, A.T.; Veesler, D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 2020, 181, 281-292.e6, doi:10.1016/j.cell.2020.02.058.
  24. Tortorici, M.A.; Veesler, D. Structural insights into coronavirus entry; 1st ed.; Elsevier Inc., 2019; Vol. 105; ISBN 9780128184561.
  25. Ali, A.; Vijayan, R. Dynamics of the ACE2–SARS-CoV-2/SARS-CoV spike protein interface reveal unique mechanisms. *Sci. Rep.* 2020, 10, 1–12, doi:10.1038/s41598-020-71188-3.
  26. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Pérez Marc, G.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl.*

- J. Med. 2020, 383, 2603–2615, doi:10.1056/nejmoa2034577.
27. Sahin, U.; Muik, A.; Derhovanessian, E.; Vogler, I.; Kranz, L.M.; Vormehr, M.; Baum, A.; Pascal, K.; Quandt, J.; Maurus, D.; et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature* 2020, 586, 594–599, doi:10.1038/s41586-020-2814-7.
  28. Wall, E.C.; Wu, M.; Harvey, R.; Kelly, G.; Warchal, S.; Sawyer, C.; Daniels, R.; Hobson, P.; Hatipoglu, E.; Ngai, Y.; et al. Neutralising antibody activity against SARS-CoV-2 VOCs B.1.617.2 and B.1.351 by BNT162b2 vaccination. *Lancet* 2021, 397, 2331–2333, doi:10.1016/S0140-6736(21)01290-3.
  29. Dewald Schoeman and Burtram C. Fielding Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2019, 16, doi:https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0.
  30. Mandala, V.S.; McKay, M.J.; Shcherbakov, A.A.; Dregni, A.J.; Kolocouris, A.; Hong, M. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020, 27, 1202–1208, doi:10.1038/s41594-020-00536-8.
  31. Liu, D.X.; Yuan, Q.; Liao, Y. Coronavirus envelope protein: A small membrane protein with multiple functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007, 64, 2043–2048, doi:10.1007/s00018-007-7103-1.
  32. Schoeman, D.; Fielding, B.C. Is There a Link Between the Pathogenic Human Coronavirus Envelope Protein and Immunopathology? A Review of the Literature. *Front. Microbiol.* 2020, 11, 1–11, doi:10.3389/fmicb.2020.02086.
  33. Therapeutics, T.; Foundation, B.M.; Sciences, B.; Angeles, L.; Therapeutics, T.; Group, M.L. *Transmission of SARS-CoV-2 through analysis of Viral Genomics and Structure*; 2021; ISBN 0000000236553.
  34. Zhang, Z.; Nomura, N.; Muramoto, Y.; Ekimoto, T.; Uemura, T.; Liu, K.; Yui, M.; Kono, N.; Aoki, J.; Ikeguchi, M.; et al. Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. *Nat. Commun.* 2022, 13, 1–7, doi:10.1038/s41467-022-32019-3.

35. Cubuk, J.; Alston, J.J.; Incicco, J.J.; Singh, S.; Stuchell-Brereton, M.D.; Ward, M.D.; Zimmerman, M.I.; Vithani, N.; Griffith, D.; Wagoner, J.A.; et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nat. Commun.* 2021, 12, 1–17, doi:10.1038/s41467-021-21953-3.
36. Mariano, G.; Farthing, R.J.; Lale-Farjat, S.L.M.; Bergeron, J.R.C. Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. *Front. Mol. Biosci.* 2020, 7, doi:10.3389/fmolb.2020.605236.
37. Sui, L.; Zhao, Y.; Wang, W.; Wu, P.; Wang, Z.; Yu, Y.; Hou, Z.; Tan, G.; Liu, Q. SARS-CoV-2 Membrane Protein Inhibits Type I Interferon Production Through Ubiquitin-Mediated Degradation of TBK1. *Front. Immunol.* 2021, 12, 1–10, doi:10.3389/fimmu.2021.662989.
38. Theken, K.N.; Tang, S.Y.; Sengupta, S.; FitzGerald, G.A. The roles of lipids in SARS-CoV-2 viral replication and the host immune response. *J. Lipid Res.* 2021, 62, 100129, doi:10.1016/J.JLR.2021.100129.
39. Mesquita, F.S.; Abrami, L.; Sergeeva, O.; Turelli, P.; Qing, E.; Kunz, B.; Raclot, C.; Paz Montoya, J.; Abriata, L.A.; Gallagher, T.; et al. S-acylation controls SARS-CoV-2 membrane lipid organization and enhances infectivity. *Dev. Cell* 2021, 56, 2790-2807.e8, doi:10.1016/j.devcel.2021.09.016.
40. Venkataraman, S.; Prasad, B.V.L.S.; Selvarajan, R. RNA dependent RNA polymerases: Insights from structure, function and evolution. *Viruses* 2018, 10, 1–23, doi:10.3390/v10020076.
41. Kirchdoerfer, R.N.; Ward, A.B. Structure of the SARS-CoV nsp12 polymerase bound to nsp7 and nsp8 co-factors. *Nat. Commun.* 2019, 10, 1–9, doi:10.1038/s41467-019-10280-3.
42. Grottesi, A.; Bešker, N.; Emerson, A.; Manelfi, C.; Beccari, A.R.; Frigerio, F.; Lindahl, E.; Cerchia, C.; Talarico, C. Computational studies of SARS-CoV-2 3clpro: Insights from md simulations. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1–18, doi:10.3390/ijms21155346.



43. Malone, B.; Urakova, N.; Snijder, E.J.; Campbell, E.A. Structures and functions of coronavirus replication–transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022, 23, 21–39, doi:10.1038/s41580-021-00432-z.
44. Owen, D.R.; Allerton, C.M.N.; Anderson, A.S.; Aschenbrenner, L.; Avery, M.; Berritt, S.; Boras, B.; Cardin, R.D.; Carlo, A.; Coffman, K.J.; et al. An oral SARS-CoV-2 M. 2021, 3, 1586–1593.
45. Qiao, J.; Li, Y.; Zeng, R.; Liu, F.; Luo, R.; Huang, C.; Wang, Y.; Zhang, J.; Quan, B.; Shen, C.; et al. SARS-CoV-2 Mpro inhibitors. 2021, 1378, 1374–1378.
46. Hu, Q.; Xiong, Y.; Zhu, G.H.; Zhang, Y.N.; Zhang, Y.W.; Huang, P.; Ge, G.B. The SARS-CoV-2 main protease (Mpro): Structure, function, and emerging therapies for COVID-19. *MedComm* 2022, 3, 1–27, doi:10.1002/mco2.151.
47. Jin, Z.; Du, X.; Xu, Y.; Deng, Y.; Liu, M.; Zhao, Y.; Zhang, B.; Li, X.; Zhang, L.; Peng, C.; et al. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* 2020, 582, 289–293, doi:10.1038/s41586-020-2223-y.
48. Viner, R.M.; Ward, J.L.; Hudson, L.D.; Ashe, M.; Patel, S.V.; Hargreaves, D.; Whittaker, E. Systematic review of reviews of symptoms and signs of COVID-19 in children and adolescents. *Arch. Dis. Child.* 2021, 106, 802–807, doi:10.1136/archdischild-2020-320972.
49. Article, O. Main symptoms in patients presenting in the COVID-19 period. 2020, doi:10.1177/0036933020949253.
50. Baj, J.; Karakuła-Juchnowicz, H.; Teresiński, G.; Buszewicz, G.; Ciesielka, M.; Sitarz, R.; Forma, A.; Karakuła, K.; Flieger, W.; Portincasa, P.; et al. COVID-19: Specific and non-specific clinical manifestations and symptoms: The current state of knowledge. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 1–22, doi:10.3390/jcm9061753.
51. Elliott, J.; Whitaker, M.; Bodinier, B.; Eales, O.; Riley, S.; Ward, H.; Cooke, G.; Darzi, A.; Chadeau-Hyam, M.; Elliott, P. Predictive symptoms

- for COVID-19 in the community: REACT-1 study of over 1 million people. *PLoS Med.* 2021, 18, 1–14, doi:10.1371/journal.pmed.1003777.
52. Coopersmith, C.M.; Antonelli, M.; Bauer, S.R.; Deutschman, C.S.; Evans, L.E.; Ferrer, R.; Hellman, J.; Jog, S.; Kesecioglu, J.; Kisson, N.; et al. The Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Coronavirus Disease 2019 in Critical Illness. *Crit. Care Med.* 2021, 49, 598–622, doi:10.1097/CCM.0000000000004895.
  53. Gandhi, R.T.; Lynch, J.B.; del Rio, C. Mild or Moderate Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020, 383, 1757–1766, doi:10.1056/nejmcp2009249.
  54. Baden, L.R.; El Sahly, H.M.; Essink, B.; Kotloff, K.; Frey, S.; Novak, R.; Diemert, D.; Spector, S.A.; Rouphael, N.; Creech, C.B.; et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021, 384, 403–416, doi:10.1056/nejmoa2035389.
  55. Sadoff, J.; Gray, G.; Vandebosch, A.; Cárdenas, V.; Shukarev, G.; Grinsztejn, B.; Goepfert, P.A.; Truyers, C.; Fennema, H.; Spiessens, B.; et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021, 384, 2187–2201, doi:10.1056/nejmoa2101544.
  56. Voysey, M.; Clemens, S.A.C.; Madhi, S.A.; Weckx, L.Y.; Folegatti, P.M.; Aley, P.K.; Angus, B.; Baillie, V.L.; Barnabas, S.L.; Bhorat, Q.E.; et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet* 2021, 397, 99–111, doi:10.1016/S0140-6736(20)32661-1.
  57. Shinde, V.; Bhikha, S.; Hoosain, Z.; Archary, M.; Bhorat, Q.; Fairlie, L.; Laloo, U.; Masilela, M.S.L.; Moodley, D.; Hanley, S.; et al. Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *N. Engl. J. Med.* 2021, 384, 1899–1909, doi:10.1056/nejmoa2103055.
  58. Dunkle, L.M.; Kotloff, K.L.; Gay, C.L.; Áñez, G.; Adelglass, J.M.; Barrat Hernández, A.Q.; Harper, W.L.; Duncanson, D.M.; McArthur, M.A.; Florescu, D.F.; et al. Efficacy and Safety of NVX-CoV2373 in Adults in the United States and Mexico. *N. Engl. J. Med.* 2022, 386, 531–543,

- doi:10.1056/nejmoa2116185.
59. Goldberg, Y.; Mandel, M.; Bar-On, Y.M.; Bodenheimer, O.; Freedman, L.; Haas, E.J.; Milo, R.; Alroy-Preis, S.; Ash, N.; Huppert, A. Waning Immunity after the BNT162b2 Vaccine in Israel. *N. Engl. J. Med.* 2021, 385, e85, doi:10.1056/nejmoa2114228.
  60. Saiag, E.; Goldshmidt, H.; Sprecher, E.; Ben-Ami, R.; Bomze, D. Immunogenicity of a BNT162b2 vaccine booster in health-care workers. *The Lancet Microbe* 2021, 2, e650, doi:10.1016/S2666-5247(21)00272-X.
  61. Munro, A.P.S.; Janani, L.; Cornelius, V.; Aley, P.K.; Babbage, G.; Baxter, D.; Bula, M.; Cathie, K.; Chatterjee, K.; Dodd, K.; et al. Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCov-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet* 2021, 398, 2258–2276, doi:10.1016/S0140-6736(21)02717-3.
  62. Letko, M.; Marzi, A.; Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 2020, 5, 562–569, doi:10.1038/s41564-020-0688-y.
  63. Maier, H.J.; Bickerton, E.; Britton, P. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Coronaviruses Methods Protoc.* 2015, 1282, 1–282, doi:10.1007/978-1-4939-2438-7.
  64. Xu, X.; Ping, C.; Jingfang, W.; Jiannan, F.; Hui, Z.; Xuan, L.; Wu, Z.; Pei, H. Evolution Of The Novel Coronavirus From The Ongoing Wuhan Outbreak And Modeling Of Its Spike Protein For Risk Of Human Transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020, 63, 457–460.
  65. Razali, R.; Asis, H.; Budiman, C. Structure-function characteristics of sars-cov-2 proteases and their potential inhibitors from microbial sources. *Microorganisms* 2021, 9, doi:10.3390/microorganisms9122481.
  66. Zhang, L.; Lin, D.; Sun, X.; Curth, U.; Drosten, C.; Sauerhering, L.; Becker, S.; Rox, K.; Hilgenfeld, R. Crystal structure of SARS-CoV-2 main

- protease provides a basis for design of improved  $\alpha$ -ketoamide inhibitors. *Science* (80-. ). 2020, 368, 409–412, doi:10.1126/science.abb3405.
67. Ullrich, S.; Nitsche, C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2020, 30.
  68. Mengist, H.M.; Dilnessa, T.; Jin, T. Structural Basis of Potential Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Main Protease. *Front. Chem.* 2021, 9, 1–19, doi:10.3389/fchem.2021.622898.
  69. Roe, M.K.; Junod, N.A.; Young, A.R.; Beachboard, D.C.; Stobart, C.C. Targeting novel structural and functional features of coronavirus protease nsp5 (3CLpro, Mpro) in the age of COVID-19. *J. Gen. Virol.* 2021, 102, doi:10.1099/JGV.0.001558.
  70. Zhao, Q.; Li, S.; Xue, F.; Zou, Y.; Chen, C.; Bartlam, M.; Rao, Z. Structure of the Main Protease from a Global Infectious Human Coronavirus, HCoV-HKU1. *J. Virol.* 2008, 82, 8647–8655, doi:10.1128/jvi.00298-08.
  71. Lee, J.; Worrall, L.J.; Vuckovic, M.; Rosell, F.I.; Gentile, F.; Ton, A.T.; Caveney, N.A.; Ban, F.; Cherkasov, A.; Paetzel, M.; et al. Crystallographic structure of wild-type SARS-CoV-2 main protease acyl-enzyme intermediate with physiological C-terminal autoprocessing site. *Nat. Commun.* 2020, 11, doi:10.1038/s41467-020-19662-4.
  72. Su, H.; Zhou, F.; Huang, Z.; Ma, X.; Natarajan, K.; Zhang, M.; Huang, Y.; Su, H. Molecular Insights into Small-Molecule Drug Discovery for SARS-CoV-2. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2021, 60, 9789–9802, doi:10.1002/anie.202008835.
  73. Shi, J.; Wei, Z.; Song, J. Dissection Study on the Severe Acute Respiratory Syndrome 3C-like Protease Reveals the Critical Role of the Extra Domain in Dimerization of the Enzyme. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 24765–24773, doi:10.1074/jbc.M311744200.
  74. Goyal, B.; Goyal, D. Targeting the Dimerization of the Main Protease of Coronaviruses: A Potential Broad-Spectrum Therapeutic Strategy. *ACS Comb. Sci.* 2020, 22, 297–305, doi:10.1021/acscombsci.0c00058.
  75. Barrila, J.; Bacha, U.; Freire, E. Long-range cooperative interactions

- modulate dimerization in SARS 3CL pro. *Biochemistry* 2006, 45, 14908–14916, doi:10.1021/bi0616302.
76. Chen, S.; Zhang, J.; Hu, T.; Chen, K.; Jiang, H.; Shen, X. Residues on the dimer interface of SARS coronavirus 3C-like protease: Dimer stability characterization and enzyme catalytic activity analysis. *J. Biochem.* 2008, 143, 525–536, doi:10.1093/jb/mvm246.
  77. Shi, J.; Sivaraman, J.; Song, J. Mechanism for Controlling the Dimer-Monomer Switch and Coupling Dimerization to Catalysis of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 3C-Like Protease. *J. Virol.* 2008, 82, 4620–4629, doi:10.1128/jvi.02680-07.
  78. Günther, S.; Reinke, P.Y.A.; Fernández-García, Y.; Lieske, J.; Lane, T.J.; Ginn, H.M.; Koua, F.H.M.; Ehrt, C.; Ewert, W.; Oberthuer, D.; et al. X-ray screening identifies active site and allosteric inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. *Science* (80-. ). 2021, 372, 642–646, doi:10.1126/science.abf7945.
  79. Gorkhali, R.; Koirala, P.; Rijal, S.; Mainali, A.; Baral, A.; Bhattarai, H.K. Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinform. Biol. Insights* 2021, 15, doi:10.1177/11779322211025876.
  80. Narwal, M.; Armache, J.P.; Edwards, T.J.; Murakami, K.S. SARS-CoV-2 polyprotein substrate regulates the stepwise Mpro cleavage reaction. *J. Biol. Chem.* 2023, 299, 104697, doi:10.1016/j.jbc.2023.104697.
  81. Kumar, S.; Xu, J.; Xie, X.; Gianti, E.; Chen, H.; Shi, P.; Zhou, J.; Li, H. Allosteric inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2. 2020.
  82. Nguyen, D.D.; Gao, K.; Chen, J.; Wang, R.; Wei, G.W. Unveiling the molecular mechanism of SARS-CoV-2 main protease inhibition from 137 crystal structures using algebraic topology and deep learning. *Chem. Sci.* 2020, 11, 12036–12046, doi:10.1039/d0sc04641h.
  83. Binford, S.L.; Maldonado, F.; Brothers, M.A.; Weady, P.T.; Zalman, L.S.; Meador, J.W.; Matthews, D.A.; Patick, A.K. Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor.

- Antimicrob. Agents Chemother. 2005, 49, 619–626, doi:10.1128/AAC.49.2.619-626.2005.
84. Kuo, C.J.; Liu, H.G.; Lo, Y.K.; Seong, C.M.; Lee, K.I.; Jung, Y.S.; Liang, P.H. Individual and common inhibitors of coronavirus and picornavirus main proteases. *FEBS Lett.* 2009, 583, 549–555, doi:10.1016/j.febslet.2008.12.059.
  85. Grum-Tokars, V.; Ratia, K.; Begaye, A.; Baker, S.C.; Mesecar, A.D. Evaluating the 3C-like protease activity of SARS-Coronavirus: Recommendations for standardized assays for drug discovery. *Virus Res.* 2008, 133, 63–73, doi:10.1016/j.virusres.2007.02.015.
  86. Mengist, H.M.; Fan, X.; Jin, T. Designing of improved drugs for COVID-19: Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease Mpro. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020, 5, 2–3, doi:10.1038/s41392-020-0178-y.
  87. Jin, Z.; Zhao, Y.; Sun, Y.; Zhang, B.; Wang, H.; Wu, Y.; Zhu, Y.; Zhu, C.; Hu, T.; Du, X.; et al. Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020, 27, 529–532, doi:10.1038/s41594-020-0440-6.
  88. Dai, W.; Zhang, B.; Jiang, X.M.; Su, H.; Li, J.; Zhao, Y.; Xie, X.; Jin, Z.; Peng, J.; Liu, F.; et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science (80-. )*. 2020, 368, 1331–1335, doi:10.1126/science.abb4489.
  89. Su, H.; Yao, S.; Zhao, W.; Li, M.; Liu, J.; Shang, W.J.; Xie, H.; Ke, C.; Gao, M.; Yu, K.; et al. Discovery of baicalin and baicalein as novel, natural product inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease in vitro. *bioRxiv* 2020, 2020.04.13.038687.
  90. Jain, R.; Mujwar, S. Repurposing metocurine as main protease inhibitor to develop novel antiviral therapy for COVID-19. *Struct. Chem.* 2020, 31, 2487–2499, doi:10.1007/s11224-020-01605-w.
  91. Ahamad, S.; Kanipakam, H.; Birla, S.; Ali, S.; Gupta, D. Screening Malaria-box compounds to identify potential inhibitors against SARS-CoV-2 Mpro, using molecular docking and dynamics simulation studies.

- 2020.
92. Nukoolkarn, V.; Lee, V.S.; Malaisree, M.; Aruksakulwong, O.; Hannongbua, S. Molecular dynamic simulations analysis of ritronavir and lopinavir as SARS-CoV 3CLpro inhibitors. *J. Theor. Biol.* 2008, 254, 861–867, doi:10.1016/j.jtbi.2008.07.030.
  93. Leng, A.; Maitland, E.; Wang, S.; Nicholas, S.; Liu, R.; Wang, J. Potential inhibitors against 2019-nCoV coronavirus Mprotease from clinically approved medicines. *Vaccine* 2020, 39, 247–254.
  94. Ma, C.; Sacco, M.D.; Hurst, B.; Townsend, J.A.; Hu, Y.; Szeto, T.; Zhang, X.; Tarbet, B.; Marty, M.T.; Chen, Y.; et al. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease. *Cell Res.* 2020, 30, 678–692, doi:10.1038/s41422-020-0356-z.
  95. Cao, B.; Wang, Y.; Wen, D.; Liu, W.; Wang, J.; Fan, G.; Ruan, L.; Song, B.; Cai, Y.; Wei, M.; et al. A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382, 1787–1799, doi:10.1056/nejmoa2001282.
  96. Wu, C.; Liu, Y.; Yang, Y.; Zhang, P.; Zhong, W.; Wang, Y.; Wang, Q.; Xu, Y.; Li, M.; Li, X.; et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm. Sin. B* 2020, 10, 766–788, doi:10.1016/j.apsb.2020.02.008.
  97. Christy, M.P.; Uekusa, Y.; Gerwick, L.; Gerwick, W.H. Natural Products with Potential to Treat RNA Virus Pathogens Including SARS-CoV-2. *J. Nat. Prod.* 2021, 84, 161–182, doi:10.1021/acs.jnatprod.0c00968.
  98. Cherrak, S.A.; Merzouk, H.; Mokhtari-Soulimane, N. Potential bioactive glycosylated flavonoids as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: A molecular docking and simulation studies. *PLoS One* 2020, 15, 1–14, doi:10.1371/journal.pone.0240653.
  99. Adem, S.; Eyupoglu, V.; Sarfraz, I.; Rasul, A.; Ali, M. Identification of Potent COVID-19 Main Protease (Mpro) Inhibitors from Natural Polyphenols: An in Silico Strategy Unveils a Hope against CORONA.

- 2020, doi:10.20944/preprints202003.0333.v1.
100. Kim, C.H. Anti–SARS-CoV-2 Natural Products as Potentially Therapeutic Agents. *Front. Pharmacol.* 2021, 12, 1–27, doi:10.3389/fphar.2021.590509.
  101. Bosch, B.J.; van der Zee, R.; de Haan, C.A.M.; Rottier, P.J.M. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *J. Virol.* 2003, 77, 8801–8811, doi:10.1128/jvi.77.16.8801-8811.2003.
  102. Watanabe, Y.; Allen, J.D.; Wrapp, D.; McLellan, J.S.; Crispin, M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (80-. )*. 2020, 369, 330–333, doi:10.1126/science.abb9983.
  103. Xia, S.; Zhu, Y.; Liu, M.; Lan, Q.; Xu, W.; Wu, Y.; Ying, T.; Liu, S.; Shi, Z.; Jiang, S.; et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell. Mol. Immunol.* 2020, 17, 765–767, doi:10.1038/s41423-020-0374-2.
  104. Tang, T.; Bidon, M.; Jaimes, J.A.; Whittaker, G.R.; Daniel, S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. 2020.
  105. Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K.S.; Goldsmith, J.A.; Hsieh, C.L.; Abiona, O.; Graham, B.S.; McLellan, J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (80-. )*. 2020, 367, 1260–1263, doi:10.1126/science.aax0902.
  106. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.H.; Nitsche, A.; et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020, 181, 271–280.e8, doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
  107. Wang, Q.; Zhang, Y.; Wu, L.; Niu, S.; Song, C.; Zhang, Z.; Lu, G.; Qiao, C.; Hu, Y.; Yuen, K.Y.; et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell* 2020, 181, 894–904.e9, doi:10.1016/j.cell.2020.03.045.



108. Xia, S.; Yan, L.; Xu, W.; Agrawal, A.S.; Algaissi, A.; Tseng, C.T.K.; Wang, Q.; Du, L.; Tan, W.; Wilson, I.A.; et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci. Adv.* 2019, 5, doi:10.1126/sciadv.aav4580.
109. Grey; Abou-ismail, M.Y.; Diamond, A.; Kapoor, S.; Arafah, Y. Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells. *Psychiatry Res.* 2020, 14(4), 293.
110. Xia, S.; Xu, W.; Wang, Q.; Wang, C.; Hua, C.; Li, W.; Lu, L.; Jiang, S. Peptide-based membrane fusion inhibitors targeting HCOV-229E spike protein HR1 and HR2 domains. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 8–11, doi:10.3390/ijms19020487.
111. Lu, G.; Wang, Q.; Gao, G.F. Bat-to-human : spike features determining ‘ host jump ’ of MERS-CoV , and beyond. 2020.
112. Liu, S.; Xiao, G.; Chen, Y.; He, Y.; Niu, J.; Escalante, C.R.; Xiong, H.; Farmer, J. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic. *Lancet* 2020, 363, 938–947.
113. Yu, Y.; Deng, Y.Q.; Zou, P.; Wang, Q.; Dai, Y.; Yu, F.; Du, L.; Zhang, N.N.; Tian, M.; Hao, J.N.; et al. A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. *Nat. Commun.* 2017, 8, doi:10.1038/ncomms15672.
114. Weissenhorn, W.; Dessen, A.; Calder, L.J.; Harrison, S.C.; Skehel, J.J.; Wiley, D.C. Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol. Membr. Biol.* 1999, 16, 3–9, doi:10.1080/096876899294706.
115. Yan, R.; Zhang, Y.; Li, Y.; Xia, L.; Guo, Y.; Zhou, Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* (80- ). 2020, 367, 1444–1448, doi:10.1126/science.abb2762.
116. Mabonga, L.; Kappo, A.P. Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. *Biophys. Rev.* 2019, 11, 559–581, doi:10.1007/s12551-019-00570-x.
117. Donoghue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; Godbout, K.; Gosselin, M.;

- Stagliano, N.; Donovan, M.; Woolf, B.; Robison, K.; Jeyaseelan, R.; et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 2000, 87, 1–9, doi:10.1161/01.res.87.5.e1.
118. Zhang, H.; Penninger, J.M.; Li, Y.; Zhong, N.; Slutsky, A.S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med.* 2020, 46, 586–590, doi:10.1007/s00134-020-05985-9.
119. Shang, J.; Wan, Y.; Luo, C.; Ye, G.; Geng, Q.; Auerbach, A.; Li, F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020, 117, doi:10.1073/pnas.2003138117.
120. Chen, Y.; Guo, Y.; Pan, Y.; Joe, Z. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. 2020.
121. Wan, Y.; Shang, J.; Graham, R.; Baric, R.S.; Li, F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J. Virol.* 2020, 94, doi:10.1128/jvi.00127-20.
122. Alejandra Tortorici, M.; Walls, A.C.; Lang, Y.; Wang, C.; Li, Z.; Koerhuis, D.; Boons, G.J.; Bosch, B.J.; Rey, F.A.; de Groot, R.J.; et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2019, 26, 481–489, doi:10.1038/s41594-019-0233-y.
123. Coutard, B.; Valle, C.; Lamballerie, X. De; Canard, B.; Seidah, N.G.; Decroly, E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. 2020.
124. Liu, J.; Xie, W.; Wang, Y.; Xiong, Y.; Chen, S.; Han, J. A comparative overview of COVID-19, MERS and SARS: Review article. 2020.
125. Hasan, A.; Paray, B.A.; Hussain, A.; Qadir, F.A.; Attar, F.; Aziz, F.M.; Sharifi, M.; Derakhshankhah, H.; Rasti, B.; Mehrabi, M.; et al. A review on the cleavage priming of the spike protein on coronavirus by angiotensin-converting enzyme-2 and furin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021, 39, 3025–3033, doi:10.1080/07391102.2020.1754293.

126. Mckee, D.L.; Sternberg, A.; Stange, U.; Laufer, S.; Naujokat, C.; Millet, J.K.; Whittaker, G.R.; Luan, J.; Lu, Y.; Jin, X.; et al. Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 2020, 202, 120–134.
127. Kido, H.; Okumura, Y.; Takahashi, E.; Pan, H.Y.; Wang, S.; Yao, D.; Yao, M.; Chida, J.; Yano, M. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 2012, 1824, 186–194, doi:10.1016/j.bbapap.2011.07.001.
128. Limburg, H.; Harbig, A.; Bestle, D.; Stein, D.A.; Moulton, H.M.; Jaeger, J.; Janga, H.; Harges, K.; Koepke, J.; Schulte, L.; et al. TMPRSS2 Is the Major Activating Protease of Influenza A Virus in Primary Human Airway Cells and Influenza B Virus in Human Type II Pneumocytes. *J. Virol.* 2019, 93, doi:10.1128/jvi.00649-19.
129. Bestle, D.; Heindl, M.R.; Limburg, H.; van Lam van, T.; Pilgram, O.; Moulton, H.; Stein, D.A.; Harges, K.; Eickmann, M.; Dolnik, O.; et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci. Alliance* 2020, 3, 1–14, doi:10.26508/LSA.202000786.
130. Kawase, M.; Kataoka, M.; Shirato, K.; Matsuyama, S. Biochemical Analysis of Coronavirus Spike Glycoprotein Conformational Intermediates during Membrane Fusion. *J. Virol.* 2019, 93, 1–19, doi:10.1128/jvi.00785-19.
131. Harrison, S.C. Viral membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008, 15, 690–698, doi:10.1038/nsmb.1456.
132. Eckert, D.; Kim, P. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 1999, 777–810.
133. Peacock, T.P.; Goldhill, D.H.; Zhou, J.; Baillon, L.; Frise, R.; Swann, O.C.; Kugathasan, R.; Penn, R.; Brown, J.C.; Sanchez-David, R.Y.; et al. The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. *Nat. Microbiol.* 2021, 6, 899–909, doi:10.1038/s41564-021-00908-w.

134. Chan, Y.A.; Zhan, S.H. The Emergence of the Spike Furin Cleavage Site in SARS-CoV-2. *Mol. Biol. Evol.* 2022, 39, 1–7, doi:10.1093/molbev/msab327.
135. Deeks, E.D. Casirivimab/Imdevimab: First Approval. *Drugs* 2021, 81, 2047–2055, doi:10.1007/s40265-021-01620-z.
136. Jones, B.E.; Brown-Augsburger, P.L.; Corbett, K.S.; Westendorf, K.; Davies, J.; Cujec, T.P.; Wiethoff, C.M.; Blackbourne, J.L.; Heinz, B.A.; Foster, D.; et al. LY-CoV555, a rapidly isolated potent neutralizing antibody, provides protection in a non-human primate model of SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 2020, 1–29, doi:10.1101/2020.09.30.318972.
137. Laurini, E.; Marson, D.; Aulic, S.; Fermeglia, A.; Pricl, S. Molecular rationale for SARS-CoV-2 spike circulating mutations able to escape bamlanivimab and etesevimab monoclonal antibodies. *Sci. Rep.* 2021, 11, 1–20, doi:10.1038/s41598-021-99827-3.
138. Patricia, C.O.S. The dual function monoclonal antibodies VIR-7831 and VIR-7832 demonstrate potent in vitro and 2 in vivo activity against SARS-CoV-2. 2021, 3, 6.
139. Bojadzic, D.; Alcazar, O.; Chen, J.; Chuang, S.T.; Condor Capcha, J.M.; Shehadeh, L.A.; Buchwald, P. Small-Molecule Inhibitors of the Coronavirus Spike: ACE2 Protein-Protein Interaction as Blockers of Viral Attachment and Entry for SARS-CoV-2. *ACS Infect. Dis.* 2021, 7, 1519–1534, doi:10.1021/acsinfecdis.1c00070.
140. Li, C.; Zhou, H.; Guo, L.; Xie, D.; He, H.; Zhang, H.; Liu, Y.; Peng, L.; Zheng, L.; Lu, W.; et al. Potential inhibitors for blocking the interaction of the coronavirus SARS-CoV-2 spike protein and its host cell receptor ACE2. *J. Transl. Med.* 2022, 20, 1–11, doi:10.1186/s12967-022-03501-9.
141. Yuanmei Zhu; Danwei Yu; Hongxia Yan; Huihui Chong; Yuxian He Design of Potent Membrane Fusion Inhibitors against SARS-V-2, an EmergingC oronavirus with High Fusogenic Activity. *J. Virol.* 2020, 94, 1–12.

142. Xia, S.; Liu, M.; Wang, C.; Xu, W.; Lan, Q.; Feng, S.; Qi, F.; Bao, L.; Du, L.; Liu, S.; et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res.* 2020, 30, 343–355, doi:10.1038/s41422-020-0305-x.
143. Han, Y.; Král, P. Computational Design of ACE2-Based Peptide Inhibitors of SARS-CoV-2. *ACS Nano* 2020, 14, 5143–5147, doi:10.1021/acsnano.0c02857.
144. Fischer, E. Einfluss der configuration auf die wirkung derenzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1894, 27, 2985–2993.
145. Doytchinova, I. Drug Design—Past, Present, Future. *Molecules* 2022, 27, 1496.
146. Ban, T.A. The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues Clin. Neurosci.* 2006, 8, 335–344, doi:10.31887/dcns.2006.8.3/tban.
147. Guo, Z. The modification of natural products for medical use. *Acta Pharm. Sin. B* 2017, 7, 119–136, doi:10.1016/j.apsb.2016.06.003.
148. Montinari, M.R.; Minelli, S.; De Caterina, R. The first 3500 years of aspirin history from its roots – A concise summary. *Vascul. Pharmacol.* 2019, 113, 1–8, doi:10.1016/j.vph.2018.10.008.
149. Adam, S. Screening for drug discovery : The leading question. *Nature* 2002, 418, 453.
150. Wilson, G.L.; Lill, M.A. Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design. *Future Med. Chem.* 2011, 3, 735–750, doi:10.4155/fmc.11.18.
151. Hessler, G.; Baringhaus, K.H. Artificial intelligence in drug design. *Molecules* 2018, 23, doi:10.3390/molecules23102520.
152. Çelik, I.N.; Arslan, F.K.; Tun, R.; Yildiz, I. Artificial Intelligence on Drug Discovery and Development. *Ankara Univ. Eczac. Fak. Derg.* 2022, 46, 400–427, doi:10.33483/jfpau.878041q.

153. Adelusi, T.I.; Oyedele, A.Q.K.; Boyenle, I.D.; Ogunlana, A.T.; Adeyemi, R.O.; Ukachi, C.D.; Idris, M.O.; Olaoba, O.T.; Adedotun, I.O.; Kolawole, O.E.; et al. Molecular modeling in drug discovery. *Informatics Med. Unlocked* 2022, 29, 100880, doi:10.1016/j.imu.2022.100880.
154. Aminpour, M.; Montemagno, C.; Tuszynski, J.A. An overview of molecular modeling for drug discovery with specific illustrative examples of applications. *Molecules* 2019, 24, doi:10.3390/molecules24091693.
155. Sari, S. Molecular modelling and computer-aided drug design: The skill set every scientist in drug research needs and can easily get. *Hacettepe Univ. J. Fac. Pharm.* 2020, 40, 34–47.
156. Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. 2011, 7, 146–157, doi:10.2174/157340911795677602.
157. Anderson, A.C. The Process of Structure-Based Drug Design. *Artif. Intell. Med.* 2003, 10, 787–797, doi:10.1016/j.chembiol.2003.09.002.
158. Μαυρομούστακος, Θ.; Ζουμπουλάκης, Π. Μοριακή Μοντελοποίηση, Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία; Ιατρικές εκδόσεις Γ.Β. Παρισιάνος, 2008;
159. Χοντζοπούλου, Ε. Διερεύνηση φυσικών και τεχνητών γλυκαντικών ως πιθανών αναστολέων του ενζύμου της λιποξυγενάσης και ανάπτυξη της ασπάρταμης ως αντιφλεγμονώδες φάρμακο, Εθνικό και ΚΑΠοδιστριακό Παιπιστήμιο Αθηνών, 2019.
160. MacroModel, Version 9.9 Schrodinger, LLC, New York, NY 2012.
161. Polak, E.; Ribière, G. Note Sur la Convergence des methods de directions conjugate. *Rev. Fr. infr, Rech Oper.* 1969, 16, 35–43.
162. Ponder, J.W.; Richards, F.M. An efficient newton-like method for molecular mechanics energy minimization of large molecules. *J. Comput. Chem.* 1987, 8, 1016–1024, doi:10.1002/jcc.540080710.
163. Oren, S.S.; Spedicato, E. Optimal conditioning of self-scaling variable Metric algorithms. *Math. Program.* 1976, 10, 70–90, doi:10.1007/BF01580654.

164. Wendy D. Cornell, Piotr Cieplak, Christopher I. Bayly, Ian R. Gould, L.; Kenneth M. Merz, Jr., David M. Ferguson, D.C.S.T.F.; James W. Caldwell, and P.A.K. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 5179–5197.
165. Ferguson, D.M.; Kollman, P.A. Can the Lennard–Jones 6-12 function replace the 10-12 form in molecular mechanics calculations? *J. Comput. Chem.* 1991, 12, 620–626, doi:10.1002/jcc.540120512.
166. McDonald, D.Q.; Still, W.C. AMBER torsional parameters for the peptide backbone. *Tetrahedron Lett.* 1993, 33, 7743–7746, doi:10.1016/0040-4039(93)88034-G.
167. Tirado-Rives, W.L.J. and J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 1657–1666.
168. Jorgensen, W.L.; Maxwell, D.S.; Tirado-Rives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11225–11236, doi:10.1021/ja9621760.
169. Kaminski, G.A.; A. Richard Friesner Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J. Phys. Chem.* 2001, 105, 6474–6487.
170. Schmid, N.; Eichenberger, A.P.; Choutko, A.; Riniker, S.; Winger, M.; Mark, A.E.; Van Gunsteren, W.F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* 2011, 40, 843–856, doi:10.1007/s00249-011-0700-9.
171. Rappe, A.K.; Casewi, C.J.; Colwell, K.S.; III, W.A.G.; Skid, W.M. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 10024–10035, doi:10.1177/1087057115569155.
172. Halgren, T.A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope,

- Parameterization, and Performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* 1996, 17, 490–519.
173. Watts, K.S.; Dalal, P.; Murphy, R.B.; Sherman, W.; Friesner, R.A.; Shelley, J.C. ConfGen: A conformational search method for efficient generation of bioactive conformers. *J. Chem. Inf. Model.* 2010, 50, 534–546, doi:10.1021/ci100015j.
174. Pathria, R.K.; Beale, P.D. Computer Simulations. In *Statistical Mechanics*; 2011; pp. 637–652 ISBN 9780123821881.
175. Kuntz, I.D.; Blaney, J.M.; Oatley, S.J.; Langridge, R.; Ferrin, T.E. *A Geometric Approach to Macromolecule-Ligand Interactions*. 1982.
176. Koshland, D.E. Correlation of structure and function in enzyme action. *Science* (80-. ). 1963, 142, 1533–1541, doi:10.1126/science.142.3599.1533.
177. Lybrand, T.P. Ligand-protein docking and rational drug design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995, 5, 224–228, doi:10.1016/0959-440X(95)80080-8.
178. Ermondi, G.; Caron, G. Recognition forces in ligand-protein complexes: Blending information from different sources. *Biochem. Pharmacol.* 2006, 72, 1633–1645, doi:10.1016/j.bcp.2006.05.022.
179. Glide, version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, User Manual, 2012.
180. Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1739–1749, doi:10.1021/jm0306430.
181. Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G. V.; Mee, R.P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 1997, 11, 425–445, doi:10.1023/A:1007996124545.
182. Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Repasky, M.P.; Frye, L.L.; Greenwood,



- J.R.; Halgren, T.A.; Sanschagrin, P.C.; Mainz, D.T. Extra precision glide: Docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 6177–6196, doi:10.1021/jm051256o.
183. Schrodinger Software Release 2015-2, “Induced Fit Docking,” Schrodinger Press, 2015.
184. Takemura, K.; Kitao, A. Molecular dynamics. *Plasma Membr. Shap.* 2022, 431–443, doi:10.1016/B978-0-323-89911-6.00024-8.
185. Alder, B.J.; Wainwright, T.E. Phase transition in elastic disks. *Phys. Rev.* 1962, 127, 359–361, doi:10.1103/PhysRev.127.359.
186. RAHMAN, A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon\*. *Phys. Rev.* 1964, 136, doi:https://doi.org/10.1103/PhysRev.136.A405.
187. Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* 1967, 159.
188. Desmond Molecular Dynamics System, version 4.2, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2015. Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 4.2, Schrödinger, New York, NY, 2015.
189. Bowers, K.J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R.O.; Eastwood, M.P.; Gregersen, B.A.; Klepeis, J.L.; Kolossvary, I.; Moraes, M.A.; Sacerdoti, F.D.; et al. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. *Scalable Algorithms Mol. Dyn. Simulations Commod. Clust.* 2006, 1–13.
190. Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* 2015, 10, 449–461, doi:10.1517/17460441.2015.1032936.
191. Wright, D.W.; Hall, B.A.; Kenway, O.A.; Jha, S.; Coveney, P. V. Computing clinically relevant binding free energies of HIV-1 protease inhibitors. *J. Chem. Theory Comput.* 2014, 10, 1228–1241, doi:10.1021/ct4007037.
192. Lyne, P.D.; Lamb, M.L.; Saeh, J.C. Accurate prediction of the relative

- potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 4805–4808, doi:10.1021/jm060522a.
193. All natural. *Nat Chem Biol*, 2007, 3, 351, doi.org/10.1038/nchembio0707-351.
  194. Adem, S.; Eyupoglu, V.; Sarfraz, I.; Rasul, A.; Ali, M. Identification of Potent COVID-19 Main Protease (Mpro) Inhibitors from Natural Polyphenols: An *in Silico* Strategy Unveils a Hope against CORONA. 2020, doi:10.20944/preprints202003.0333.v1.
  195. Khan, A.; Heng, W.; Wang, Y.; Qiu, J.; Wei, X.; Peng, S.; Saleem, S.; Khan, M.; Ali, S.S.; Wei, D.Q. In silico and in vitro evaluation of kaempferol as a potential inhibitor of the SARS-CoV-2 main protease (3CLpro). *Phyther. Res.* 2021, 35, 2841–2845, doi:10.1002/ptr.6998.
  196. Bhati, S.; Kaushik, V.; Singh, J. Rational design of flavonoid based potential inhibitors targeting SARS-CoV 3CL protease for the treatment of COVID-19. *J. Mol. Struct.* 2021, 1237, 130380, doi:10.1016/j.molstruc.2021.130380.
  197. Russo, G.L.; Tedesco, I.; Spagnuolo, C.; Russo, M. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Semin. Cancer Biol.* 2017, 46, 1–13, doi:10.1016/J.SEMCANCER.2017.05.005.
  198. Spagnuolo, C.; Moccia, S.; Russo, G.L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 153, 105–115, doi:10.1016/j.ejmech.2017.09.001.
  199. İ. Gülçin, Antioxi ant activity of caffeic aci (3,4-dihydroxycinnamic acid), *Toxicology*, 2006, 217, 213-220.
  200. Caffeic acid derivatives (CAFDs) as inhibitors of SARS-CoV-2: CAFDs-based functional foods as a potential alternative approach to combat COVID-19. *Phytomedicine*, **2021**, 85.
  201. C.Y. Chao, M.C. Mong, K.C. Chan, M.C. Yin, Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice, *Molecular Nutrition & Food Research*, **2010**, 54, 388-395.

202. Y. Li, L.J. Chen, F. Jiang, Y. Yang, X.X. Wang, Z. Zhang, Z. Li, L. Li, Caffeic acid improves cell viability and protects against DNA damage: involvement of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **2015**, 48, 502-508.
203. N. Rajendra Prasad, A. Karthikeyan, S. Karthikeyan, B.V. Reddy, Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2011**, 349, 11-19.
203. J.V. Formica, W. Regelson, Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology*, **1995**, 33 1061-1080.
204. herrak, S.A.; Merzouk, H.; Mokhtari-Soulimane, N. Potential bioactive glycosylated. flavonoids as SARS-CoV-2 main proteasee inhibitors: A molecular docking and simulation studiees. *PLoS one*, **2020**, 15, 1-14.  
doi:10.1371/journal.ponee.0240653
205. Merarchi, M.; Dudha, N.; Bhudev, |; Das, C.; Garg, M. Natural products and phytochemicals as potential anti-SARS-CoV-2 drugs. **2021**, doi:10.1002/ptr.7151.
206. Chakravarti, R.; Singh, R.; Ghosh, A.; Dey, D.; Sharma, P.; Velayutham, R.; Roy, S.; Ghosh, D. A review on potential of natural products in the management of COVID-19. **2021**, doi:10.1039/d1ra00644d.
207. Amin, M.; Tabari, K.; Iranpanah, A.; Bahramsoltani, R.; Rahimi, R. molecules Flavonoids as Promising Antiviral Agents against SARS-CoV-2 Infection: A Mechanistic Review. **2021**, doi:10.3390/molecules26133900.
208. Mohamed Alzaabi Rania Hamdy Naglaa Ashmawy Alshaimaa M Hamoda Fatemah Alkhayat Neda Naser Khademi Sara Mahmoud Abo Al Joud Ali A El-Keblawy Sameh S M Soliman, M.S.; Alzaabi Á A A El-Keblawy, M.M.; Hamdy Á S Ashmawy Á A M Hamoda Á S S M Soliman, R.N.; Ashmawy, N.S.; Hamoda, A.M.; Alkhayat Á N Khademi Á S M A Al Joud Á S S M Soliman, F.N. Flavonoids are promising safe therapy

- against COVID-19. *Phytochem. Rev.*, doi:10.1007/s11101-021-09759-z.
209. Xu, J.; Gao, L.; Liang, H.; Chen, S. In silico screening of potential anti-COVID-19 bioactive natural constituents from food sources by molecular docking. *Nutrition* **2021**, *82*, 111049, doi:10.1016/j.nut.2020.111049.
210. Hewlings SJ., Kalman DS., Curcumin: A Review of its Effects on human health. *Foods*, **2017**, *6*, 10, 92, doi: 10.3390/foods6100092
211. Giordano A., Tommoraro G., Curucumin and Cancer, *Nutrients*. **2019**, *5*, 11, 2376, doi: 10.3390/nu11102376.
212. Samy, C.R.A.; Karunanithi, K.; Sheshadhri, J.; Rengarajan, M.; Srinivasan, P.; Cherian, P. (R)-(+)-Rosmarinic Acid as an Inhibitor of Herpes and Dengue Virus Replication: an In Silico Assessment. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2023**, doi:10.1007/s43450-023-00381-y.
213. Elebeedy, D.; Elkhatib, W.F.; Kandeil, A.; Ghanem, A.; Kutkat, O.; Alnajjar, R.; Saleh, M.A.; Abd El Maksoud, A.I.; Badawy, I.; Al-Karmalawy, A.A. Anti-SARS-CoV-2 activities of tanshinone IIA, carnosic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid, baicalein, and glycyrrhetic acid between computational and in vitro insights. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 29267–29286, doi:10.1039/d1ra05268c
214. H. Ghaffari, M. Venkataramana, B. Jalali Ghassam, S. Chandra Nayaka, A. Nataraju, N.P. Geetha, H.S. Prakash, Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal cell damage in N2A cells, *Life Sciences*, **2014**, *113*, 7-13.
215. M.A. Furtado, L.C. de Almeida, R.A. Furtado, W.R. Cunha, D.C. Tavares, Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay, *Mutation Research*, **2008**, *657*, 150-154.
216. S.P. Ekambaram, S.S. Perumal, A. Balakrishnan, N. Marappan, S.S. Gajendran, V. Viswanathan, Antibacterial synergy between rosmarinic acid and antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, **2016**, *5*, 358-363.
217. H.J. Lee, Y.I. Jeong, T.H. Lee, I.D. Jung, J.S. Lee, C.M. Lee, J.I. Kim, H.

- Joo, J.D. Lee, Y.M. Park, Rosmarinic acid inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in murine dendritic cells, *Biochemical Pharmacology*, **2007**, 73, 1412-1421.
218. V. Swarup, J. Ghosh, S. Ghosh, A. Saxena, A. Basu, Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, 51, 3367-3370.
219. Bolognini D, Rock EM, Cluny NL, Cascio MG, Limebeer CL, Duncan M, Stott CG, Javid FA, Parker LA, Pertwee RG. Cannabidiolic acid prevents vomiting in *Suncus murinus* and nausea-induced behaviour in rats by enhancing 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. *Br J Pharmacol*. **2013**, 168, 6, 1456-70. doi: 10.1111/bph.12043.
220. Schwantes, C.R.; Pande, V.S.; Bowers, K.J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R.O.; Eastwood, M.P.; Gregersen, B.A.; Klepeis, J.L.; Kolossvary, I.; et al. Will Cannabis or Cannabinoids Protect You from SARS-CoV-2 Infection or Treat COVID-19? *J. Chem. Theory Comput*. **2022**, 85, 101554, doi:10.1159/000522472.
221. van Breemen, R.B.; Muchiri, R.N.; Bates, T.A.; Weinstein, J.B.; Leier, H.C.; Farley, S.; Tafesse, F.G. Cannabinoids Block Cellular Entry of SARS-CoV-2 and the Emerging Variants. *J. Nat. Prod*. **2022**, 85, 176–184, doi:10.1021/acs.jnatprod.1c00946.
222. Calapai F, Cardia L, Esposito E, Ammendolia I, Mondello C, Lo Giudice R, Gangemi S, Calapai G, Mannucci C. Pharmacological Aspects and Biological Effects of Cannabigerol and Its Synthetic Derivatives. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2022**, 8, 2022:3336516. doi: 10.1155/2022/3336516
223. Xiao Z.; Liu w.; Mu Y. *et al.* Pharmacological Effects of Salvianolic Acid B Against Oxidative Damage, *Front. Pharmacol.*, **2020**, 11. [doi.org/10.3389/fphar.2020.572373](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.572373)
224. Ho, J.H.C., Hong, CY. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *J Biomed Sci*, **2011**, 18, 30. doi.org/10.1186/1423-0127-18-30

225. Zeng, W., Shan, W., Gao, L. *et al.* Inhibition of HMGB1 release via salvianolic acid B-mediated SIRT1 up-regulation protects rats against non-alcoholic fatty liver disease. *Sci* **2015**, *5*, 16013. doi.org/10.1038/srep16013
226. Yang, C.; Pan, X.; Xu, X.; Cheng, C.; Huang, Y.; Li, L.; Jiang, S.; Xu, W.; Xiao, G.; Liu, S. Salvianolic acid C potently inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking the formation of six-helix bundle core of spike protein. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5*, 2–4, doi:10.1038/s41392-020-00325-1
227. Hu, S.; Wang, J.; Zhang, Y.; Bai, H.; Wang, C.; Wang, N.; He, L. Three salvianolic acids inhibit 2019-nCoV spike pseudovirus viropexis by binding to both its RBD and receptor ACE2. *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 3143–3151, doi:10.1002/jmv.26874
228. Forrester, S.J.; Booz, G.W.; Sigmund, C.D.; Coffman, T.M.; Kawai, T.; Rizzo, V.; Scalia, R.; Eguchi, S. Angiotensin II signal transduction: An update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 1627–1738, doi:10.1152/physrev.00038.2017.
229. Mavromoustakos, T.; Agelis, G.; Durdagi, S. AT1 antagonists: A patent review (2008 - 2012). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 1483–1494, doi:10.1517/13543776.2013.830104.
230. Onweni, C.L.; Zhang, Y.S.; Caulfield, T.; Hopkins, C.E.; Fairweather, D.L.; Freeman, W.D. ACEI/ARB therapy in COVID-19: the double-edged sword of ACE2 and SARS-CoV-2 viral docking., doi:10.1186/s13054-020-03195-9.
231. Duarte, M.; Pelorosso, F.; Nicolosi, L.N.; Victoria Salgado, M.; Vetulli, H.; Aquieri, A.; Azzato, F.; Castro, M.; Coyle, J.; Davolos, I.; et al. Telmisartan for treatment of Covid-19 patients: An open multicenter randomized clinical trial. *EClinicalMedicine* **2021**, *37*, 100962, doi:https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100962.
232. Id, K.A.; Soltoff Id, A.; Rieu-Werden, M.; Metlay, J.; Haas, J. Use of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers associated with lower risk of COVID-19 in household contacts. **2021**, doi:10.1371/journal.pone.0247548.

233. Sriram, K.; Insel, P.A. A hypothesis for pathobiology and treatment of COVID-19: The centrality of ACE1/ACE2 imbalance. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 4825–4844, doi:10.1111/bph.15082.
234. Jeon, S.; Ko, M.; Lee, J.; Choi, I.; Byun, S.Y.; Park, S.; Shum, D.; Kim, S. Identification of antiviral drug candidates against SARS-CoV-2 from FDA-approved drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, 1–9, doi:10.1128/AAC.00819-20.
235. LigPrep version 3.4, Schrödinger, LLC , New York, NY, 2017.
236. Schrödinger Suite 2012 Schrödinger Suite 2012, Protein Preparation Wizard; Epik version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Impact version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Prime version 3.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012. 2012.
237. Protein Data Bank, “RCSB PDB: Homepage,” RCSB PDB, 2023.
238. Lan, J.; Ge, J.; Yu, J.; Shan, S.; Zhou, H.; Fan, S.; Zhang, Q.; Shi, X.; Wang, Q.; Zhang, L.; et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* **2020**, *581*, 215–220, doi:10.1038/s41586-020-2180-5.
239. Prime, version 4.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
240. Glide, version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
241. Induced Fit Docking, Schrödinger Software Release 2017-1, Schrodinger Press, 2017.
242. Behloul, N.; Baha, S.; Guo, Y.; Yang, Z.; Shi, R.; Meng, J. *In silico* identification of strong binders of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *890*, 173701, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173701.
243. Durdagi, S.; Avsar, T.; Orhan, M.D.; Serhatli, M.; Balcioglu, B.K.; Ozturk, H.U.; Kayabolen, A.; Cetin, Y.; Aydinlik, S.; Bagci-Onder, T.; et al. The neutralization effect of montelukast on SARS-CoV-2 is shown by multiscale in silico simulations and combined in vitro studies. *Mol. Ther.* **2021**, *30*, 1–12, doi:10.1016/j.ymthe.2021.10.014

244. Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935, doi:10.1063/1.445869.
245. Schrödinger Release 2020–1: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2017., Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2017.
246. Shinoda, W.; Mikami, M. Rigid-body dynamics in the isothermal-isobaric ensemble: A test on the accuracy and computational efficiency. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 920–930, doi:10.1002/jcc.10249.
247. Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2017. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, N. Schrödinger Release 2017-1.
248. Shahhamzehei N.; Abdelfatah, S.; Efferth, T In Silico and In Vitro Identification of Pan-Coronaviral Main Protease Inhibitors from a Large Natural Product Library. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 308. <https://doi.org/10.3390/ph1503030>.
249. Bahun, M.; Jukić, M.; Oblak, D.; Kranjc, L.; Bajc, G.; Butala, M.; Bozovičar, K.; Bratkovič, T.; Podlipnik, C.; Poklar, Ulrich, N. Inhibition of the SARS-CoV-2 3CLpro main protease by plant polyphenols, *Food Chemistry*, **2022**, *373*, 8, 131594. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131594>.
250. Hu, S.; Wang, J.; Zhang, Y.; Bai, H.; Wang, C.; Wang, N.; He, L. Three salvianolic acids inhibit 2019-nCoV spike pseudovirus viropexis by binding to both its RBD and receptor ACE2. *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 3143–3151. <https://doi.org/10.1002/jmv.26874>
251. Varsou, D.-D.; Nikolakopoulos, S.; Tsoumanis, A.; Melagraki, G.; Afantitis, A. *Enalos Suite: New Cheminformatics Platform for Drug Discovery and Computational Toxicology*; 2018; Vol. 1800; ISBN 9781493978991.
252. Afantitis, Antreas (6507913243); Tsoumanis, Andreas (57202677895); Melagraki, G. (8283563600) Enalos suite of tools: Enhance cheminformatics and nanoinformat-ics through knime. *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27*, 6523–6535, doi:10.2174/0929867327666200727114410.



