



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Εικονικός Βιολογικός Έλεγχος Βάσεων Δεδομένων
Χημικών Μορίων με Τριδιάστατα Μοντέλα
Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (3D-QSAR):
Εξερεύνηση Καινοτόμων Φαρμακευτικών Μορίων για τη
Θεραπεία της Ηπατίτιδας C και της Μεσογειακής Αναιμίας**

ΒΡΟΝΤΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2016

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Εικονικός Βιολογικός Έλεγχος Βάσεων Δεδομένων Χημικών Μορίων με
Τριδιάστατα Μοντέλα Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (3D-QSAR):
Εξερεύνηση Καινοτόμων Φαρμακευτικών Μορίων για τη Θεραπεία της
Ηπατίτιδας C και της Μεσογειακής Αναιμίας

ΒΡΟΝΤΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

A.M.: 001122

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Θωμάς Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Άννα Τσαντίλη – Κακουλίδου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Ματθαίος Παπαδόπουλος, Ερευνητής Α΄, ΕΙΕ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Θωμάς Μαυρομούστακος
Καθηγητής Χημείας, ΕΚΠΑ

Άννα Τσαντίλη – Κακουλίδου
Καθηγήτρια Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ματθαίος Παπαδόπουλος
Ερευνητής Α΄, ΕΙΕ

Γεώργιος Κόλλιας
Καθηγητής Ιατρικής, ΕΚΠΑ

Δήμητρα Χατζηπαύλου – Λίτινα
Καθηγήτρια Φαρμακευτικής, ΑΠΘ

Αθανάσιος Γκιμήσης
Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας,
ΕΚΠΑ

Ζωή Κούρνια
Ερευνήτρια Γ΄, ΙΙΒΕΑΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 01/03/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν ο *in silico* εντοπισμός νέων ενώσεων κατά των νόσων της ηπατίτιδας C και της μεσογειακής αναιμίας.

Η ηπατίτιδα C, η οποία τις τελευταίες δεκαετίες διαδόθηκε παγκόσμια, οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας C (Hepatitis C Virus, HCV) που προσβάλλει κυρίως το ήπαρ. Μέχρι σήμερα, δεν έχει ανακαλυφθεί το εμβόλιο κατά της ηπατίτιδας C, ενώ η σύγχρονη φαρμακευτική αγωγή είναι αποτελεσματική μόνο σε περιορισμένες περιπτώσεις. Η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση NS5B του HCV είναι το κλειδί λειτουργίας της αντιγραφής του ιικού RNA, αποτελώντας θεραπευτικό στόχο της νόσου. Η αναζήτηση αναστολέων της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV έχει οδηγήσει στη διερεύνηση των νουκλεοζιτικών (NIs) και μη νουκλεοζιτικών αναστολέων (NNIs), που δρουν στο καταλυτικό κέντρο και στις αλλοστερικές θέσεις («παλάμη», «αντίχειρας», «δάχτυλα») του ενζύμου, αντίστοιχα, με τους τελευταίους να έχουν προσελκύσει το ιδιαίτερο ενδιαφέρον των ερευνητών.

Στην παρούσα εργασία, συνδυάστηκε η μοριακή πρόσδεση, το 3D-QSAR CoMSIA (Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Comparative Molecular Similarity Indices Analysis) και η αναζήτηση ομοιότητας, με σκοπό να εντοπιστούν ισχυρά παράγωγα του ινδολίου στη βάση δεδομένων της ChEMBL, ως αναστολείς της αντιγραφής του HCV, μέσω της εικονικής διαλογής. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν υπολογισμοί μοριακής πρόσδεσης 41 παραγώγων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, «παλάμη» II. Σε δεύτερο στάδιο χρησιμοποιήθηκε η πόζα πρόσδεσης της κάθε ένωσης για την ευθυγράμμιση με βάση τον υποδοχέα και την παραγωγή των πεδίων CoMSIA. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε ένα επικυρωμένο μοντέλο 3D-QSAR CoMSIA, ώστε να υπολογιστούν με ακρίβεια οι τιμές δραστηριότητας. Η ροή εργασίας έδωσε πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την πρόσδεση και την ανασταλτική δραστηριότητα αυτών των παραγώγων στην πολυμεράση του HCV. Το ληφθέν *in silico* μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της δραστηριότητας νέων ενώσεων πριν από τη σύνθεση και βιολογική δοκιμή τους, μέσω της διαδικασίας της εικονικής διαλογής. Η βάση δεδομένων της ChEMBL που χρησιμοποιήθηκε έδωσε 18 νέες ενώσεις που περιέχουν το ινδολικό σκελετό

και προβλέπεται να έχουν υψηλή δραστηριότητα και, ως εκ τούτου, να τους δοθεί προτεραιότητα για βιολογική εξέταση.

Ακολουθήθηκε μία παρόμοια ροή εργασίας με συνδυασμό των υπολογιστικών μεθόδων: (i) μοριακής πρόσδεσης, (ii) 3D-QSAR CoMFA (Comparative Molecular Fields Analysis), (iii) αναζήτησης ομοιότητας και (iv) εικονικής διαλογής της βάσης δεδομένων της PubChem για τον εντοπισμό νέων δυνάμει αναστολέων του HCV με δομή βασισμένη στο ανθρανιλικό οξύ. Αυτή τη φορά, 53 ενώσεις προσδέθηκαν στην αλλοστερική θέση της RNA πολυμεράσης, στον «αντίχειρα» II. Τα πεδία CoMFA δημιουργήθηκαν μέσω της ευθυγράμμισης των προσδεμένων δομών στο ένζυμο, ώστε να κατασκευαστεί ένα επικυρωμένο και σταθερό μοντέλο 3D-QSAR CoMFA. Το προτεινόμενο μοντέλο έδωσε μία πρώτη εικόνα για τα μοριακά χαρακτηριστικά που προάγουν τη βιοδραστηριότητα, και στη συνέχεια μέσω της εικονικής διαλογής, εκτιμήθηκε η δραστηριότητα νέων δυνάμει βιοδραστικών ενώσεων.

Η μεσογειακή αναιμία (ή β-θαλασσαιμία) είναι μια κοινή διαταραχή του αίματος, που μειώνει την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης (Hb) και εμφανίζεται σε όλες τις περιοχές της υψηλίου. Η φαρμακολογική επανενεργοποίηση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης για την παραγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη θεραπευτική οδό για τη νόσο. Η ερυθρολευχαιμική ανθρώπινη κυτταρική σειρά K562 έχει τη δυνατότητα να εκφράσει τη γ- αλλά όχι τη β-σφαιρίνη. Η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων K562 σχετίζεται με την αύξηση στην έκφραση των γονιδίων της εμβρυϊκής σφαιρίνης, όπως των γονιδίων της ζ, ε, και γ-σφαιρίνης. Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά τα κύτταρα K562 ένα ευρέως χρήσιμο μοντέλο κυτταρικής σειράς για τη μελέτη ενώσεων που είναι δυνητικοί επαγωγείς της γ-σφαιρίνης στη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας.

Σε μια προσπάθεια σχεδιασμού νέων χημειοτύπων με ενισχυμένη κυτταροτοξικότητα εναντίον των κυττάρων της σειράς K562, παράχθηκαν 3D φαρμακοφόρα μοντέλα, ενώ διεξήχθησαν μελέτες 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA σε 33 (E)-α-βενζυλο-θειο χαλκόνες, ως νέοι αναστολείς της BCR-ABL. Η BCR-ABL είναι μια μονίμως ενεργή κινάση τυροσίνης, η οποία είναι υπεύθυνη για τον κακοήγη μετασχηματισμό και τη χρόνια μυελογενή

λευχαιμία (CML). Αναπτύχθηκε ένα φαρμακοφόρο πέντε τοποθεσιών (AHHR), με ένα δέκτη δεσμού υδρογόνου, δύο υδρόφοβες ομάδες, και δύο αρωματικούς δακτυλίους ως φαρμακοφόρα χαρακτηριστικά, και προέκυψε ένα σημαντικό στατιστικά μοντέλο 3D-QSAR με εξαιρετική δυνατότητα πρόβλεψης. Το φαρμακοφόρο μοντέλο χρησιμοποιήθηκε επίσης για την ευθυγράμμιση των 33 ενώσεων σε μία ανάλυση CoMFA/CoMSIA. Οι ισοϋψείς χάρτες για τα πεδία CoMFA και CoMSIA παρείχαν μία δομική εικόνα για το πώς αυτά τα μόρια προωθούν την τοξικότητα τους. Συζητήθηκε η δυνατότητα χρήσης αυτού του μοντέλου για τον σχεδιασμό φαρμάκων στη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας, δεδομένου ότι αρκετοί αναστολείς της BCR-ABL είναι σε θέση να επάγουν τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων K562 (κυτταρική σειρά της CML BCR-ABL) και, ως εκ τούτου την ενεργοποίηση της γ-σφαιρίνης.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: HCV, Μεσογειακή Αναιμία, Μοριακή Μοντελοποίηση, Μοριακή Πρόσδεση, 3D-QSAR, CoMFA/CoMSIA, Φαρμακοφόρο Μοντέλο

ABSTRACT

The aim of this dissertation was the *in silico* identification of new compounds against hepatitis C and beta-thalassaemia diseases.

Hepatitis C, caused by hepatitis C virus (HCV), mainly affects the liver and has spread worldwide in recent decades. To date, no vaccine has been discovered against hepatitis C virus, while the current therapy is effective only in limited cases. The HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase is the key function of the replication of viral RNA, constituting a therapeutic target of disease. Search of inhibitors of HCV NS5B RNA polymerase has led to the investigation of the nucleoside (NIs) and non-nucleoside inhibitors (NNIs), targeting on the catalytic site and allosteric sites (palm, thumb, fingers) of the enzyme, respectively. NNIs have attracted the particular interest of researchers.

Molecular docking, 3D-QSAR CoMSIA and similarity search were combined in a multi-step framework with the ultimate goal to identify potent indole analogs, in the ChEMBL database, as inhibitors of HCV replication, in a virtual screening procedure. Initially, 41 known inhibitors were docked into the enzyme "Palm II" active site. In a second step, the docking pose of each compound was used in a receptor-based alignment for the generation of the CoMSIA fields. A validated 3D-QSAR CoMSIA model was subsequently built to accurately estimate the activity values. The proposed framework gave insight into the structural characteristics that affect the binding and the inhibitory activity of these derivatives on HCV polymerase. The obtained *in silico* model was used to predict the activity of novel compounds prior to their synthesis and biological testing, within a virtual screening procedure. The ChEMBL database was mined to afford 18 compounds containing the indole scaffold that are predicted to possess high activity and thus can be prioritized for biological screening.

A similar combination of the computational methods: (i) molecular docking, (ii) 3D-QSAR CoMFA, (iii) similarity search and (iv) virtual screening using PubChem database was applied to identify new anthranilic acid-based inhibitors of HCV replication. 53 known inhibitors were initially docked into the

“Thumb Pocket 2” allosteric site of the crystal structure of the RNA polymerase. Then, the CoMFA fields were generated through a receptor-based alignment of docking poses to build a validated and stable 3D-QSAR CoMFA model. The proposed model was utilized to get insight into the molecular features that promote bioactivity, and then a virtual screening procedure was used to estimate the activity of novel potential bioactive compounds.

Beta-thalassaemia is a common blood disorder spread worldwide, that reduces the production of hemoglobin (Hb). Pharmacological reactivation of the γ -globin gene for the production of fetal haemoglobin (HbF) is a very promising therapeutic avenue for the disease. K562 human erythroleukemic cell line has the potential to highly express the γ - but not the β -globin gene. Erythroid differentiation of K562 cells is associated with an increase in the expression of embryo-fetal globin genes such as ζ , ϵ , and γ -globin genes. This characteristic makes K562 cells a widely useful model cell line for the study of compounds that are potential γ -globin inducers for use β -thalassaemia

In an attempt to aid the design of new chemotypes with enhanced cytotoxicity against K562 cells, 3D pharmacophore models were generated and 3D-QSAR CoMFA and CoMSIA studies were carried out on the 33 novel ABL kinase inhibitors (E)- α -benzylthio chalcones. BCR-ABL is a constitutively active tyrosine kinase that is responsible for the malignant transformation and chronic myelogenous leukemia (CML). A five-point pharmacophore (AHHR) with a hydrogen bond acceptor, two hydrophobic groups, and two aromatic rings as pharmacophore features, and a statistically significant 3D-QSAR model with excellent predictive power were developed. The pharmacophore model was also used for alignment of 33 compounds in a CoMFA/CoMSIA analysis. The contour maps of the fields of CoMFA and CoMSIA models were utilized to provide structural insight into how these molecules promote their toxicity. The possibility of using this model for the design of drugs for the treatment of β -thalassaemia since several BCR-ABL inhibitors are able to promote erythroid differentiation and γ -globin expression in CML cell lines and primary erythroid cells was discussed.

SUBJECT AREA: Rational Drug Design

KEYWORDS: HCV, beta-thalassaemia, Molecular Modeling, Molecular Docking, 3D-QSAR, CoMFA/CoMSIA, Pharmacophore Modeling

Αφιερωμένο εξαιρετικά στην
αείμνηστη γιαγιά μου, Ελένη,
που χάθηκε από Ηπατίτιδα C

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ευκαιρία της ολοκλήρωσης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους με βοήθησαν και μου συμπαραστάθηκαν στην προσπάθεια αυτή.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Θωμά Μαυρομούστακο για την αγαστή συνεργασία μας και τη σημαντική βοήθειά του. Η παρούσα διατριβή δεν θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χωρίς την πολύτιμη επίβλεψη και καθοδήγησή του σε όλα τα στάδια της. Οι επιστημονικές συμβουλές του και οι εύστοχες παρατηρήσεις του συνέβαλαν σημαντικά στην ολοκλήρωσή της. Ιδιαίτερα, τον ευχαριστώ για τη συμπάρασταση που μου παρείχε ως Καθηγητής αλλά κυρίως ως Άνθρωπος. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έχει δείξει στο πρόσωπό μου χρόνια τώρα, καθώς έχουμε φέρει εις πέρας μαζί και την πτυχιακή και την ερευνητική μου εργασία διπλώματος ειδίκευσης. Κατά τη διάρκεια της τετραετούς μου φοίτησης ως υποψήφια διδάκτωρ είχα την ευκαιρία να συνταξιδέψω μαζί του και να επισκεφτούμε τη Φρανκφούρτη της Γερμανίας για ερευνητικό σκοπό, αλλά και να μας ξεναγήσει στην πατρίδα του την Κύπρο, στην οποία διοργάνωσε ευρωπαϊκό συνέδριο με μεγάλη επιτυχία.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς μου εξεταστικής επιτροπής, κα Άννα Τσαντίλη – Κακουλίδου, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), και κ. Μάνθο Παπαδόπουλο, ερευνητή Α΄ βαθμίδας στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, για την προθυμία τους και τον κόπο τους να διαβάσουν και να διορθώσουν την παρούσα διατριβή με τις εύστοχες και εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς μου εξεταστικής επιτροπής, κ. Γεώργιο Κόλλια, Καθηγητή Ιατρικής του ΕΚΠΑ και τακτικό μέλος της Ακαδημίας Αθηνών, κα Δήμητρα Χατζηπαύλου – Λίτινα, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κ. Αθανάσιο Γκιμήση, Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας του ΕΚΠΑ, και την κα Ζωή Κούρνια, ερευνήτρια Γ΄ βαθμίδας στο Ινστιτούτο ΙατροΒιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών, που αποδέχτηκαν την πρόταση να αποτελέσουν μέλη της επιτροπής.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους συνεργάτες Δρ. Αντρέα Αφαντίτη και Δρα Γεωργία Μελαγράκη, τόσο για την ανάθεση του θέματος της διατριβής μου, όσο και για τη χρηματοδότηση της, μέσω της εταιρίας NovaMechanics Ltd και του Ευρωπαϊκού Προγράμματος THALAMOSS. Πραγματικά, αν δεν μου είχε γίνει η πρόταση να συμμετέχω σε αυτό το ερευνητικό πρόγραμμα, θεωρώ πως θα ήταν δύσκολο να βρεθεί άλλη ευκαιρία ώστε να συνεχίσω τις διδακτορικές μου σπουδές, στους χαλεπούς καιρούς που ζούμε. Μου δόθηκε η ευκαιρία με αφορμή το ερευνητικό αυτό πρόγραμμα να ταξιδέψω στο εξωτερικό και να επισκεφτώ μέρη που δεν είχα γνωρίσει, όπως τη Φερράρα της Ιταλίας και τη Λυών της Γαλλίας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω σε όλους τους καθηγητές του Εργαστηρίου της Οργανικής Χημείας, για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε στις διάφορες εκδηλώσεις του Εργαστηρίου όλο αυτόν τον καιρό.

Ευχαριστώ θερμά τους/τις μεταπτυχιακούς φοιτητές και φοιτήτριες, τους/τις υποψήφιους/ες διδάκτορες, και τους πλέον διδάκτορες Χημείας που συνάντησα στο εργαστήριο μοριακής μοντελοποίησης για το ευχάριστο κλίμα που πρόσδιδαν στον εργαστηριακό χώρο. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Δρ. Δημήτριο Ντουντανιώτη, για τη στήριξη και συμπαράστασή του, το κουράγιο και τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδινε όλο αυτό το διάστημα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την υπομονή, στήριξη και συμπαράστασή της στις επιλογές μου. Ευχαριστώ και ευγνωμονώ τους γονείς μου, Βαρδή και Αναστασία, για όλα όσα μέχρι σήμερα απλόχερα μου έχουν προσφέρει αυτά τα δέκα χρόνια που βρίσκομαι μακριά τους. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την αδερφή μου, Στέλλα, τον παππού και τη γιαγιά, την κουμπάρα μου, Σοφία, αλλά και όλους τους φίλους και τις φίλες μου που με στήριξαν και μου συμπαραστάθηκαν, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, κατά τη διάρκεια του ερευνητικού μου έργου. Για το τέλος άφησα το πιο σημαντικό ευχαριστώ. Το οφείλω στην αείμνηστη γιαγιά μου, Ελένη, που απεβίωσε από τη νόσο της ηπατίτιδας C, προτού ξεκινήσω τη φοίτησή μου στο διδακτορικό, δίνοντας μου έτσι το κίνητρο και τη δύναμη να ασχοληθώ περισσότερο και να «δεθώ» με το θέμα της διδακτορικής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΥΧΕΣΤΕΡΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C	3
1.1 Η ασθένεια της ηπατίτιδας C και τρόποι θεραπείας της.....	3
1.2 Περιγραφή του ιού της ηπατίτιδας C.....	6
1.3 Αναστολείς της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV	8
1.3.1 Νουκλεοζιτικοί αναστολείς (NIs).....	9
1.3.1.1 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες.....	10
1.3.1.2 Τροποποιημένα νουκλεοτίδια	12
1.3.2 Μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς (NNIs)	14
1.3.2.1 Αναστολείς του τμήματος της «παλάμης».....	15
1.3.2.2 Αναστολείς του τμήματος του «αντίχειρα»	17
A. Αναστολείς του τμήματος του «αντίχειρα» I	17
B. Αναστολείς του τμήματος του «αντίχειρα» II	18
1.4 Κρυσταλλογραφικά δεδομένα.....	19
1.5 Επίλογος	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ (β-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ)	22
2.1 Γενικά για τη β-θαλασσαιμία.....	22
2.2 Θεραπευτική αντιμετώπιση της β-θαλασσαιμίας	24
2.2.1 Μεταγγίσεις	24
2.2.2 Αποσιδήρωση	25
2.2.3 Επαγωγείς της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.....	26
2.2.4 Σπληνεκτομή.....	29
2.2.5 Μεταμόσχευση μυελού των οστών.....	29
2.2.6 Γονιδιακή θεραπεία	30

2.3	Επίλογος	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ		31
3.1	Η διαδικασία προώθησης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος στην αγορά 31	
3.2	Μοριακή Μοντελοποίηση.....	32
3.3	Εφαρμογές της Μοριακής Μοντελοποίησης	34
3.3.1	Σχεδιασμός δομών	35
3.3.2	Ελαχιστοποίηση ενέργειας (energy minimization).....	36
3.3.2.1	Μέθοδοι και αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης της ενέργειας	37
3.4	Επιπλέον εργαλεία προετοιμασίας δομών.....	41
3.4.1	Η εφαρμογή προετοιμασίας πρωτεϊνών (Protein Preparation Wizard)	42
3.4.2	Η εφαρμογή προετοιμασίας προσδετών (LigPrep)	44
3.5	Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking)	45
3.5.1	Η ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη.....	47
3.5.2	Σχηματισμός του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη	47
3.5.3	Η ενέργεια πρόσδεσης.....	48
3.5.4	Αλγόριθμοι μοριακής πρόσδεσης.....	49
3.5.4.1	Συναρτήσεις βαθμολόγησης των αλγόριθμων μοριακής πρόσδεσης	50
3.5.5	Ο αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης Surflex-Dock	50
3.5.5.1	Protomol	51
3.5.5.2	Η διαδικασία μοριακής πρόσδεσης.....	52
I.	Δημιουργία θραυσμάτων του προσδέτη	52
II.	Τοποθέτηση των θραυσμάτων στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα με βάση τους αισθητήρες αλληλεπίδρασης.....	52
III.	Πρόσδεση των υπόλοιπων θραυσμάτων του προσδέτη.....	53

3.5.5.3 Η συνάρτηση βαθμολόγησης.....	53
3.5.6 Ο αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης GLIDE.....	54
3.5.6.1 Ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη.....	55
3.5.6.2 Τοποθέτηση του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα..	56
3.5.6.3 Η συνάρτηση βαθμολόγησης.....	57
3.6 Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR)	60
3.6.1 Ιστορική αναφορά	61
3.6.2 3D Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (3D-QSAR)	62
3.6.3 Οι μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA	63
3.6.3.1 Επιλογή ομάδας εκμάθησης και ομάδας ελέγχου	68
3.6.3.2 Μέθοδος υπολογισμού φορτίων	68
3.6.3.3 Ανάλυση των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS)	69
3.6.3.4 Επικύρωση του μοντέλου 3D-QSAR	71
3.6.4 Δημιουργία μοντέλου 3D-QSAR μέσω PHASE	72
3.7 Εικονική Διαλογή	76
3.7.1 Βάσεις Δεδομένων – Χημικές Βιβλιοθήκες	79
3.7.1.1 Η βάση δεδομένων της ChEMBL.....	79
3.7.1.2 Η βάση δεδομένων της PubChem	80
3.7.1.3 Η βάση δεδομένων της SureChEMBL	80
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΑΣΗΣ CHEMBL ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΙΝΔΟΛΙΟΥ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ HCV.....	83
4.1 Εισαγωγή.....	83
4.2 Επιλογή και προετοιμασία της κρυσταλλογραφικής δομής της RNA πολυμεράσης του HCV	85

4.3	Σχεδιασμός και προετοιμασία των αναστολέων	86
4.4	Μοριακή πρόσδεση με χρήση του αλγόριθμου Surflex-Dock	88
4.5	Εξαγωγή του μοντέλου 3D-QSAR CoMSIA.....	93
4.5.1	Ομάδα δεδομένων (Ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου)	93
4.5.2	Ευθυγράμμιση της ομάδας δεδομένων (Dataset alignment).....	93
4.5.3	Ανάλυση CoMSIA	94
4.5.4	Επικύρωση του μοντέλου 3D-QSAR CoMSIA	96
4.5.5	Ισοϋψείς χάρτες CoMSIA	99
4.6	Εικονική διαλογή.....	103
4.7	Συμπεράσματα	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HCV ΣΥΝΔΥΑΖΟΝΤΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ, 3D-QSAR ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΙΚΗ ΔΙΑΛΟΓΗ.....		112
5.1	Εισαγωγή.....	112
5.2	Επιλογή και προετοιμασία της κρυσταλλογραφικής δομής της RNA πολυμεράσης του HCV	113
5.3	Σχεδιασμός και προετοιμασία των αναστολέων	115
5.4	Μοριακή πρόσδεση με χρήση του αλγόριθμου GLIDE	120
5.5	Εξαγωγή του μοντέλου 3D-QSAR CoMFA	124
5.5.1	Ομάδα δεδομένων (Ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου)	124
5.5.2	Ευθυγράμμιση της ομάδας δεδομένων (Dataset alignment).....	125
5.5.3	Ανάλυση CoMFA.....	126
5.5.4	Επικύρωση του μοντέλου 3D-QSAR CoMFA.....	127
5.5.5	Ισοϋψείς χάρτες CoMFA	128
5.6	Εικονική διαλογή.....	131
5.7	Συμπεράσματα	136

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ 3D-QSAR ΠΡΟΣ ΕΞΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ ΙΣΧΥΡΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ BCR-ABL	137
6.1 Εισαγωγή.....	137
6.2 Σχεδιασμός και προετοιμασία των αναστολέων	141
6.3 Δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου	145
6.4 Δημιουργία των μοντέλων CoMFA και CoMSIA	151
6.5 Συμπεράσματα	162
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	165
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	167
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	172
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	177
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	180
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	181
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV.....	182
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V.....	184
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	190

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Παγκόσμια εξάπλωση της ασθένειας της ηπατίτιδας C.....	4
Σχήμα 1.2: Οι χημικές δομές των τελαπρεβίρης και μποσεπρεβίρης.....	5
Σχήμα 1.3: Προσεγγίσεις για την καταπολέμηση της ηπατίτιδας C.....	6
Σχήμα 1.4: Γονιδιωματική οργάνωση της πολυπρωτεΐνης του HCV.....	7
Σχήμα 1.5: Αναπαράσταση του ανθρώπινου χεριού και της RNA πολυμεράσης NS5B.....	8
Σχήμα 1.6: Κατηγορίες αναστολέων της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV..	9
Σχήμα 1.7: Τα καταλυτικό ενεργό κέντρο της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV.....	10
Σχήμα 1.8: Οι δομές των νουκλεοζιδικών αναστολέων NM283, PSI-6130, RG7128 και PSI-6206.....	12
Σχήμα 1.9: Οι δομές του PSI-7851 και των διαστερεοϊσομερών του (Sp και Rp).....	13
Σχήμα 1.10: Οι δομές των νουκλεοζιδικών αναλόγων γουανοσίνης GS-938, INX-08189, IDX184, και των PSI-353661 και GS-6620.....	13
Σχήμα 1.11: Αναπαράσταση της RNA πολυμεράσης NS5B του ιού της ηπατίτιδας C με κορδέλες.....	14
Σχήμα 1.12: Οι δομές των βενζοθειαδιαζινών ενώσεων 1, SB-711845 και SB-750330.....	16
Σχήμα 1.13: Οι δομές των RG7790 και ABT-333.....	16
Σχήμα 1.14: Οι δομές των GSK625433 και HCV-796.....	17
Σχήμα 1.15: Οι δομές των BI 207127 και BMS-791325.....	18
Σχήμα 1.16: Οι δομές των φιλιμπαβίρης και HCV-371.....	19
Σχήμα 1.17: Μοριακή πρόσδεση της φιλιμπαβίρης στο τμήμα του «αντίχειρα» II της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV.....	20
Σχήμα 2.1: Η παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας.....	23
Σχήμα 2.2: Αιτίες θνησιμότητας θαλασσαιμικών ασθενών στην Ελλάδα.....	24

Σχήμα 2.3: Η εξέλιξη στη θεραπεία αποσιδήρωσης.....	26
Σχήμα 2.4: Η χημικές δομές των ιματινίμπης, ντασατινίμπης και νιλοτινίμπης	29
Σχήμα 3.1: Τρόπος εφαρμογής του ορθολογικού σχεδιασμού για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων στο εργαστήριο Μοριακής Μοντελοποίησης της Οργανικής Χημείας.....	33
Σχήμα 3.2: Στάδια μελέτης μορίων που λαμβάνουν μέρος στη μοριακή πρόσδεση ή/και το QSAR	35
Σχήμα 3.3: Η αυτόματη μετατροπή του μορίου της ασπιρίνης από διδιάστατη μορφή σε τριδιάστατη.	36
Σχήμα 3.4: Δυναμική επιφάνεια	37
Σχήμα 3.5: Τα δύο μοντέλα που εξηγούν την εξειδίκευση της πρόσδεσης της ένωσης στο μεγαλομόριο-στόχο	46
Σχήμα 3.6: Μόριο προσδεμένο στο ενεργό κέντρο υποδοχέα-ενζύμου	48
Σχήμα 3.7: Στο GLIDE η διαδικασία πρόσδεσης ξεκινά με την επιλογή των σημείων πρόσδεσης στο πλέγμα	57
Σχήμα 3.8: Η πορεία που ακολουθείται κατά τη μελέτη 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA	64
Σχήμα 3.9: Ευθυγράμμιση μοριακών δομών και τοποθέτηση τους στο πλέγμα (αριστερά), και αλληλεπίδραση κάθε μορίου με τον αισθητήρα (δεξιά)	66
Σχήμα 3.10: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων ανάλυσης CoMFA με τη μορφή τριδιάστατων ισοϋψών χαρτών (3D contour maps)	67
Σχήμα 3.11: Απεικόνιση των συντελεστών R^2 και Q^2 ως προς τον αριθμό των συνιστωσών A	71
Σχήμα 3.12: Συνοπτική αναπαράσταση ανάπτυξης μοντέλου 3D-QSAR	72
Σχήμα 3.13: Γραφική σύγκριση εικονικής διαλογής και διαλογής υψηλής απόδοσης	77
Σχήμα 3.14: Τεχνικές της εικονικής διαλογής με σκοπό την ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων	78

Σχήμα 3.15: Η αρχική σελίδα του ιστοτόπου της βάσης δεδομένων της ChEMBL	80
Σχήμα 4.1: Η υπολογιστική ροή εργασίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τον εντοπισμό νέων ενώσεων ως αναστολείς του HCV.84	
Σχήμα 4.2: Τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης για α) ένα δραστικό παράγωγο (25j) και β) ένα μη δραστικό παράγωγο (29)	92
Σχήμα 4.3: Το κοινό δομικό τμήμα (δέκα άτομα) των 41 ενώσεων που χρησιμοποιείται για την ευθυγράμμιση.....	94
Σχήμα 4.4: Η υπέρθεση της ευθυγράμμισης των ενώσεων της ομάδας εκμάθησης που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση 3D-QSAR	94
Σχήμα 4.5: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών pEC_{50} και των πειραματικών για το μοντέλο CoMSIA, τόσο για την ομάδα εκμάθησης όσο και για την ομάδα ελέγχου	96
Σχήμα 4.6: Οι ισοϋψείς χάρτες $StDev * Coeff$ των πεδίων CoMSIA για την πιο δραστική ένωση 25g	101
Σχήμα 5.1: Η υπολογιστική ροή εργασίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τον εντοπισμό νέων ενώσεων ως αναστολείς του HCV..	113
Σχήμα 5.2: Το αποτέλεσμα της υπέρθεσης των δύο δομών	121
Σχήμα 5.3: Τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα πρόσδεσης της ενεργής ένωσης 8.....	124
Σχήμα 5.4: Το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης των ενώσεων της ομάδας εκμάθησης που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του μοντέλου CoMFA..	125
Σχήμα 5.5: Το κοινό υπόστρωμα με τα δώδεκα άτομα όλων των αναλόγων της σειράς που μελετάται	125
Σχήμα 5.6: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών pIC_{50} και των πειραματικών για το μοντέλο CoMFA, τόσο για την ομάδα εκμάθησης όσο και για την ομάδα ελέγχου	127
Σχήμα 5.7: Οι ισοϋψείς χάρτες $StDev * Coeff$ των πεδίων CoMFA για την πιο δραστική ένωση 8	130

Σχήμα 6.1: Η υπολογιστική ροή εργασίας που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη.	139
Σχήμα 6.2: Η υπόθεση κοινού φαρμακοφόρου για την ένωση 6c (ID AHRR.423).....	148
Σχήμα 6.3: Οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων του φαρμακοφόρου με ID AHRR.423.....	149
Σχήμα 6.4: Το διάγραμμα των πειραματικών έναντι των προβλεπόμενων τιμών IC_{50} για την ομάδα εκπαίδευσης και την ομάδα δοκιμής με το λογισμικό του PHASE.....	149
Σχήμα 6.5: Τα εικονικά διαγράμματα PHASE 3D-QSAR που εμφανίζονται για την ένωση 6c.....	151
Σχήμα 6.6: Η ευθυγράμμιση όλων των (<i>E</i>)- α -βενζυλο-θειο χαλκονών με βάση την κοινή υπόθεση φαρμακοφόρου που χρησιμοποιήθηκε για τους υπολογισμούς των πεδίων CoMFA και CoMSIA.....	152
Σχήμα 6.7: Τα διαγράμματα των πειραματικών έναντι των προβλεπόμενων τιμών IC_{50} για το μοντέλο CoMFA (πάνω) και το μοντέλο CoMSIA (κάτω).154	154
Σχήμα 6.8: Οι ισοϋψείς χάρτες StDev*Coeff των πεδίων CoMFA για την πιο δραστική ένωση 12b.....	157
Σχήμα 6.9: Οι ισοϋψείς χάρτες StDev*Coeff των πεδίων CoMSIA για την πιο δραστική ένωση 12b.....	160
Σχήμα 6.10: Το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για τη δραστική ένωση 12b στο εναλλακτικό σημείο πρόσδεσης της κινάσης BCR-ABL.....	163
Σχήμα 6.11: Τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα πρόσδεσης της δραστικής ένωσης 12b στο εναλλακτικό σημείο πρόσδεσης της κινάσης BCR-ABL.....	164

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1: Οι μοριακές δομές των 41 <i>N</i> -υποκατεστημένων παραγώγων ινδολίου.....	87
Πίνακας 4.2: Οι τιμές EC_{50} και pEC_{50} , οι βαθμολογίες μοριακής πρόσδεσης ($-\log K_d$), οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές pEC_{50} και η διαφορά τους από τις πειραματικές για τα <i>N</i> -υποκατεστημένα παράγωγα ινδολίου.....	89
Πίνακας 4.3: Τα στατιστικά αποτελέσματα του μοντέλου CoMSIA.....	95
Πίνακας 4.4: Κριτήρια αποδοχής μοντέλου με χρήση του κόμβου Enalos KNIME	98
Πίνακας 4.5: Δομές και προβλεπόμενες τιμές pEC_{50} των ενώσεων της εικονικής διαλογής	104
Πίνακας 4.6: Διακύμανση τιμών πρόβλεψης για τις κυριότερες ιδιότητες των ενώσεων εικονικής διαλογής, όπως υπολογίστηκαν με την εφαρμογή του QikProp.....	108
Πίνακας 4.7: Αναστολή των ενώσεων εικονικής διαλογής βασισμένη σε προηγούμενες δημοσιεύσεις.....	108
Πίνακας 5.1: Οι μοριακές δομές των 53 παραγώγων ανθρανιλικού οξέος και οι πειραματικές τιμές IC_{50}	116
Πίνακας 5.2: Οι πειραματικές τιμές pIC_{50} , οι βαθμολογίες μοριακής πρόσδεσης, οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές pIC_{50} και η διαφορά τους από τις πειραματικές για τα 53 παράγωγα ανθρανιλικού οξέος.	121
Πίνακας 5.3: Τα στατιστικά αποτελέσματα του μοντέλου CoMFA.....	126
Πίνακας 5.4: Κριτήρια αποδοχής μοντέλου με χρήση του κόμβου Enalos KNIME	128
Πίνακας 5.5: Δομές και προβλεπόμενες τιμές pIC_{50} των ενώσεων της εικονικής διαλογής	132
Πίνακας 5.6: Διακύμανση τιμών πρόβλεψης για τις κυριότερες ιδιότητες των ενώσεων εικονικής διαλογής, όπως υπολογίστηκαν με την εφαρμογή του QikProp.....	134

Πίνακας 5.7: Δεδομένα για τις ενώσεις εικονικής διαλογής βασισμένα στη χημική βάση δεδομένων με διπλώματα ευρεσιτεχνίας SureChem	136
Πίνακας 6.1: Οι χημικές δομές των (<i>E</i>)- α -βενζυλο-θειο χαλκονών	142
Πίνακας 6.2: Οι τιμές IC ₅₀ , οι pIC ₅₀ , και οι προβλεπόμενες pIC ₅₀ των (<i>E</i>)- α -βενζυλο-θειο χαλκονών με βάση τα μοντέλα 3D-QSAR PHASE, CoMFA και CoMSIA	143
Πίνακας 6.3: Στατιστικές παράμετροι των μοντέλων 3D-QSAR με το PHASE	148
Πίνακας 6.4: Στατιστικές παράμετροι των μοντέλων 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA	153
Πίνακας 6.5: Κριτήρια αποδοχής των τριών μοντέλων με χρήση του κόμβου Enalos KNIME.....	155

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.

Στο σημείο αυτό, θεωρείται απαραίτητο να αναφερθεί ότι το στάδιο της αναζήτησης ομοιότητας που εφαρμόζεται στη ροή εργασίας, η οποία ακολουθήθηκε στα Κεφάλαια 4 και 5 του πειραματικού μέρους της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε από τους ερευνητές Αντρέα Αφαντίτη και Γεωργία Μελαγράκη, NovaMechanics Ltd. Μάλιστα, η εταιρία NovaMechanics Ltd, που εδρεύει στην Κύπρο, χρηματοδότησε όλο το ερευνητικό έργο της παρούσας διατριβής, μέσω του Ευρωπαϊκού προγράμματος *THALAMOSS* (THALAssaemia MOdular Stratification System for Personalized Therapy of beta-Thalassemia, *FP7-HEALTH-2012-INNOVATION-1, HEALTH.2012.1.2-1*).

Στη διδακτορική διατριβή ακολουθείται η εξής δομή: Στο πρώτο μέρος της (περιλαμβάνει τα τρία πρώτα κεφάλαια) εισάγεται το θεωρητικό υπόβαθρο προς κατανόηση των *in silico* αποτελεσμάτων που ακολουθούν. Ειδικότερα, στα Κεφάλαια 1 και 2, γίνεται μία βιβλιογραφική ανασκόπηση των ασθενειών που μελετώνται, της ηπατίτιδας C και της μεσογειακής αναιμίας, και των προσπαθειών καταπολέμησης τους μέχρι σήμερα. Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο κεφάλαιο επικεντρώνεται στους αναστολείς της RNA πολυμεράσης του ιού της ηπατίτιδας C (HCV), και στο δεύτερο περιγράφεται η νόσος της β-θαλασσαιμίας και πώς η θεραπεία της σχετίζεται με τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία αλλά και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Στο Κεφάλαιο 3, γίνεται εκτενής παρουσίαση των μεθόδων μοντελοποίησης που εφαρμόζονται στα πειράματα μοριακής μοντελοποίησης της παρούσας διατριβής.

Τα επόμενα τρία και τελευταία κεφάλαια αποτελούν το πειραματικό μέρος της διδακτορικής διατριβής. Στα Κεφάλαια 4 και 5 αναπτύσσονται ποσοτικές σχέσεις δομής-δράσης δύο διαφορετικών συνόλων δεδομένων αναστολέων της RNA πολυμεράσης του HCV, που προσδένονται σε δύο διαφορετικές

περιοχές της πολυμεράσης, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, σε κάθε κεφάλαιο, περιγράφεται μία ροή εργασίας πολλαπλών βημάτων, στην οποία συνδυάζονται η μοριακή πρόσδεση, η μέθοδος του 3D-QSAR, η αναζήτηση ομοιότητας και η εικονική διαλογή. Γίνονται κατανοητά τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για τη βιολογική δράση της κάθε σειράς ενώσεων, και τα αποτελέσματα της μελέτης του 3D-QSAR αξιοποιούνται με τη διαλογή βάσεων δεδομένων (ChEMBL, PubChem, κ.α.), ώστε να προσδιοριστούν νέα παράγωγα της σειράς με επιθυμητή δραστικότητα. Τέλος, στο Κεφάλαιο 6 της διδακτορικής διατριβής παράγονται μοντέλα πρόβλεψης 3D-QSAR με βάση την κυτταροτοξικότητα μιας ομάδας ενώσεων κατά της ανθρώπινης ερυθρολευχαιμικής κυτταρικής σειράς K562. Η σειρά K562 έχει τη δυνατότητα να εκφράσει το γονίδιο της γ-σφαιρίνης αποτελώντας χρήσιμο εργαλείο *in vitro* για τη μελέτη ενώσεων που είναι δυνητικοί επαγωγείς της γ-σφαιρίνης στη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας. Οι ενώσεις αυτές έχουν αξιολογηθεί πειραματικά ως αναστολείς της κινάσης BCR-ABL, της οποίας η λειτουργία της ευθύνεται για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία. Σε αυτή τη ροή εργασίας συνδυάζονται η δημιουργία φαρμακοφόρου μοντέλου με τη μετέπειτα δημιουργία του μοντέλου 3D-QSAR.

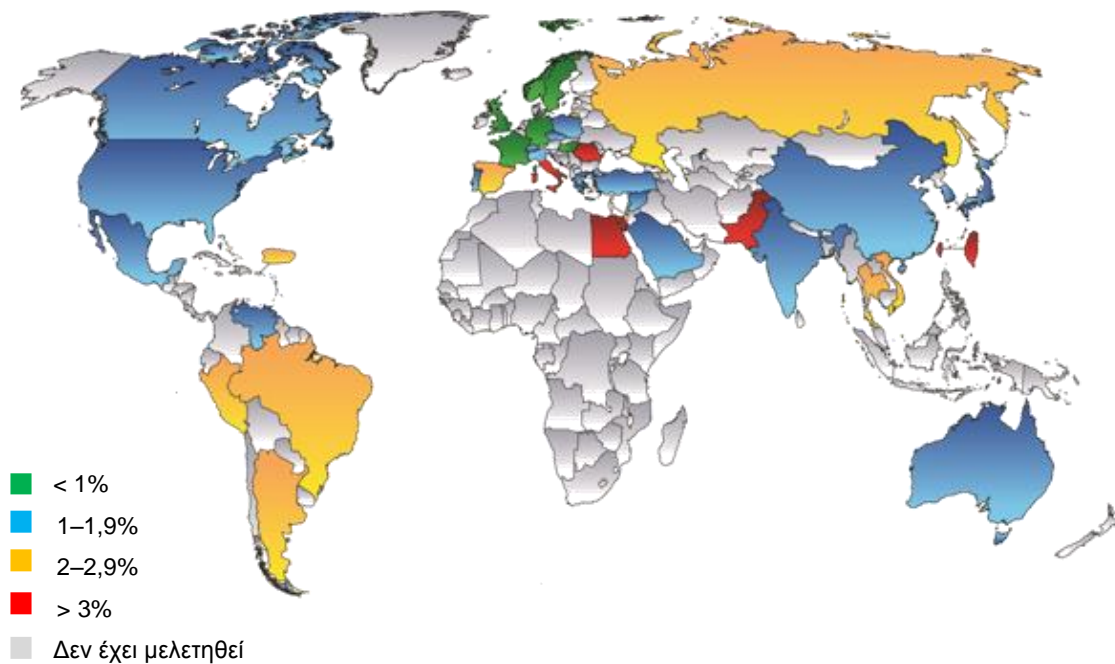
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΥΧΕΣΤΕΡΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑΣ C

1.1 Η ασθένεια της ηπατίτιδας C και τρόποι θεραπείας της

Η ηπατίτιδα C (hepatitis C) είναι μια σοβαρή ασθένεια, η οποία τις τελευταίες δεκαετίες διαδόθηκε παγκόσμια. Η ασθένεια οφείλεται στον ιό της ηπατίτιδας C (Hepatitis C Virus-HCV), ο οποίος προσβάλλει κυρίως το ήπαρ (συκώτι). Οι επιστήμονες άρχισαν να ερευνούν την ύπαρξη και τις βλαβερές επιπτώσεις του ιού στην ανθρώπινη υγεία τη δεκαετία του 1970, ενώ η ανακάλυψή του επιβεβαιώνεται μόλις το 1989.¹ Ο ιός της ηπατίτιδας C αποτελεί, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ιούς που προκαλούν ηπατίτιδες, τον πιο δύσκολο εχθρό κατά της διατήρησης της ομαλής λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, γιατί είναι ύπουλος και η διάγνωσή του γίνεται τις περισσότερες φορές τυχαία. Περίπου το 60-80% των μολύνσεων από τον HCV εξελίσσεται σε χρόνια ηπατίτιδα, που συνήθως οδηγεί σε κίρρωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις μάλιστα, οι άνθρωποι που εμφανίζουν κίρρωση παρουσιάζουν επίσης ηπατική ανεπάρκεια, καρκίνο του ήπατος ή πολύ διογκωμένες φλέβες στον οισοφάγο και στο στομάχι, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αιμορραγία, ή ακόμα και στον θάνατο.²⁻⁵

Ένα ποσοστό μεγαλύτερο του 3% του παγκόσμιου πληθυσμού (~170 εκ. άτομα) έχει χρόνια λοίμωξη από HCV, ενώ 3-4 εκατομμύρια άνθρωποι μολύνονται κάθε χρόνο.⁶⁻⁸ Στις Ηνωμένες Πολιτείες, εκτιμάται ότι περίπου 2,7 εκατομμύρια άτομα ζουν με χρόνια ηπατίτιδα C.³ Το γεγονός αυτό καθιστά τον ιό μεγάλη απειλή αποτελώντας μια μάλιστα ακόμα πιο απειλητική και από τον ιό HIV (ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας) που προκαλεί το AIDS. Στην Ελλάδα, υπολογίζεται ότι περίπου το 2% του γενικού πληθυσμού, δηλαδή 200.000 άτομα, έχουν χρόνια λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας C, ενώ αποτελεί πιο σημαντικό το γεγονός ότι το 80% από αυτούς δεν το γνωρίζει (Σχήμα 1.1).



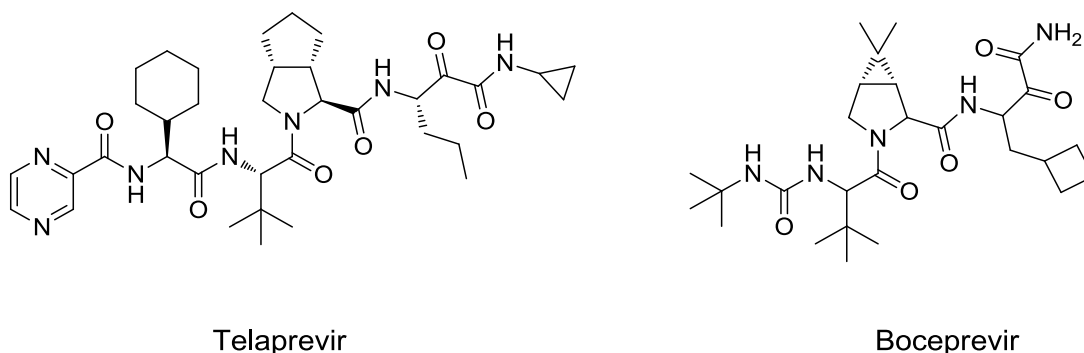
Σχήμα 1.1: Παγκόσμια εξάπλωση της ασθένειας της ηπατίτιδας C
(% του πληθυσμού της κάθε χώρας, Center for Disease Analysis).

Υπάρχουν έξι βασικοί γονότυποι του HCV και αυτοί έχουν 18 υπότυπους (1a, 1b, 2a-2c, 3a-3c, 4a-4h, 5a, 6a).⁹ Οι γονότυποι 1, 2 και 3 είναι κατανομημένοι σε όλη την υφήλιο. Ο γονότυπος 4 κυριαρχεί στη Μέση Ανατολή και Αφρική. Οι γονότυποι 5 και 6 περιορίζονται στη Νότια Αφρική και Νοτιοανατολική Ασία. Ο γονότυπος 3 είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος σε χρήστες ενδοφλέβιων ναρκωτικών ουσιών σε Ευρώπη και Ηνωμένες Πολιτείες. Ο γονότυπος 1 αποτελεί τον πιο συνηθισμένο στη Νότιο Αμερική και την Ευρώπη και για αυτόν τον λόγο έχει γίνει ο πρωταρχικός στόχος της έρευνας αντι-ιικών αναστολέων πρωτεάσης. Στην Ελλάδα, ο γονότυπος 1 εμφανίζεται συχνότερα (46,9%), ακολουθούμενος από τους γονότυπους 3 (28,1%), 4 (13,2%) και 2 (6,9%). Ο γονότυπος 5 ευθύνεται για λοιμώξεις στο 0,4% των κρουσμάτων.¹⁰

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει εμβόλιο κατά της ηπατίτιδας C, όπως συμβαίνει με τις ηπατίτιδες A και B. Ωστόσο, τα εμβόλια είναι υπό ανάπτυξη και μάλιστα ορισμένα από αυτά έχουν δείξει ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Η βλάβη στο ήπαρ μπορεί να περιοριστεί με κατάλληλη φαρμακευτική αγωγή. Για πρώτη φορά, τη δεκαετία του 1980, πραγματοποιήθηκε μία σύντομης χρονικής διάρκειας μονοθεραπεία με απλή ιντερφερόνη άλφα (IFN-α) που οδήγησε σε βελτίωση της ηπατικής νόσου και στην εξαφάνιση του ιού σε λιγότερο από το 10% των ασθενών.

Μια σημαντική εξέλιξη στη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας C ήταν η προσθήκη της ριμπαβιρίνης (RBV) στην IFN-α, ενός νουκλεοζιτικού αναλόγου με αντι-ϊική δράση. Η θεραπεία με IFN-α σε συνδυασμό με RBV οδήγησε στην εξάλειψη του ιού σε ποσοστό 30-40% των ασθενών. Οι ασθενείς με γονότυπο 1 είχαν πολύ λιγότερο ευνοϊκή απόκριση στη θεραπεία αυτή, σε σύγκριση με ασθενείς που παρουσίαζαν λοίμωξη με γονότυπους 2 και 3, ακόμα και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα χορήγησης της θεραπείας. Η σύζευξη της ιντερφερόνης με ένα μόριο πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) αύξησε τον χρόνο ημιζωής του φαρμάκου και τη βιοδιαθεσιμότητά του στον οργανισμό, επιτυγχάνοντας έτσι μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και ευκολία στη χορήγησή του. Ωστόσο, η θεραπεία της PEG-IFN-α, μόνη ή σε συνδυασμό με τη ριμπαβιρίνη, τα τελευταία 10 χρόνια, είναι αποτελεσματική μόνο σε περιορισμένες περιπτώσεις, και συγκεκριμένα σε λιγότερο από το 50% των ασθενών με γονότυπο 1.

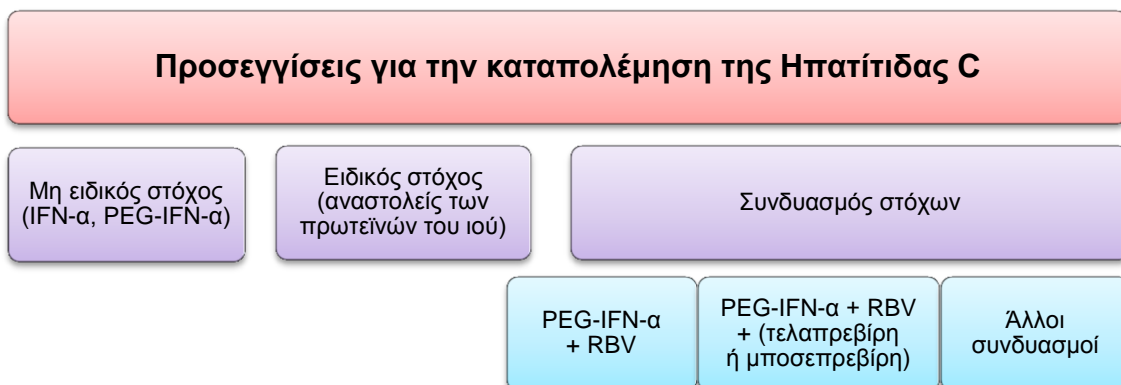
Πρόσφατες κλινικές μελέτες έδειξαν, ότι η προσθήκη τελαπρεβίρης (telaprevir, Σχήμα 1.2), ενός αναστολέα πρωτεάσης ειδικής για τον ιό της ηπατίτιδας C (HCV NS3/4A) σε συνδυασμό με την τρέχουσα θεραπευτική αγωγή, της συζευγμένης ιντερφερόνης άλφα με ριμπαβιρίνη, έδειξαν βελτιωμένη ιολογική απόκριση σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C με γονότυπο 1. Ωστόσο, η θεραπεία προκαλεί δυσμενείς επιπλοκές, όπως κυρίως εξάνθημα. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε η θεραπεία με μποσεπρεβίρη (bocoprevir, Σχήμα 1.2) πάντοτε σε συνδυασμό με PEG-IFN-α και RBV.



Σχήμα 1.2: Οι χημικές δομές των τελαπρεβίρης και μποσεπρεβίρης.

Συνολικά, με τις προαναφερθείσες θεραπείες στους γονότυπους 2 και 3 το ποσοστό επιτυχίας φθάνει το 80%, ενώ στους γονότυπους 1 και 4 τα ποσοστά επιτυχίας είναι περίπου 40-50%. Έτσι, λόγω των σοβαρών

επιζήμιων επιπτώσεων του ιού στην υγεία και την έκταση των λοιμώξεων, η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για την θεραπεία της ηπατίτιδας C συνεχίζει να αποτελεί μία σημαντική πρόκληση για την ερευνητική κοινότητα (Σχήμα 1.3).

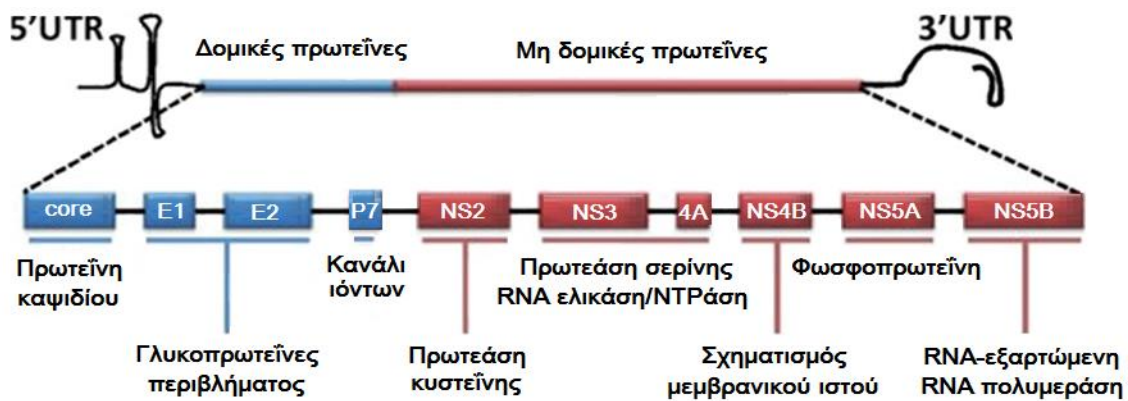


Σχήμα 1.3: Προσεγγίσεις για την καταπολέμηση της ηπατίτιδας C.

1.2 Περιγραφή του ιού της ηπατίτιδας C

Ο ιός της ηπατίτιδας C ανήκει στο γένος *hepacivirus* και είναι μέλος της οικογένειας των *Flaviviridae*. Πρόκειται για έναν μικρό, με περίβλημα, μονόκλωνο, θετικό ιό (+)RNA, το οποίο περιέχει γονιδίωμα που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη 3010 αμινοξέων. Η πολυπρωτεΐνη αυτή αποτελείται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο αμινο-τελικό άκρο και έξι μη δομικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται στο υπόλοιπο δομικό τμήμα της. Στις δομικές πρωτεΐνες που παράγονται από τον HCV περιλαμβάνονται η πρωτεΐνη του πυρήνα (core), οι E1 και E2 και η p7, ενώ στις μη δομικές πρωτεΐνες περιλαμβάνονται οι NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A και NS5B (Σχήμα 1.4).

Η πρωτεΐνη του πυρήνα (core) είναι μία άκρως βασική πρωτεΐνη και αποτελεί το κύριο συστατικό του πυρηνικού καψιδίου. Οι E1 και E2 (πρωτεΐνες φακέλου) είναι ιδιαίτερα γλυκοζυλιωμένες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που χρησιμεύουν για να ενθυλακώνουν το ιικό γονιδίωμα του RNA και να συνθέτουν το σωματίδιο του ιού, ενώ η p7 πιστεύεται ότι σχηματίζει διαύλους ιόντων που είναι απαραίτητοι για την συναρμολόγηση και την απελευθέρωση των μολυσματικών ιών.



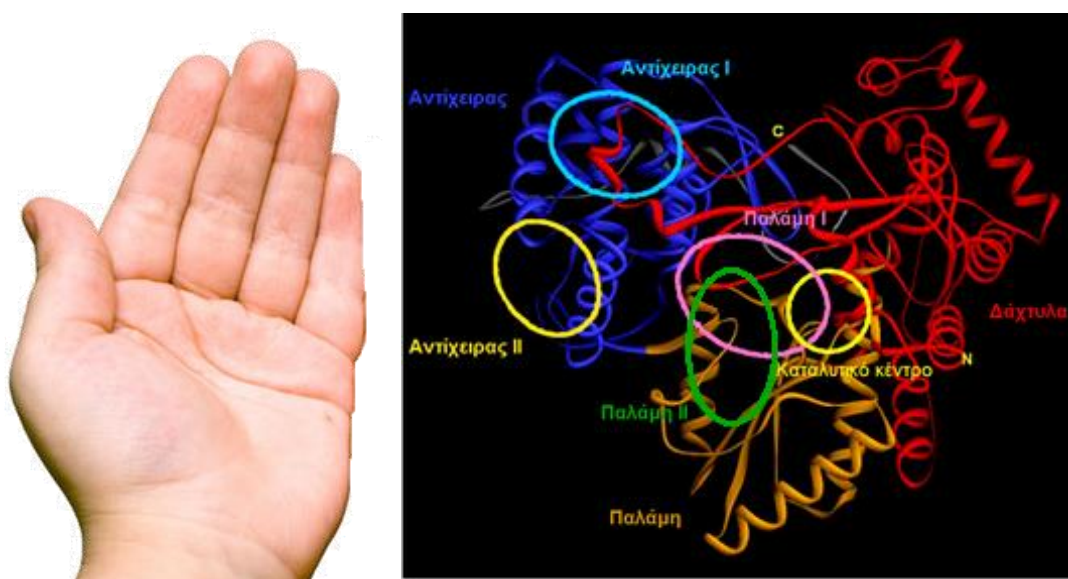
Σχήμα 1.4: Γονιδιωματική οργάνωση της πολυπρωτεΐνης του HCV.

Η NS2 είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη βάρους 21-23 kDa, και έχει δραστικότητα πρωτεάσης. Η NS3 είναι μία πρωτεΐνη βάρους 67 kDa, της οποίας το *N*-τελικό άκρο έχει δραστικότητα πρωτεάσης σερίνης και το *C*-τελικό άκρο έχει δραστικότητα NTPάσης/ελικάσης. Βρίσκεται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και σχηματίζει ένα ετεροδιμερές σύμπλοκο με την πρωτεΐνη NS4A, μια μεμβρανική πρωτεΐνη 54 αμινοξέων που δρα ως συμπαραγοντας της πρωτεάσης. Η NS4B είναι μία μικρή (27 kDa), υδρόφοβη, ενσωματωμένη μεμβρανική πρωτεΐνη με τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές. Βρίσκεται μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο και παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσληψη άλλων ιικών πρωτεϊνών. Η NS5A είναι μία υδρόφιλη φωσφοπρωτεΐνη χωρίς κάποια εμφανή ενζυματική δραστικότητα. Παρόλα αυτά δρα ως ένας πολυλειτουργικός ρυθμιστής κυτταρικών οδών, όπως στην ανάπτυξη φιλοξενούμενων κυττάρων και στην αντιγραφή του ιού.^{11, 12}

Η μη δομική πρωτεΐνη 5B (NS5B) είναι μία RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase) και αποτελεί το κλειδί λειτουργίας της αντιγραφής του ιικού RNA.¹³ Έχει βάρος 66 kDa και αποτελείται από περίπου 590 αμινοξέα. Λόγω της σημαντικής της δράσης, η NS5B έχει υποστεί εκτεταμένους δομικούς και βιοχημικούς χαρακτηρισμούς.^{14, 15} Πολλαπλές κρυσταλλογραφικές δομές της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV σε διάφορες κρυσταλλικές μορφές έχουν προσδιοριστεί μέχρι σήμερα και όλες δείχνουν ότι η RNA πολυμεράση έχει μία βασική δομή που παρομοιάζεται με το ανθρώπινο χέρι, καθώς περιλαμβάνει τα υποτομήματα «παλάμης» (palm), «δαχτύλων» (fingers) και «αντίχειρα» (thumb) (Σχήμα 1.5).¹⁶ Η λειτουργία του υποτομήματος της «παλάμης» είναι ο

σχηματισμός ενός καταλυτικού κέντρου αντίδρασης της νουκλεοτιδικής μεταφοράς. Το υποτομήμα των «δαχτύλων» αλληλεπιδρά με τον εισερχόμενο τριφωσφορικό νουκλεοζίτη, καθώς και με τη βάση-πρότυπο στην οποία έχει αντιστοιχηθεί, ενώ το υποτομήμα του «αντίχειρα» παίζει ρόλο στην τοποθέτηση του RNA για έναρξη και επιμήκυνση.

Η ανάπτυξη του αντι-ϊικών παραγόντων του HCV έχει επικεντρωθεί κυρίως στο σύμπλοκο πρωτεάσης σερίνης NS3/4A και στην RNA πολυμεράση NS5B του ιού της ηπατίτιδας C, και για αυτό αποτελούν τις πιο μελετημένες πρωτεΐνες του HCV. Μέχρι πρόσφατα, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία νουκλεοζιτικοί (NIs) και μη νουκλεοζιτικοί (NNIs) αναστολείς για την πιο πολυμελετημένη πολυμεράση-στόχο NS5B με στόχο την καταπολέμηση του HCV μέσω υψηλής απόδοσης διαλογής μεγάλων βιβλιοθηκών μοριακών δομών.¹⁷⁻¹⁹ Οι κατηγορίες των αναστολέων του ενζύμου NS5B αναλύονται στην παράγραφο 1.3.

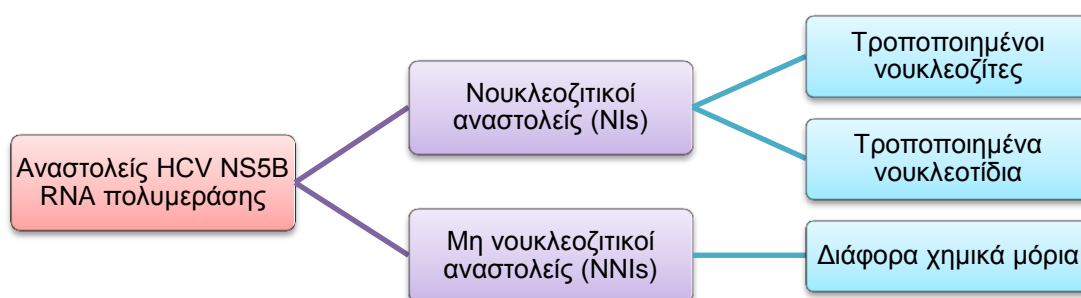


Σχήμα 1.5: Αναπαράσταση του ανθρώπινου χεριού και της RNA πολυμεράσης NS5B.

1.3 Αναστολείς της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV

Όπως προαναφέρθηκε, η αναζήτηση αναστολέων της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV οδήγησε στη διερεύνηση των νουκλεοζιτικών (NIs) και μη νουκλεοζιτικών αναστολέων (NNIs) (Σχήμα 1.6). Οι νουκλεοζιτικοί αναστολείς είναι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες και τροποποιημένα νουκλεοτίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα στο ενεργό καταλυτικό

κέντρο της πολυμεράσης, ώστε να ανταγωνιστούν τα φυσικά υποστρώματα. Μέσω των τριφωσφορικών μεταβολιτών τους, τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια και οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες ενσωματώνονται στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα του RNA, με αποτέλεσμα να προκαλούν τον τερματισμό του σταδίου επιμήκυνσης για την αντιγραφή, και έτσι να δρουν ως τερματιστές αλυσίδας του RNA. Ο μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτικών αναστολέων περιγράφεται στην παράγραφο 1.3.1 του παρόντος κεφαλαίου. Αντίθετα, οι μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς είναι διάφορα χημικά μικρά μόρια που προσδένονται σε αλλοστερικές θέσεις («παλάμη», «αντίχειρας»), διαφορετικές από το καταλυτικό κέντρο του υποδοχέα. Οι μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς με την πρόσδεσή τους πιθανόν να προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση και τη χωροδιάταξη της πολυμεράσης, εμποδίζοντας αποτελεσματικά τη λειτουργία του ενζύμου και συνεπώς να αναστέλλουν την έναρξη του σταδίου για την αντιγραφή του RNA.



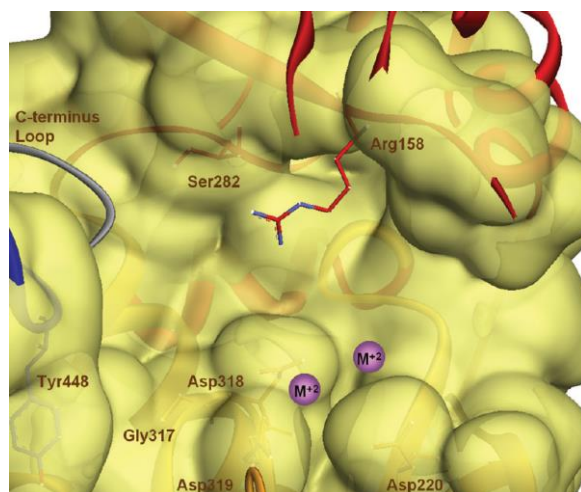
Σχήμα 1.6: Κατηγορίες αναστολέων της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV.

Μέχρι σήμερα, έχει βρεθεί ένας ικανοποιητικός αριθμός αναστολέων της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV, καθώς έχει αποδειχθεί ότι μειώνουν το ιικό φορτίο σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί από τον ιό της ηπατίτιδας C.^{20, 21} Συμπερασματικά, οι αναστολείς της πολυμεράσης NS5B του HCV αποτελούν υποσχόμενα μόρια για τη θεραπεία των ασθενών που είναι μολυσμένοι με HCV.

1.3.1 Νουκλεοζιτικοί αναστολείς (NIs)

Το καταλυτικό κέντρο της RNA πολυμεράσης του HCV βρίσκεται στο υποτομήμα της «παλάμης» (Σχήμα 1.7) και αποτελείται από την κοινή στις πολυμεράσες των ιών τριάδα των αμινοξέων Gly-Asp-Asp. Σε αυτή τη θέση, ένας 5'-τριφωσφορικός ριβονουκλεοζίτης συνδέεται μέσω συναρμογής με ένα

δισθενές μέταλλο (Mg^{2+} ή Mn^{2+}) και στη συνέχεια προστίθεται στο 3'-άκρο της αυξανόμενης αλυσίδας του RNA μέσω του σχηματισμού ενός 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού.



Σχήμα 1.7: Τα καταλυτικό ενεργό κέντρο της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV.¹⁹

Κατά συνέπεια, η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναστολέων της RNA πολυμεράσης του HCV που λειτουργούν ως τερματιστές αλυσίδας του RNA για να εμποδίσουν τα περαιτέρω γεγονότα της αντιγραφής είναι μια λογική στρατηγική στην έρευνα για τους αντι-HCV παράγοντες. Η ιοντική φύση όμως του φωσφορικού τμήματος των νουκλεοζιτικών αναστολέων εμποδίζει την αποτελεσματική μεταφορά τους διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Για τον λόγο αυτόν απαιτείται η μεταφορά τους υπό μορφή αφόρτιστων νουκλεοζιτών ή προφαρμάκων.²² Οι αναστολείς-προφάρμακα διασπώνται μέσα στον οργανισμό από τις κυτταρικές κινάσες, ώστε να αποκτήσουν τη δραστική τους μορφή (μονοφωσφορική μορφή). Αξιοσημείωτο είναι πως λόγω της διατήρησης του ενεργού κέντρου της πολυμεράσης, οι νουκλεοζιτικοί αναστολείς έχουν παρόμοια αποτελεσματικότητα σε όλους τους απομονωμένους γονότυπους του HCV.²³ Για τον ίδιο λόγο, αυτοί οι αναστολείς της πολυμεράσης δείχνουν ένα υψηλότερο φράγμα στην ιική ανθεκτικότητα σε σχέση με τους μη νουκλεοζιτικούς.²⁴

1.3.1.1 Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες

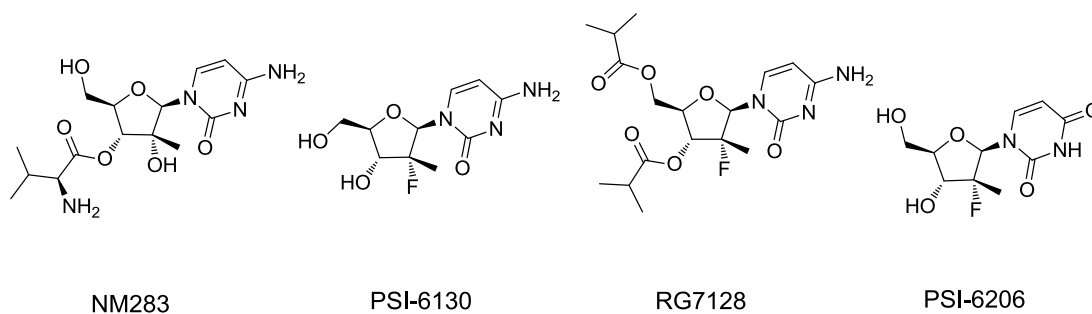
Οι νουκλεοζιτικοί αναστολείς του ιού της ηπατίτιδας C μπορεί να είναι ριβονουκλεοζιδικά ανάλογα που πρέπει να μετατραπούν στα αντίστοιχα 5'-τριφωσφορικά τους από τις κυτταρικές κινάσες μέσα στο κυτταρόπλασμα των

μολυσμένων κυττάρων, ώστε να μιμηθούν τα φυσικά υποστρώματα της πολυμεράσης.²⁵ Οι NIs, γενικότερα, διαθέτουν ένα ελεύθερο 3-υδροξύλιο στο σάκχαρο και δεν μπορούν να θεωρηθούν υποχρεωτικοί τερματιστές αλυσίδας (chain terminators) RNA. Ωστόσο, όλοι οι νουκλεοζιτικοί αναστολείς στην ανάπτυξη τους περιέχουν τροποποιήσεις στη 2-θέση του σακχάρου. Επομένως, είναι νοητό ότι αυτές οι ενώσεις μπορεί να δρουν ως τερματιστές αλυσίδας, λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης που ασκείται από τις 2-C-μεθυλο- ή 2-φθορο-ομάδες. Η πρωταρχική μετάλλαξη που εντοπίστηκε να σχετίζεται με μειωμένη ευαισθησία σε ένα ευρύ φάσμα των 2-τροποποιημένων αναλόγων νουκλεοζιτών και νουκλεοτιδίων είναι η NS5B S282T.²⁶⁻²⁸

Η βαλοπικιταμπίνη (valopicitabine, NM283, Σχήμα 1.8) είναι ένα χορηγούμενο διά του στόματος προφάρμακο (εστέρας της 3-O-βαλίνης) της 2'-C-μεθυλοκυτιδίνης (NM107) και αποτελεί το πρώτο ανάλογο νουκλεοζίτη, αναστολέα του HCV που τέθηκε σε κλινικές δοκιμές.²⁹ Λόγω όμως της μη υποσχόμενης φαρμακολογικής του δράσης που παρατηρήθηκε σε κλινικές δοκιμές, η ανάπτυξη της βαλοπικιταμπίνης σταμάτησε.

Μετά από την 2'-C-μεθυλοκυτιδίνη,³⁰ διάφορα άλλα 2'-τροποποιημένα ανάλογα νουκλεοζίτη με στόχευση την RNA πολυμεράση NS5B του HCV έχουν αναφερθεί ότι αναστέλλουν την *in vitro* αντιγραφή του HCV. Αυτά περιλαμβάνουν τη 2'-O-μεθυλοκυτιδίνη,³⁰ τη 2'-O-μεθουλαδενοσίνη,³⁰ τη 2'-O-μεθυλογουανοσίνη,²⁷ τη 7-δεαζα-2'-C-μεθουλαδενοσίνη,³¹ τη 2'-δεοξυ-2'-φθορο-2'-C-μεθυλοκυτιδίνη (PSI 6130, Σχήμα 1.8),³² όπως και τη 2'-δεοξυ-2'-σπυροκυκλοπροπυλοκυτιδίνη (TMC647078).³³ Εκτός από την PSI-6130, κανένα από τα προαναφερθέντα ανάλογα νουκλεοζιτών δεν αναπτύχθηκαν περαιτέρω.

Τέλος, η μερισιταμπίνη (mericitabine, RG7128, Σχήμα 1.8) είναι ένας δι-ισοβουτυλο-εστέρας και προφάρμακο της PSI-6130, και αποτελεί ανάλογο νουκλεοζίτη κυτιδίνης (β-D-2'-δεοξυ-2'-φθορο-2'-C-μεθυλοκυτιδίνη).³² Η PSI-6130 μεταβολίζεται ενδοκυτταρικά στην 5'-τριφωσφορική της β-D-2'-δεοξυ-2'-φθορο-2'-C-μεθυλοκυτιδίνης και επίσης, ακολουθούμενη από απαμίνωση, στην τριφωσφορική της β-D-2'-δεοξυ-2'-φθορο-2'-C-μεθουριδίνης (PSI-6206, Σχήμα 1.8).³⁴



Σχήμα 1.8: Οι δομές των νουκλεοζιτικών αναστολέων NM283, PSI-6130, RG7128 και PSI-6206.

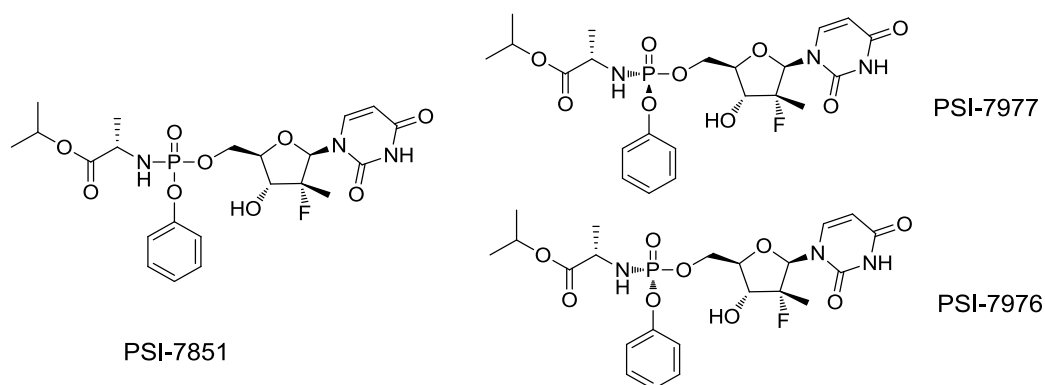
1.3.1.2 Τροποποιημένα νουκλεοτίδια

Οι νουκλεοζίτες, όπως προαναφέρθηκε, πρέπει να μετατραπούν ενδοκυτταρικά στα 5'-τριφωσφορικά τους παράγωγα, ώστε να είναι ενεργοί αναστολείς των πολυμερασών των ιών. Πολλοί από αυτούς αποτυγχάνουν, πιθανότατα στο πρώτο στάδιο της φωσφορυλίωσης. Για παράδειγμα, οι νουκλεοζίτες που μετατρέπονται σε 5'-μονοφωσφορικούς νουκλεοζίτες, είναι ενζυμικά αποφωσφορυλιωμένα και αρνητικά φορτισμένα μόρια, που δεν εισέρχονται στα κύτταρα, ενώ είναι ασταθή καθιστάμενα ανεπιθύμητα για υποψήφια φάρμακα. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές για σύνθεση παραγώγων του 5'-μονοφωσφορικού νουκλεοζίτη (νουκλεοτιδίου) όπου στη φωσφορική ομάδα προσαρτάται μια προστατευτική ομάδα. Η ομάδα αυτή αποκολλάται από το μόριο στον οργανισμό και έτσι ο προστατευμένος 5'-μονοφωσφορικός νουκλεοζίτης δρα ως προφάρμακο.³⁵⁻³⁸

Τα νουκλεοτίδια-αναστολείς της πολυμεράσης είναι προφάρμακα που στοχεύουν στο ήπαρ και έχουν σχεδιαστεί για να ενισχύσουν τον σχηματισμό του δραστικού τριφωσφορικού τους στο ήπαρ, και να ελαχιστοποιείται η συστηματική έκθεση του νουκλεοτιδικού φαρμάκου και νουκλεοζιδικού μεταβολίτη του. Αυτά τα προφάρμακα νουκλεοτιδικών αναλόγων κατά προτίμηση διασπώνται από τα ηπατικά ένζυμα, απελευθερώνοντας έτσι αποτελεσματικά τον μονοφωσφορικό νουκλεοζίτη τους στα ηπατικά κύτταρα.

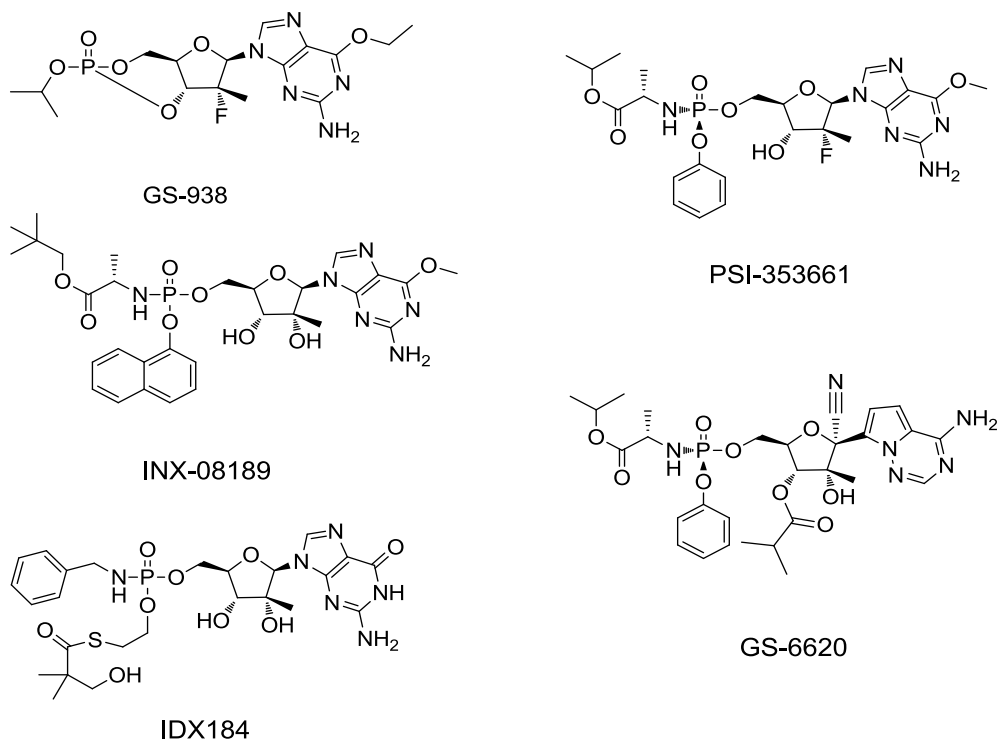
Η σοφοσμπουβίρη (sofosbuvir, GS-7977 ή PSI-7977) αποτελεί σήμερα τον πιο προηγμένο αναστολέα της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV στην κλινική ανάπτυξη (Φάση III). Είναι ένα χειρόμορφο ισομερές της PSI-7851 (Σχήμα 1.9), ένα φωσφοραμιδικό προφάρμακο ενός νουκλεοτιδικού αναλόγου ουριδίνης (μονοφωσφορική β-D-2-δεοξυ-2-φθορο-2-C-μεθυλουριδίνη).³⁹ Έχει

δειχθεί ότι η PSI-7851 υπάρχει ως ένα 1:1 μίγμα δύο διαστερεοϊσομερών, των PSI-7976 και PSI-7977, στο κέντρο του φωσφόρου της φωσφοραμιδικής περιοχής (Σχήμα 1.9). Η PSI-7977, το ισομερές S_p , βρέθηκε να αναστέλλει την αντιγραφή του HCV πιο αποτελεσματικά από την PSI-7976 (R_p ισομερές).



Σχήμα 1.9: Οι δομές του PSI-7851 και των διαστερεοϊσομερών του (S_p και R_p).

Η GS-938 (ή PSI-938, Σχήμα 1.10) είναι το προφάρμακο της μονοφωσφορικής 2'-F-2'-C-μεθυλογουανοσίνης και δημιουργήθηκε για να δρα συνεργιστικά με το νουκλεοτίδιο της πυριμιδίνης, PSI-7977.⁴⁰ Μία νέα προσέγγιση διπλού προφαρμάκου χρησιμοποιήθηκε για να συντεθεί το νουκλεοτιδικό ανάλογο BMS-986094 (INX-08189, Σχήμα 1.10).⁴¹



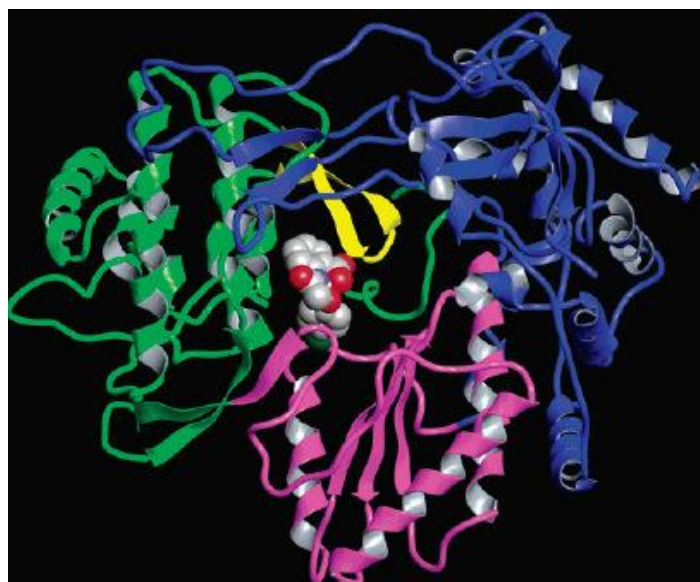
Σχήμα 1.10: Οι δομές των νουκλεοτιδικών αναλόγων γουανοσίνης GS-938, INX-08189, IDX184, και των PSI-353661 και GS-6620.

Το IDX184 αποτελεί ένα διαφορετικό προφάρμακο νουκλεοτιδίου που επίσης σχεδιάστηκε για να μεταβολίζεται και να παρέχει υψηλές συγκεντρώσεις της 2'-C-μεθυλο 5'-μονοφωσφορικής γουανοσίνης στα ηπατοκύτταρα (Σχήμα 1.10).⁴² Άλλοι αναστολείς νουκλεοτιδίων της πολυμεράσης που μελετώνται σήμερα στις Φάσεις I και II των κλινικών δοκιμών, είναι η PSI-353661 (Σχήμα 1.10) που αποτελεί προφάρμακο της μονοφωσφορικής 2'-C-μεθυλογουανοσίνης,⁴³ και το GS-6620 (νουκλεοτιδικό προφάρμακο της C-ανάλογου νουκλεοζίτη, Σχήμα 1.10).⁴⁴

1.3.2 Μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς (NNIs)

Κυρίως μέσω πειραμάτων υψηλής απόδοσης διαλογής, έχουν ταυτοποιηθεί τρεις αλλοστερικές περιοχές δέσμευσης μικρών μορίων στην RNA πολυμεράση NS5B του HCV. Αυτές οι αλλοστερικές περιοχές πρόσδεσης βρίσκονται στα δομικά τμήματα της «παλάμης» και του «αντίχειρα». Μέχρι σήμερα, μόνο στο τμήμα των «δαχτύλων» δεν έχουν εντοπιστεί ξεκάθαρα αλλοστερικές θέσεις πρόσδεσης.

Η αλλοστερική θέση στο τμήμα της «παλάμης» είναι στην ουσία μία ενιαία, μεγάλη και έντονα υδρόφοβη κοιλότητα κοντά στο ενεργό κέντρο της πολυμεράσης (Σχήμα 1.11).



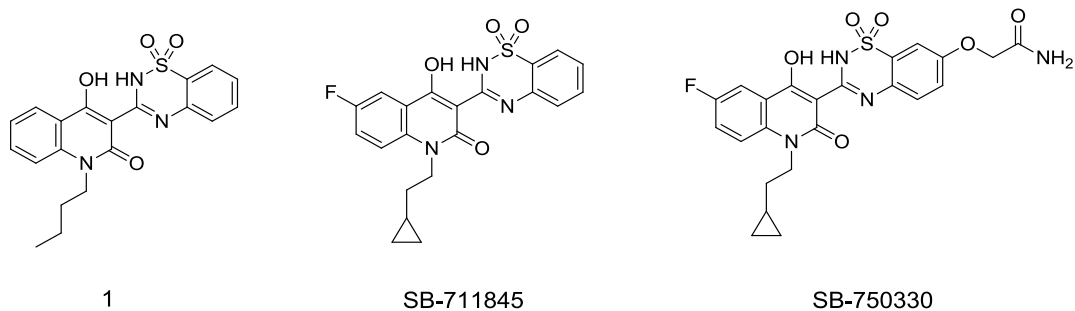
Σχήμα 1.11: Αναπαράσταση της RNA πολυμεράσης NS5B του ιού της ηπατίτιδας C με κορδέλες. Ο αναστολέας είναι προσδεμένος στο αλλοστερικό κέντρο στην περιοχή της παλάμης (ροζ: το τμήμα της παλάμης, πράσινο: το τμήμα του αντίχειρα, μπλε: το τμήμα των δαχτύλων, κίτρινο: ο β-βρόχος).

Πρόκειται για τη μεγαλύτερη περιοχή πρόσδεσης της πολυμεράσης και το σχήμα της μπορεί να αλλάζει ανάλογα με τον τύπο του αναστολέα που προσδένεται σε αυτήν. Από την άλλη, το τμήμα του «αντίχειρα» αποτελείται από δύο επαρκώς καθορισμένες αλλοστερικές θέσεις πρόσδεσης. Οι δύο διακριτές και ξεχωριστές αυτές θέσεις είναι η I (πρώτη), που βρίσκεται κοντά στην αλλοστερική θέση πρόσδεσης της τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP), και η II (δεύτερη), μία υδρόφοβη κυρίως σχισμή, που απέχει περίπου 15 Å από την I.

1.3.2.1 Αναστολείς του τμήματος της «παλάμης»

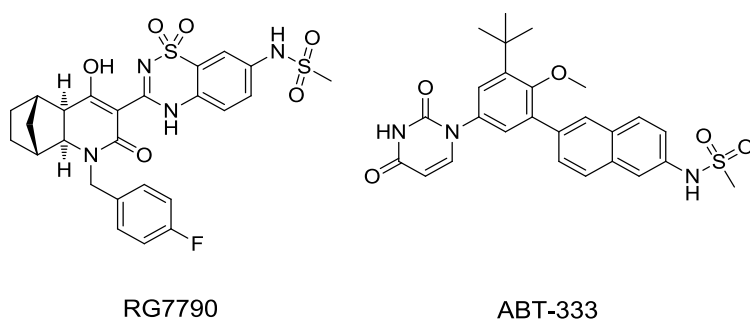
Το μέγεθος της θέσης πρόσδεσης στο τμήμα της «παλάμης» είναι 15 Å και έχει βάθος 20 Å.⁴⁵ Οι διαστάσεις αυτές επιτρέπουν σε μία ευρύτερη ποικιλία χημικών τύπων να δράσουν ως αναστολείς. Οι περισσότεροι αναστολείς που προσδένονται στην περιοχή αυτή παρουσιάζουν δύο σημαντικές αλληλεπιδράσεις με την Tyr448, που βρίσκεται στη i+1 θέση της β-στροφής του βρόχου του «αντίχειρα». Η μία αλληλεπίδραση είναι ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ της -NH ομάδας της κύριας αλυσίδας του αμινοξέος και ενός ατόμου-δέκτη ηλεκτρονίων του αναστολέα, ενώ η δεύτερη φαίνεται να είναι μία π-π αρωματική αλληλεπίδραση μεταξύ πλευρικής αλυσίδας της τυροσίνης και μιας αρωματικής ομάδας του αναστολέα, ή τουλάχιστον μία υδρόφοβη αλληλεπίδραση. Μερικές τάξεις αναστολέων σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με το S της Cys366. Άλλες αλληλεπιδράσεις που έχουν διαπιστωθεί είναι αυτές του αναστολέα με τα αμινοξέα Arg386, Ser387, και Arg394 στην περιοχή της «παλάμης» της πολυμεράσης.

Μία από τις πιο μελετημένες χημικές κατηγορίες μη νουκλεοζιτικών αναστολέων που έχει βρεθεί ότι προσδένονται στην περιοχή της «παλάμης» της πολυμεράσης είναι η κατηγορία των βενζοθειαδιαζινών, με οδηγό την ένωση 1.⁴⁶ Μία αρχική μελέτη σχέσης δομής-δραστικότητας (SAR) με ένωση-οδηγό την 1 (Σχήμα 1.12), οδήγησε σε μία σειρά ενώσεων, με πιο δραστική την SB-711845⁴⁷ και το παράγωγό της, την SB-750330⁴⁸ (Σχήμα 1.12). Οι αναστολείς που βασίζονται στη βενζοθειαδιαζίνη δείχνουν να έχουν ισχυρή δραστικότητα κατά των γονότυπων 1a, 1b και 2a, αλλά πολύ χαμηλότερη δραστικότητα έναντι του γονότυπου 3a.⁴⁶



Σχήμα 1.12: Οι δομές των βενζοθειαδιαζινών ενώσεων 1, SB-711845 και SB-750330.

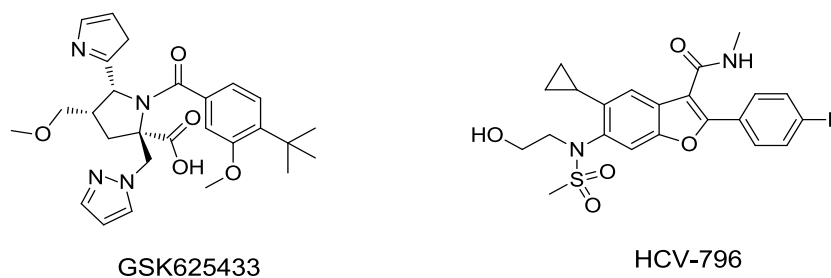
Όπως και οι άλλοι αναστολείς των αλλοστερικών θέσεων πρόσδεσης της πολυμεράσης, έτσι κι αυτές οι ενώσεις αναστέλλουν το ένζυμο πριν την επιμήκυνση του RNA. Η σετρομπαβίρη (setrobunivir, RG7790, αναφερόμενη αρχικά ως ANA598, Σχήμα 1.13) βρίσκεται σήμερα στη Φάση II των κλινικών δοκιμών και χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με την ιντερφερόνη και τη ριμπαβιρίνη στοχεύοντας σε ασθενείς με ηπατίτιδα C με γονότυπο 1.^{49, 50} Οι αναστολείς ABT-333 (Dasabunivir, Σχήμα 1.13) και ABT-072 (η δομή δεν είναι διαθέσιμη στη βιβλιογραφία) έχουν μελετηθεί *in vitro* και σε κλινικές δοκιμές Φάσης I. Ο συνδυασμός του ABT-333 ή του ABT-072 με κοκτέιλ των δύο ενώσεων PEG-IFN-α-RBV οδήγησε σε σημαντικά μεγαλύτερη αντι-ϊική δράση σε ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία μόνο με το κοκτέιλ των δύο ενώσεων PEG-IFN-α-RBV.⁵



Σχήμα 1.13: Οι δομές των RG7790 και ABT-333.

Οι ακυλοπυρρολιδίνες είναι μία ακόμα κατηγορία ενώσεων που προσδένονται στην αλλοστερική θέση στο υποτιμήμα της «παλάμης» της πολυμεράσης.⁵² Η δραστηριότητα των ακυλοπυρρολιδινών επηρεάζεται από τη μετάλλαξη M414T.⁵³ Η GSK625433 (Σχήμα 1.14) είχε προχωρήσει σε κλινικές δοκιμές Φάσης I, αλλά αυτή η μελέτη διεκόπη λόγω των ανεπιθύμητων επιδράσεων που σημειώθηκαν σε μελέτες μακροχρόνιας καρκινογένεσης σε ποντίκια.⁵⁴

Μια κατηγορία βενζοφουρανίων ταυτοποιήθηκαν ως ισχυροί αναστολείς της *in vitro* αντιγραφής του HCV (Σχήμα 1.14).⁵⁵ Η HCV-796 έδειξε σημαντική δραστηριότητα σε κλινικές δοκιμές σε πρώιμο στάδιο.⁵⁶ Παρ' όλα αυτά, η ανάπτυξη του HCV-796 διακόπηκε, επειδή ανιχνεύθηκαν αυξημένα ηπατικά ενζυμικά επίπεδα σε ορισμένους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αυτόν τον παράγοντα.



Σχήμα 1.14: Οι δομές των GSK625433 και HCV-796.

Μέχρι και σήμερα δεν έχουν σταματήσει οι προσπάθειες αναζήτησης και άλλων κατηγοριών αναστολέων που δρουν στο τμήμα της «παλάμης» της πολυμεράσης, όπως είναι η κατηγορία των ακρυλικών οξέων, των ισοθειαζολών και των α,γ-δικετο οξέων.⁵⁷⁻⁵⁹

1.3.2.2 Αναστολείς του τμήματος του «αντίχειρα»

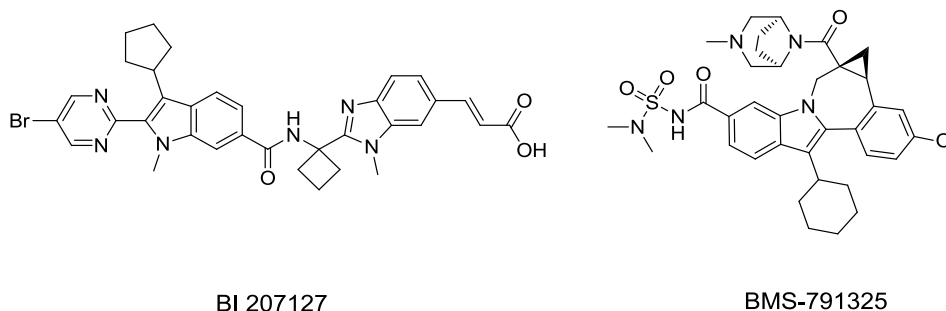
A. Αναστολείς του τμήματος του «αντίχειρα» I

Η περιοχή πρόσδεσης του «αντίχειρα» I βρίσκεται 30 Å μακριά από το ενεργό κέντρο της πολυμεράσης. Οι αναστολείς αυτής της περιοχής δεσμεύονται σε θέσεις που συνήθως καταλαμβάνονται από τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Leu30 και Leu31. Αυτή η κατηγορία αναστολέων εμποδίζει τις ενδομοριακές επαφές του «αντίχειρα» και του βρόχου του άκρου των «δαχτύλων», εμποδίζοντας έτσι και τον σχηματισμό ενός παραγωγικού πολύπλοκου ενζύμου για τη σύνθεση του RNA. Για τον λόγο αυτόν, οι παράγοντες αυτοί είναι επίσης γνωστοί και ως αναστολείς «βρόχου δαχτύλου» και διαθέτουν κοινό πυρήνα βενζιμιδαζολίου ή ινδολίου.^{60, 61}

Η βελτιστοποίηση της κυτταρικής διαπερατότητας με τη μετατροπή του βενζιμιδαζολικού σκελετού στον περισσότερο λιπόφιλο σκελετό ινδολίου προέβλεψε περαιτέρω ενίσχυση της αντι-ιικής δραστηριότητας, οδηγώντας τελικά σε κλινική αντι-HCV δραστηριότητα.⁶²⁻⁶⁶ Αξιοσημείωτο είναι ότι οι

παράγοντες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία των NNIs εμφανίζουν μειωμένη δραστικότητα κατά του γονότυπου 1a του HCV σε σύγκριση με τον γονότυπο 1b.^{63, 65, 67} Διάφοροι αναστολείς που βασίζονται στο ινδόλιο (BI 207127, TMC647055 και BMS791325) βρίσκονται στο στάδιο διερεύνησης των κλινικών δοκιμών.^{62, 64, 65, 68}

Ο πιο προηγμένος αναστολέας αυτής της κατηγορίας είναι η ντελεομπαβίρη/BI 207127 (deleobunvir, Σχήμα 1.15). Βρίσκεται στη φάση II των κλινικών δοκιμών. Ο BI 207127 σε συνδυασμό με PEG-IFN-α και RBV έχει αποδειχθεί ότι έχει ισχυρή αντι-ιική δράση, με ένα ευνοϊκό προφίλ ασφάλειας και ανεκτικότητας.⁶⁸ Ένας άλλος αναστολέας του τμήματος του «αντίχειρα» I είναι το BMS-791325 (Σχήμα 1.15).



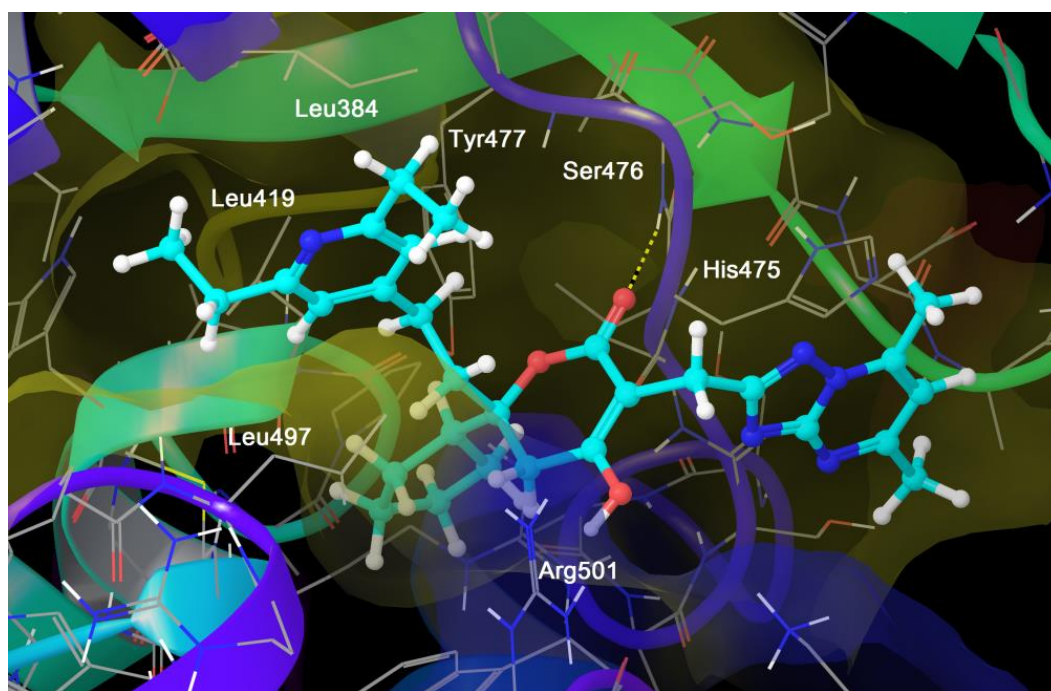
Σχήμα 1.15: Οι δομές των BI 207127 και BMS-791325.

B. Αναστολείς του τμήματος του «αντίχειρα» II

Παράγωγα του θειοφαινο-καρβοξυλικού οξέος αναφέρθηκαν να αναστέλλουν τη λειτουργία της πολυμεράσης NS5B και της αντιγραφής του RNA του HCV. Κρυσταλλογραφικές μελέτες ανακάλυψαν την ύπαρξη μιας υδρόφοβης κοιλότητας που βρίσκεται στη βάση του τμήματος του «αντίχειρα» της NS5B.⁶⁹ Όπως και οι NNIs του τμήματος του «αντίχειρα» I, έτσι και τα παράγωγα θειοφαινο-καρβοξυλικού οξέος είναι μη ανταγωνιστικά της ενσωμάτωσης του νουκλεοτιδίου, καθώς αναστέλλουν ένα βήμα έναρξης για τη σύνθεση του RNA, παρεμβαίνοντας με διαμορφωτικές αλλαγές. Η λομιμπαβίρη/VX-222 (Iomibunvir) παρουσιάζει μικρή (μM) αντι-ιική δραστικότητα κατά των HCV 1a και 1b χρησιμοποιώντας τη μέθοδο με τα αντίγραφα της αρχικής αντιγραφής (ρεπλικόνια, replicons).⁷⁰

Εκτός από τα παράγωγα των θειοφαινο-καρβοξυλικών οξέων, έχουν εντοπιστεί και άλλες κατηγορίες μορίων που στοχεύουν σε αυτή την

πολυμεράσης που έχουν καταχωρηθεί στην Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων είναι αυτές που έχουν συγκρυσταλλωμένο μη νουκλεοζιτικό αναστολέα (NNI). Αρκετές από αυτές παρουσιάζουν υψηλή ανάλυση (resolution), ενώ τα περισσότερα πειράματα ακτίνων Χ (X-ray) εκτελέστηκαν με τον γονότυπο 1b του HCV. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι κρυσταλλογραφικές μελέτες με κωδικούς 2FVC⁴⁶ και 2GIQ⁴⁷ της πολυμεράσης με τους αναστολείς των βενζοθειαζινών που έχουν προσδεθεί στην αλλοστερική περιοχή της «παλάμης». Ακόμη, ο προαναφερθείς αναστολέας HCV-796 δεσμεύεται σε δύο διαφορετικές απομονώσεις του γονότυπου 1b του HCV (Con1 και BK) στις κρυσταλλογραφικές μελέτες με κωδικούς 3FQL⁷⁷ και 3FQK.⁷⁷ Τέλος, η κρυσταλλογραφική μελέτη της PDB με κωδικό 3FRZ⁷¹ αναπαριστά την πρόσδεση της φιλιμπαβίρης/PF-00868554 στο υποτομήμα του «αντίχειρα» II της πολυμεράσης NS5B του HCV (Σχήμα 1.17).



Σχήμα 1.17: Μοριακή πρόσδεση της φιλιμπαβίρης στο τμήμα του «αντίχειρα» II της RNA πολυμεράσης NS5B του HCV.

1.5 Επίλογος

Μετά από 27 χρόνια από την ανακάλυψη του ιού της ηπατίτιδας C ως νέο παθογόνο για τον ανθρώπινο οργανισμό, μόνη εγκεκριμένη θεραπεία της ασθένειας παραμένει ο συνδυασμός πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης-α και ριμπαβιρίνης. Καθώς αυτή η διπλή θεραπεία σχετίζεται με σοβαρές

παρενέργειες και δεν επωφελούνται όλοι οι ασθενείς, πρόσφατα, σημειώθηκε πρόοδος στην ανάπτυξη φαρμάκων που στοχεύουν ειδικά στις πρωτεΐνες του HCV. Σημαντικό στόχο αποτελεί η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού που είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του. Οι μέχρι τώρα προσπάθειες ανάπτυξης αναστολέων με στόχο την πολυμεράση του ιού δίνουν ελπίδες για τη θεραπεία της ασθένειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

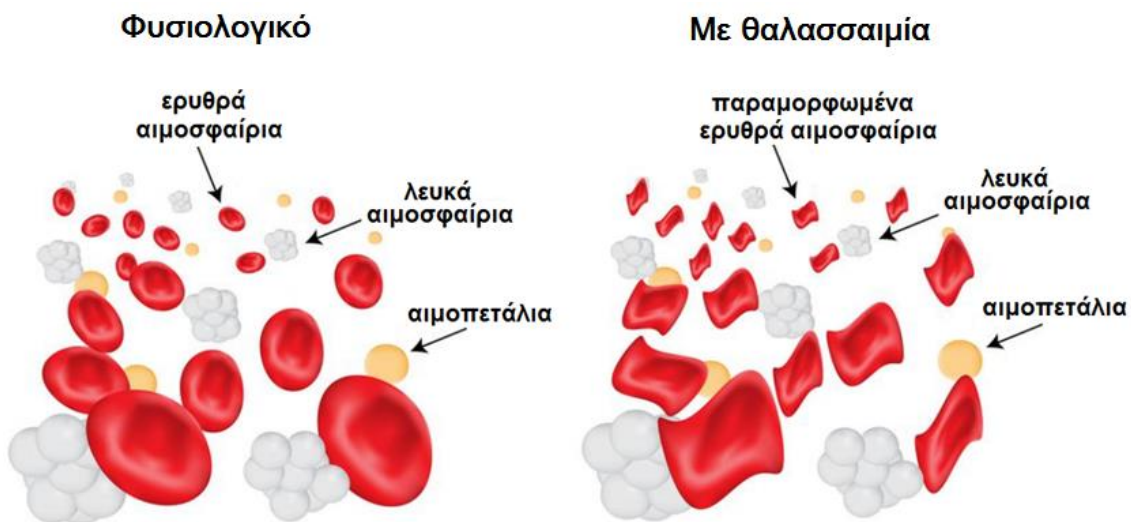
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΑΝΑΙΜΙΑ (β-ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ)

2.1 Γενικά για τη β-θαλασσαιμία

Η μεσογειακή αναιμία ή β-θαλασσαιμία*, όπως έχει επικρατήσει να ονομάζεται τα τελευταία χρόνια σε διεθνές επίπεδο, είναι μια κοινή διαταραχή του αίματος που απαντάται σε όλο τον κόσμο. Τα άτομα που πάσχουν από τη νόσο δεν μπορούν να συνθέσουν τη φυσιολογική μορφή της αιμοσφαιρίνης (Hb), η οποία μεταφέρει το οξυγόνο στους ιστούς και αποτελεί βασικό συστατικό του αίματος. Η φυσιολογική μορφή της αιμοσφαιρίνης αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο α και δύο β αλυσίδες (σφαιρίνες) σε ένα τετραμερές. Οι πάσχοντες από β-θαλασσαιμία παράγουν μειωμένη τη β-σφαιρίνη.

Πιο συγκεκριμένα, η διαταραχή αυτή μειώνει την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης και είναι εξειδικευμένη σε σοβαρές κληρονομικές μεταλλάξεις στη δομή της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, ή σε διαταραχές στη σύνθεσή της.^{78, 79} Σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία, η ανισορροπία στη σύνθεση των β-αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης οδηγεί σε καθίζηση περίσσειας αδρανών α-αλυσίδων μέσα στα ερυθροκύτταρα, σε σημεία στο εσωτερικό και εξωτερικό του μυελού, ενώ σχηματίζονται μικρά, ευαίσθητα ερυθρά αιμοσφαίρια που αδυνατούν να μεταφέρουν επαρκώς το οξυγόνο και καταστρέφονται εύκολα (Σχήμα 2.1). Ως εκ τούτου, συμπεραίνεται ότι η παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας έχει δύο σκέλη: (α) τη μειωμένη πλήρωση των ερυθροκυττάρων με αιμοσφαιρίνη, και (β) τη δημιουργία των καταστροφικών εγκλείστων από την περίσσεια ελεύθερων α-αλυσίδων. Η νόσος ταξινομείται ως β⁰, όταν η σύνθεση της β-σφαιρίνης αναστέλλεται ολοσχερώς, β⁺, όταν η σύνθεση μειώνεται σοβαρά και β⁺⁺, όταν η σύνθεση μειώνεται ήπια. Έχουν περιγραφεί τρεις κύριοι τύποι της νόσου: η ελάσσω, η ενδιάμεση, και η μείζων.

*Σε ιατρικά βιβλία η θαλασσαιμία εμφανίζεται και με άλλες ονομασίες, όπως β-ομόζυγος θαλασσαιμία, β-μείζονα θαλασσαιμία, μεσογειακή αναιμία ή αναιμία του Cooley (Cooley's anaemia, 1928).

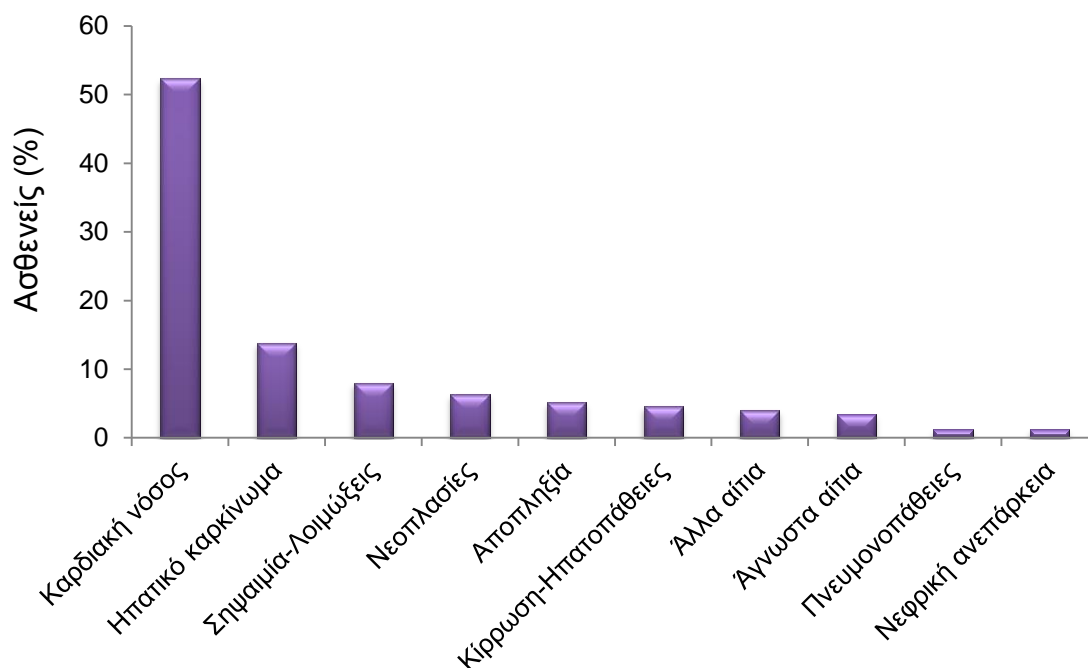


Σχήμα 2.1: Η παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας.

Χιλιάδες βρέφη με μεσογειακή αναιμία γεννιούνται κάθε χρόνο, καθώς κληρονομείται και από τους δύο γονείς που είναι φορείς της νόσου. Η μεσογειακή αναιμία εμφανίζεται συχνότερα σε ανθρώπους από τις χώρες της Μεσογείου, τη Βόρεια Αφρική, τη Μέση Ανατολή, την Ινδία, την Κεντρική και τη Νοτιοανατολική Ασία. Στην Ελλάδα (και κυρίως στην Κρήτη) και την Κύπρο, τα ποσοστά υγιών φορέων είναι από τα υψηλότερα στον κόσμο, και επομένως η νόσος συγκαταλέγεται ως σοβαρό κλινικό πρόβλημα. Υπολογίζεται, ότι 240 εκατομμύρια άτομα σε όλο τον κόσμο είναι ετερόζυγα για μεσογειακή αναιμία, ενώ περίπου 200.000 ετησίως είναι οι ομοζυγώτες.

Η νόσος, χωρίς μια αυστηρή θεραπευτική αγωγή, είναι θανατηφόρα και μέχρι στιγμής ανίατη, με εξαίρεση λίγα άτομα που έχουν ιστοσυμβατό συγγενή δότη αιμοποιητικών κυττάρων, ώστε να μπορούν να επωφεληθούν μιας μεταμόσχευσης. Η παρούσα αγωγή που ακολουθείται είναι η τακτική μετάγγιση αίματος και η αποσιδήρωση, δηλαδή η αφαίρεση του σιδήρου που συσσωρεύεται από τις μεταγγίσεις, και μπορεί να βλάψει ζωτικά όργανα (καρδιά, ήπαρ, ενδοκρινείς αδένες). Μάλιστα, παλαιότερα το συχνότερο αίτιο θανάτου όσων έπασχαν από μεσογειακή αναιμία ήταν η καρδιακή ανεπάρκεια (Σχήμα 2.2), ενώ αντισώματα του ιού της ηπατίτιδας C έχουν βρεθεί σε μεγάλο ποσοστό των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών.^{80, 81} Πιο συγκεκριμένα, αντισώματα του HCV έχουν βρεθεί σε ποσοστό 85% των πολυμεταγγιζόμενων ασθενών με β-θαλασσαιμία στην Ιταλία, 23% στο Ηνωμένο Βασίλειο, 35% στις Ηνωμένες Πολιτείες, 34% στη Γαλλία και 21%

στην Ινδία.⁸⁰ Αυτό το γεγονός οφείλεται στο ότι τα πολυμεταγγιζόμενα άτομα είναι πιο επιρρεπή σε τέτοιου είδους ιογενείς λοιμώξεις, όπως στον ιό της ηπατίτιδας Β και C, και του HIV. Στην Ελλάδα, τονίζεται πως η αφαίρεση του σιδήρου μπορεί να χαρίζει τη ζωή, αλλά εν τούτοις παραμένει μια δύσκολη και δαπανηρή τεχνική. Ως εκ τούτου, η ανακάλυψη φαρμακευτικών μορίων ενάντια σε αυτή τη νόσο κρίνεται αναγκαία.



Σχήμα 2.2: Αιτίες θνησιμότητας θαλασσαιμικών ασθενών στην Ελλάδα (Ελληνικό Εθνικό Αρχείο Καταγραφής 2000–2010).⁸¹

2.2 Θεραπευτική αντιμετώπιση της β-θαλασσαιμίας

Μέχρι σήμερα, η β-θαλασσαιμία θεραπεύεται εν μέρει με τακτικές μεταγγίσεις αίματος, την αποσιδήρωση, και με την αντιμετώπιση δευτερογενών συμπτωμάτων. Η μεταμόσχευση μυελού αποτελεί τη μοναδική ριζική θεραπεία, ενώ η γονιδιακή θεραπεία βρίσκεται ακόμα σε ερευνητικό στάδιο.

2.2.1 Μεταγγίσεις

Ο βασικός τρόπος αντιμετώπισης της αναιμίας είναι οι μεταγγίσεις αίματος (συμπυκνωμένων ερυθρών). Περισσότερες και πιο συχνές μεταγγίσεις απαιτούνται στις σοβαρές μορφές β-θαλασσαιμίας, πιθανόν κάθε λίγες εβδομάδες. Ακόμη, ταχτικές μεταγγίσεις απαιτούνται σε απότομη πτώση αιμοσφαιρίνης, όπως κατά τη διάρκεια λοιμώξεων, μετά από χειρουργικές

επεμβάσεις και κατά την εγκυμοσύνη. Πριν ξεκινήσουν οι μεταγγίσεις, απαραίτητο είναι να γίνει εκτενής φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των ερυθροκυττάρων.

2.2.2 Αποσιδήρωση

Οι ταχτικές μεταγγίσεις αίματος προκαλούν συσσώρευση του σιδήρου στο αίμα (αιμοσιδήρωση). Στη β-θαλασσαιμία παρατηρείται αυξημένη απορρόφηση σιδήρου και από το πεπτικό σύστημα. Ο σίδηρος οδηγεί σταδιακά στην καταστροφή των κυττάρων, με αποτέλεσμα τη λειτουργική ανεπάρκεια ζωτικών οργάνων (όπως καρδιά, ήπαρ). Δυστυχώς δεν υπάρχουν φυσιολογικοί μηχανισμοί για την αποβολή του σιδήρου στο αίμα, κι έτσι η θεραπεία με χηλικούς παράγοντες δέσμευσης του σιδήρου αποτελεί τη μόνη μέθοδο για να μειωθεί ή να διατηρηθεί σταθερό το φορτίο σιδήρου στον οργανισμό ασθενών με β-θαλασσαιμία. Η δεσφεριοξαμίνη (Desferrioxamine ή Desferal, DFO) ήταν η πρώτη χηλική ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την αποσιδήρωση και έχει εφαρμοσθεί για μακρό χρονικό διάστημα με υποδόρια έγχυση με χρήση ειδικής αντλίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ενδοφλέβια σε ισχυρότερες δόσεις. Σήμερα είναι διαθέσιμοι και οι δια του στόματος χηλικοί παράγοντες αποσιδήρωσης, δεφεριπρόνη (Deferiprone, Ferriprox)⁸² και δεφερασιρόξη (Deferasirox, Exjade).^{83, 84} Μάλιστα, η συνδυαστική θεραπεία αποσιδήρωσης με δεσφεριοξαμίνη και δεφεριπρόνη εφαρμόζεται σήμερα ως η πλέον αποτελεσματική. Η δεφεριπρόνη έχει την ικανότητα να απομακρύνει τον σίδηρο κυρίως από την καρδιά, ενώ σε συνδυασμό με το desferal δρα συνεργικά και αποβάλλει τον σίδηρο και από τα άλλα όργανα. Το exjade έχει εγκριθεί ως μονοθεραπεία πρώτης γραμμής στη μείζονα θαλασσαιμία σε περισσότερες από 70 χώρες παγκοσμίως, συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (2005) και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2006). Συμπερασματικά, με την πάροδο του χρόνου είναι σαφής η βελτίωση της επιβίωσης από τη β-θαλασσαιμία, για αυτό και δεν σταματάει η εξέλιξη στη θεραπεία αποσιδήρωσης προς όλο και ισχυρότερους χηλικούς παράγοντες και καλύτερης εκτίμησης του φορτίου του σιδήρου στο αίμα (Σχήμα 2.3).



Σχήμα 2.3: Η εξέλιξη στη θεραπεία αποσιδήρωσης.

2.2.3 Επαγωγείς της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης

Η ανθρώπινη ερυθρολευχαιμική κυτταρική σειρά K562, που απομονώθηκε από έναν ασθενή με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (CML)^{85, 86} σε βλαστική κρίση και χαρακτηρίστηκε από τους C.B Lozzio και B.B Lozzio,⁸⁷ έχει την ικανότητα να υπερεκφράσει το γονίδιο της γ- αλλά όχι της β-σφαιρίνης. Η διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων K562 σχετίζεται με την αύξηση στην έκφραση των γονιδίων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, όπως των γονιδίων της ζ-, ε-, και γ-σφαιρίνης.⁸⁸ Αυτό το χαρακτηριστικό καθιστά τα κύτταρα K562 ένα ευρέως χρήσιμο μοντέλο κυτταρικής σειράς *in vitro* για τη μελέτη ενώσεων που είναι δυνητικοί επαγωγείς της γ-σφαιρίνης για χρήση τους στη δρεπανοκυτταρική νόσο (SCD), καθώς και για τη μελέτη του μοριακού μηχανισμού(-ών) που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων της ανθρώπινης εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στη β-θαλασσαιμία.⁸⁹

Η φαρμακολογική επανενεργοποίηση του γονιδίου της γ-σφαιρίνης είναι μια ελκυστική θεραπευτική στρατηγική για τη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας και της SCD. Η αυξημένη παραγωγή του γονιδίου της γ-σφαιρίνης μπορεί να βελτιώσει τα συμπτώματα της νόσου με τη μείωση του πολυμερισμού της δρεπανοκυτταρικής Hb (HbS) στην SCD, και εν μέρει την υποκατάσταση του μη λειτουργικού γονιδίου της β-σφαιρίνης στη β-θαλασσαιμία, αποκαθιστώντας την ισορροπία μεταξύ α και μη-α αλυσίδων σφαιρίνης.⁹⁰ Έχει αποδειχθεί ότι τα μόρια που επάγουν τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων K562 είναι συχνά σε θέση να ενεργοποιήσουν την έκφραση της γ-σφαιρίνης σε ερυθροειδή πρωτογενή κύτταρα που απομονώνονται από ασθενείς με SCD ή β-θαλασσαιμία.⁹¹ Τα κύτταρα K562 διαφοροποιούνται μέχρι το τελικό στάδιο της ωρίμανσης και χάνουν την ικανότητά τους να πολλαπλασιαστούν.

Η αποκατάσταση της ανισορροπίας παραγωγής α- προς μη-α αλυσίδων της φυσιολογικής αιμοσφαιρίνης μπορεί να γίνει με αύξηση της παραγωγής της γ-αλυσίδας.⁹² Κυτταροτοξικά φάρμακα, παράγοντες ανάπτυξης, και παράγοντες που επάγουν τη διαφοροποίηση είναι γνωστά ως ομάδες παραγόντων που αυξάνουν την παραγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στον άνθρωπο.⁹³ Η ποικιλία των φαρμακολογικών επαγωγικών παραγόντων ομαδοποιούνται σε διάφορες κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων των ερυθροποιητίνης (EPO), βουτυρικού νατρίου, 5-αζακυτιδίνης και υδροξουρίας (HU), θαλιδομίδης κ.α..^{90, 93-95}

Η υδροξουρία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη ουσία για την παραγωγή γ-σφαιρίνης, ενώ αποτελεί φάρμακο επιλογής για την SCD, και άλλες μυελικές κακοήθειες κυρίως ως παρηγορητική θεραπεία για τον έλεγχο του αριθμού των λευκοκυττάρων. Έχει δειχθεί όμως ότι η μακροχρόνια χρήση της μπορεί να προκαλέσει τη σχετική απώλεια της αρχικής ευεργετικής της δράσης.⁹⁶ Ακόμη, αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης επιτυγχάνεται με τη χρήση των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου, ενώ επιθυμητά αποτελέσματα είχαν η 5-αζακυτιδίνη και η θαλιδομίδη.^{93, 97-99} Για την περαιτέρω ενεργοποίηση της ερυθροποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί αυξητικοί παράγοντες ερυθροποίησης, όπως είναι η ερυθροποιητίνη και η δαρβοποετίνη.^{95, 100, 101}

Παρόλο που είναι αρκετά γνωστό ότι οι επαγωγείς της HbF μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανά φάρμακα για την φαρμακολογική θεραπεία της β-θαλασσαιμίας, τα προαναφερθέντα φάρμακα που διατίθενται σήμερα για τον σκοπό αυτόν έχουν περιορισμένη εφαρμογή λόγω της χαμηλής τους αποτελεσματικότητας και εξειδίκευσης, καθώς και των δυνάμει κυτταροτοξικών (καρκινογόνων) επιδράσεών τους. Ως εκ τούτου, κρίνεται άμεσης ανάγκης ο εντοπισμός νέων τύπων παραγόντων που μπορούν να επάγουν την παραγωγή της HbF με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και χαμηλότερη τοξικότητα, και αποτελεί νέο ορίζοντα στη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας.

Η κυτταρική σειρά K562 είναι μια θετική κυτταρική σειρά της CML BCR-ABL και χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό ισχυρών αναστολέων της κινάσης BCR-ABL. Η BCR-ABL είναι μία χιμαιρική πρωτεΐνη, μόνιμως δραστική τυροσινική κινάση που προάγει την επιβίωση και τον

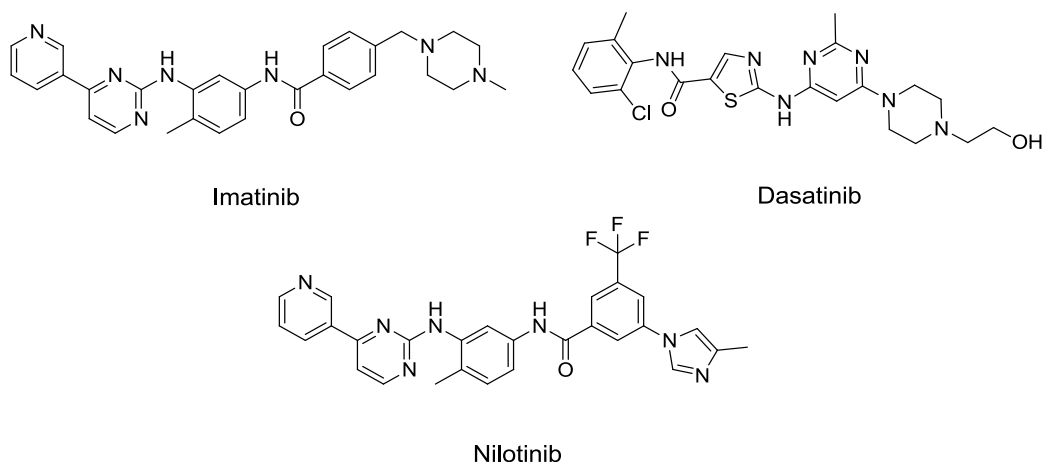
πολλαπλασιασμό σημάτων μέσω πολλαπλών βιοχημικών οδών που βρίσκονται κάτω από αυτή (π.χ. Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K, JAK/STAT) και σχετίζονται με την παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Μεταλλακτική ανάλυση αποκάλυψε ότι η δραστικότητα της κινάσης είναι αναγκαία για τον κακοήγη μετασχηματισμό, καθιστώντας την κινάση BCR-ABL έναν ελκυστικό θεραπευτικό στόχο για τη χρόνια μυελογενή λευχαιμία.^{105, 106}

Αποτελεί ενδιαφέρον ότι, τα θετικά κύτταρα BCR-ABL φαίνονται να είναι ανθεκτικά στην απόπτωση, αλλά η μείωση της δραστικότητας της κινάσης τους τα καθιστά ευαίσθητα στην απόπτωση που επάγεται από χημειοθεραπευτικό φάρμακο.¹⁰⁷ Για τον λόγο αυτόν, πρόσφατες μελέτες προτείνουν μια συνδυασμένη χρήση ενός αναστολέα της BCR-ABL με έναν αντικαρκινικό παράγοντα για τη θεραπεία της CML.^{108, 109} Μια τέτοια συνδυαστική φαρμακευτική αγωγή προσφέρει τη δυνατότητα να μειώσει τη δόση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, και ως εκ τούτου, τυχόν ανεπιθύμητες παρενέργειες που σχετίζονται με τη χρήση τους. Τέτοιοι αναστολείς της BCR-ABL φαίνεται να μπορούν να λάβουν μέρος και ως επαγωγείς της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.

Η μεθανοσουλφονική ιματινίμπη (imatinib, STI571, *Gleevec*, Novartis, Σχήμα 2.4) είναι ο πρώτος και πολύ γνωστός, εδώ και δέκα χρόνια, πρώτης γενιάς αναστολέας της BCR-ABL, ο οποίος ανταγωνίζεται το ATP στο τμήμα της κινάσης BCR-ABL όπου προσδένεται.¹¹⁰ Παρόλο που το imatinib, όπως αναφέρθηκε, είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για τις περισσότερες περιπτώσεις της CML, ένας σημαντικός αριθμός ασθενών εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο φάρμακο.¹¹¹ Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται κυρίως σε μεταλλάξεις εντός της θέσης πρόσδεσης του ATP στο γονίδιο της BCR-ABL που εμποδίζουν την αλληλεπίδραση του imatinib με την περιοχή της κινάσης BCR-ABL.^{111, 112} Οι αναστολείς δεύτερης γενιάς της BCR-ABL είναι επίσης ανταγωνιστές των μορίων ATP και θα μπορούσαν δυνητικά να παρουσιάσουν τα ίδια προβλήματα, όπως η θεραπεία με το imatinib.¹¹³ Επομένως, οι μη-ανταγωνιστές του ATP μπορούν να είναι καλύτεροι υποψήφια φάρμακα για τη θεραπεία της CML.

Για αυτόν τον λόγο πιο πρόσφατα, χρησιμοποιούνται οι αναστολείς δεύτερης γενιάς του imatinib, οι ντασατινίμπη (dasatinib, BMS-354825, *Sprycel*, Bristol

Myers Squibb, Σχήμα 2.4) και νιλοτινίμπη (nilotinib, AMN107, *Tasigna*, Novartis, Σχήμα 2.4). Οι αναστολείς αυτοί είναι δραστικότεροι από το imatinib, έχουν εμφανίσει ταχύτερα αποτελέσματα, ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειες από τη χρήση τους διαφέρουν από αυτές του imatinib,^{114, 115} και κατά συνέπεια, χρησιμοποιούνται με επιτυχία, όταν η θεραπεία με το imatinib δεν μπορεί να δοθεί λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών.



Σχήμα 2.4: Η χημικές δομές των ιματινίμπης, ντασατινίμπης και νιλοτινίμπης.

2.2.4 Σπληνεκτομή

Ο σπλήνας υπερπλάσσεται στους ασθενείς με ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (υπερσπληνισμός). Ο υπερσπληνισμός οφείλεται κυρίως στην υπερλειτουργία του σπλήνα λόγω της καταστροφής μεγάλου αριθμού «ελαττωματικών» ερυθρών αιμοσφαιρίων, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις, κυρίως τα παλαιότερα χρόνια, οφειλόταν σε πλημμελείς μεταγγίσεις. Κατά συνέπεια, οι ασθενείς πολλές φορές μπορεί να χρειαστεί να υποβληθούν σε αφαίρεση του σπλήνα (σπληνεκτομή). Μετά τη σπληνεκτομή, υπάρχει βελτίωση της αναιμίας για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Δεδομένου όμως, ότι η σπληνεκτομή έχει συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα επιπλοκών, όπως θρομβοεμβολικά επεισόδια και πνευμονική υπέρταση, πρέπει να γίνεται μετά από σοβαρό προβληματισμό και εξάντληση άλλων εναλλακτικών τρόπων θεραπείας.¹¹⁶

2.2.5 Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Η μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, ή όπως επιστημονικά ονομάζεται η αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (ΜΑΚ), μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε σοβαρές και επιλεγμένες περιπτώσεις, αποτελώντας τη

μοναδική ριζική θεραπεία της νόσου. Πριν από τη μεταμόσχευση βλαστικών κυττάρων, πρέπει να λαμβάνονται πολύ υψηλές δόσεις φαρμάκων ή ακτινοβολίας για την καταστροφή του παθολογικού μυελού των οστών. Στη συνέχεια, λαμβάνονται εγχύσεις βλαστοκυττάρων από συμβατό δότη. Ωστόσο, επειδή αυτές οι διαδικασίες έχουν σοβαρούς κινδύνους, συμπεριλαμβανομένου του θανάτου, γενικά προορίζονται για τα άτομα με την πιο σοβαρή μορφή της νόσου που έχουν στη διάθεσή τους έναν απόλυτα ταιριαστό δότη μυελού των οστών – συνήθως έναν αδελφό ή αδελφή.

2.2.6 Γονιδιακή θεραπεία

Ως μελλοντικός στόχος για τη ριζική θεραπεία της β-θαλασσαιμίας αποτελεί η γονιδιακή θεραπεία, για την οποία γίνονται συντονισμένες και εκτεταμένες προσπάθειες.

2.3 Επίλογος

Η πρόοδος στη συμβατική θεραπεία έχει βελτιώσει σημαντικά την επιβίωση των θαλασσαιμικών ασθενών. Η θεραπεία με τις μεταγγίσεις και η αποσιδήρωση, παράλληλα με διαρκή πολυπαραμετρικό έλεγχο των ασθενών έχουν ελαττώσει την θνησιμότητα σε μεγάλο βαθμό την τελευταία δεκαετία. Τα καρδιακά αίτια δεν είναι πλέον η μόνη κύρια αιτία θανάτου, αν γίνεται συστηματική και ελεγχόμενη θεραπεία αποσιδήρωσης. Η μεταμόσχευση του μυελού είναι επιτυχής στους νεαρούς ασθενείς με πλήρως συμβατό συγγενή δότη, ενώ η γονιδιακή θεραπεία υπόσχεται λαμπρό μέλλον. Τέλος, η επαγωγή της HbF με νεότερα ασφαλή σκευάσματα αποτελεί εναλλακτική στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση. Το σημαντικότερο όμως συμπέρασμα είναι ότι η ασφαλής μετάγγιση και η θεραπεία αποσιδήρωσης παραμένουν οι ακρογωνιαίοι λίθοι της αντιμετώπισης της θαλασσαιμίας. Ωστόσο, η ενθάρρυνση και ευαισθητοποίηση της κοινής γνώμης σχετικά με τους θαλασσαιμικούς ασθενείς και τα προβλήματά τους μπορεί να αλλάξει την αρνητική στάση απέναντι στη νόσο και να συμβάλει σε σημαντικό βαθμό στη διεξαγωγή προγεννητικού ελέγχου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ

3.1 Η διαδικασία προώθησης ενός φαρμακευτικού σκευάσματος στην αγορά

Η ανάπτυξη ενός φαρμακευτικού σκευάσματος, από τη σύνθεση, το βιολογικό έλεγχο και την προώθηση του στην αγορά είναι μια πολύπλοκη, χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία. Στο περιοδικό *Nature Reviews of Drug Discovery* (Τεύχος Φεβρουαρίου 2007) γράφεται ότι απαιτούνται 800 εκατομμύρια δολάρια για αυτή τη διαδικασία. Αξιοσημείωτο είναι ότι κατά τη διάρκεια όλης αυτής της πορείας ελάχιστα μόνο φαρμακευτικά σκευάσματα μεταβαίνουν με επιτυχία από στάδιο σε στάδιο και τερματίζουν ώστε να προωθηθούν τελικά στην αγορά. Αυτά τα στάδια ελέγχου έχουν καθοριστεί από τον Οργανισμό Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής.

Όταν οι επιστήμονες καταλήξουν σε μια δραστική ένωση, η οποία σε μια ανεπιθύμητη διαταραχή του οργανισμού επιφέρει το επιθυμητό αποτέλεσμα, ξεκινά ο ενδελεχής έλεγχος της ένωσης. Στον έλεγχο αυτόν μελετώνται η φαρμακολογία της και η φαρμακοκινητική και τοξικολογική της δράση.¹¹⁷ Τα πειράματα πραγματοποιούνται σε καλλιέργειες κυττάρων, μικροοργανισμούς αλλά και πειραματόζωα. Οι προκλινικές μελέτες μπορεί να διαρκέσουν χρόνια και πολλές ουσίες μπορεί να παρουσιάσουν ιδιότητες που δεν τις καθιστούν ικανές να χαρακτηριστούν ως φάρμακα και να απορριφθούν. Εφαρμόζονται σε καλλιέργειες κυττάρων (*in vitro*), σε απομονωμένα ένζυμα (*ex vivo*) ή σε πειραματόζωα (*in vivo*).

Εάν μια δραστική ένωση επιτύχει σε όλες τις προκλινικές δοκιμές, δηλαδή αποδειχτεί η μη τοξικότητά της και οι επιθυμητές φαρμακοκινητικές της ιδιότητες, τότε κρίνεται ικανή να μεταβεί στην επομένη φάση, τη φάση των κλινικών δοκιμών. Οι κλινικές μελέτες διεκπεραιώνονται σε τέσσερα διακριτά στάδια (Φάσεις I, II, III, IV), τα οποία είναι τόσο χρονοβόρα όσο και πολυδάπανα και διαρκούν αρκετά χρόνια. Κατά τη διάρκεια των Φάσεων I, II, III η δραστική ένωση δοκιμάζεται σε χιλιάδες ασθενείς αλλά και υγιείς εθελοντές και έχει ως στόχο να αποδειχτεί η αποτελεσματικότητά της, στη

συγκεκριμένη ανεπιθύμητη διαταραχή του οργανισμού για την οποία προορίζεται, καθώς και η ασφάλειά της. Μόνο όταν περάσει με επιτυχία όλες αυτές τις φάσεις θα εισέλθει στην αγορά. Ακόμη και τότε ελέγχονται τυχόν απροσδόκητες παρενέργειες που θα προκύψουν (Φάση IV - φαρμακοεπαγρύπνιση). Επομένως, ένα φάρμακο έχει αυστηρότατες προδιαγραφές για να εγκριθεί αλλά και να διατηρηθεί στην αγορά.¹¹⁸

Ένας τρόπος για να ελαττωθεί το μεγάλο κόστος και ο χρόνος παραγωγής κάποιου φαρμάκου είναι να επιταχυνθεί η διαδικασία ανακάλυψης των χημικών δομών που θα εισέλθουν στις προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Η εφαρμογή του ορθολογικού σχεδιασμού μπορεί να βοηθήσει σε αυτό. Στη δυνατότητα τέτοιας εφαρμογής συνέτειναν οι πρόσφατες ανακαλύψεις σε επιστήμες, όπως αυτές της Συνδυαστικής Χημείας, Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας, Βιοχημείας, Χημειο- και Βιοπληροφορικής, Βιοφυσικής, Υπολογιστικής Χημείας, Μοριακής Μοντελοποίησης και των Μοριακών Γραφικών.¹¹⁸

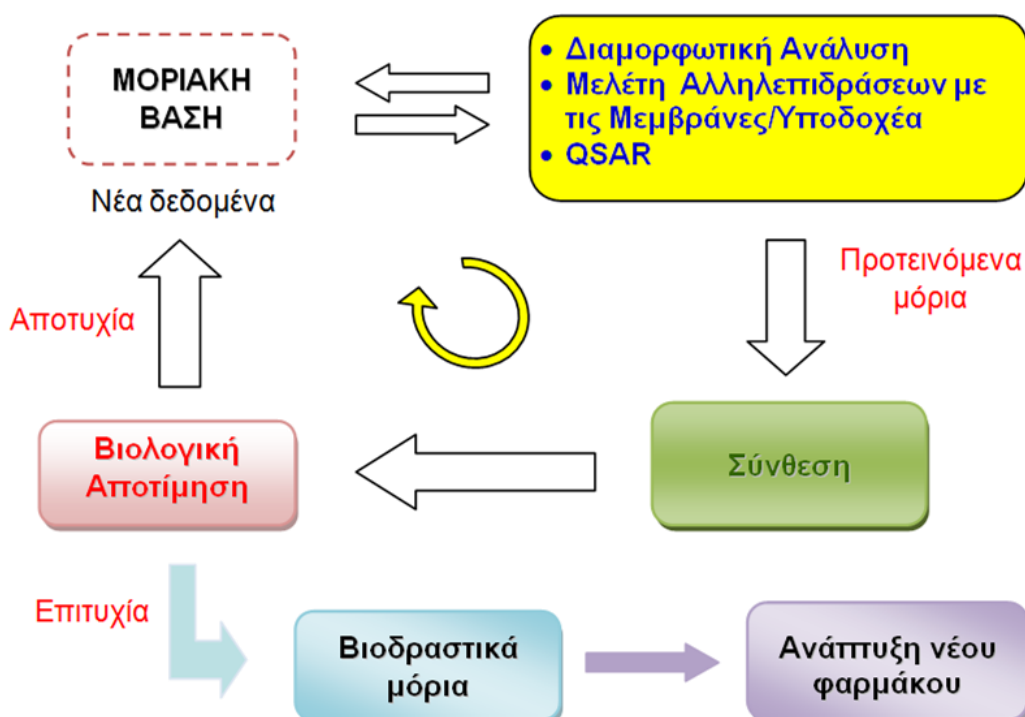
Στις μέρες μας, είναι πολύ γνωστό ότι η Πληροφορική με τη χρήση των υπολογιστών διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην έρευνα και την επιστήμη. Μάλιστα, στον κλάδο ανακάλυψης νέων φαρμάκων, η Πληροφορική διαιρείται σε δύο επιμέρους ενότητες: τη Χημειοπληροφορική (Cheminformatics) και τη Βιοπληροφορική (Bioinformatics). Όμως, με το πέρασμα του χρόνου αυτές οι δύο ενότητες φαίνεται να συνδέονται άρρηκτα μεταξύ τους, καθώς είναι δύσκολο να διακρίνει κάποιος ανάμεσα στα υπολογιστικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται στις συγκεκριμένες περιοχές.

3.2 Μοριακή Μοντελοποίηση

Η Μοριακή Μοντελοποίηση είναι ένας ερευνητικός κλάδος, ο οποίος χρησιμοποιεί γνώσεις Θεωρητικής Χημείας σε συνδυασμό με υπολογιστικές τεχνικές, ώστε να αναπαρασταθεί, να εξηγηθεί και να προβλεφθεί η συμπεριφορά ενός μορίου ή ολόκληρων μοριακών συστημάτων. Η Μοριακή Μοντελοποίηση μπορεί δηλαδή να αποτελέσει μία γέφυρα μεταξύ θεωρίας και πειράματος. Ο ερευνητικός αυτός κλάδος, χρησιμοποιεί πολλές τεχνικές, οι οποίες βρίσκουν πολλές εφαρμογές και συνεισφέρουν στην επίλυση προβλημάτων της Χημικής και Φαρμακευτικής Βιομηχανίας.¹¹⁹

Τα τελευταία 20 χρόνια, ο ερευνητικός αυτός κλάδος ή αλλιώς ο *in silico* ορθολογικός σχεδιασμός βρίσκει ευρεία εφαρμογή στον σχεδιασμό καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων. Ένα πρόσφατο παράδειγμα της εφαρμογής αυτής, σε συνδυασμό με συνθετικές μελέτες αλλά και έλεγχο της δραστηριότητας, αποτελεί το αντιυπερτασικό φάρμακο της αλισκιρένης, γνωστός αναστολέας της ρενίνης.¹²⁰ Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές Μοριακής Πρόσδεσης και στατιστικές αναλύσεις Σχέσεων Δομής-Δράσης, οι οποίες συνεισφέρουν σημαντικά στην ελάττωση του χρόνου και του προσωπικού που θα εμπλακεί στη σύνθεση νέων δυνάμει φαρμακευτικών προϊόντων. Αυτή η χρήση των *in silico* (υπολογιστικών) τεχνικών για να προσδιορισθούν μόρια-οδηγοί ή άλλες χημικές δομές με υποσχόμενη συγκεκριμένη βιολογική δράση καλείται Ορθολογικός Σχεδιασμός Νέων Φαρμακευτικών Μορίων με Εξειδικευμένη Βιολογική Δράση.

Ο Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων (Rational Drug Design) χρησιμοποιείται στο Εργαστήριο μας σε συνδυασμό με τα δεδομένα σύνθεσης των δυνάμει φαρμακευτικών μορίων κατά το ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Τρόπος εφαρμογής του ορθολογικού σχεδιασμού για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων στο εργαστήριο Μοριακής Μοντελοποίησης της Οργανικής Χημείας.

Εκτός από τις *in silico* τεχνικές χρησιμοποιούνται και πειραματικές, όπως χρήση Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) στη μελέτη διαμορφωτικής ανάλυσης σε διάφορα περιβάλλοντα που προσομοιώνουν τα πραγματικά και Βιοφυσικών τεχνικών όπως Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, Διαφορικής Θερμιδομετρίας Διαλογής, Φασματοσκοπία Raman και Ακτίνων Χ για τις μελέτες αλληλεπίδρασης φαρμακευτικών μορίων με τις μεμβράνες.

3.3 Εφαρμογές της Μοριακής Μοντελοποίησης

Με τη χρήση των μεθοδολογιών της Μοριακής Μοντελοποίησης, μπορούν να μελετηθούν οι φυσικές και χημικές ιδιότητες πολλών ενώσεων. Επίσης, μπορούν να δοκιμαστούν *in silico* εκατοντάδες ενώσεις σε σύντομο χρονικό διάστημα για τις αλληλεπιδράσεις τους έναντι κάποιου στόχου. Ο στόχος αυτός θα μπορούσε να είναι ένα ένζυμο, ένας δίαυλος ιόντων, ένα τμήμα της έλικας του DNA ή του RNA ή και ένας υποδοχέας. Είναι δυνατή η ανάπτυξη από ένα υπάρχον φαρμακευτικό μόριο γνωστής μοριακής δομής, το οποίο κυκλοφορεί στο εμπόριο, νέων πιο αποτελεσματικών φαρμακευτικών ενώσεων με λιγότερες ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Συνολικά οι δυνατότητες της Μοριακής Μοντελοποίησης μπορούν να συνοψισθούν στις ακόλουθες:

- ❖ Τριδιάστατη αναπαράσταση της μοριακής δομής των μορίων
- ❖ Χρήση μοριακών γραφικών για τον χειρισμό του μοριακού συστήματος
- ❖ Υπολογισμός και ελαχιστοποίηση της ενέργειας ενός μοριακού συστήματος
- ❖ Διαμορφωτική ανάλυση ενός μορίου
- ❖ Προσομοίωση ενός μοριακού συστήματος
- ❖ Υπολογισμός των μοριακών ιδιοτήτων
- ❖ Υπέρθυση μοριακών συστημάτων
- ❖ Μελέτη πρόσδεσης μορίων σε υποδοχείς (molecular docking)
- ❖ Μελέτη Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (QSAR) φαρμακευτικών μορίων
- ❖ Μελέτη μεταβολικών ιδιοτήτων

Όλες αυτές οι δυνατότητες παρέχονται από λογισμικά πακέτα τα οποία είναι εμπορικά διαθέσιμα αλλά και που διατίθενται δωρεάν (open access). Δύο

προσεγγίσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στον Ορθολογικό Σχεδιασμό είναι αυτές της Μοριακής Πρόσδεσης (Molecular Docking)¹²¹ και των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR).¹²² Οι μεθοδολογίες αυτές χρησιμοποιούνται αυτόνομα ή σε συνδυασμό ανάλογα με το σύστημα που μελετάται.

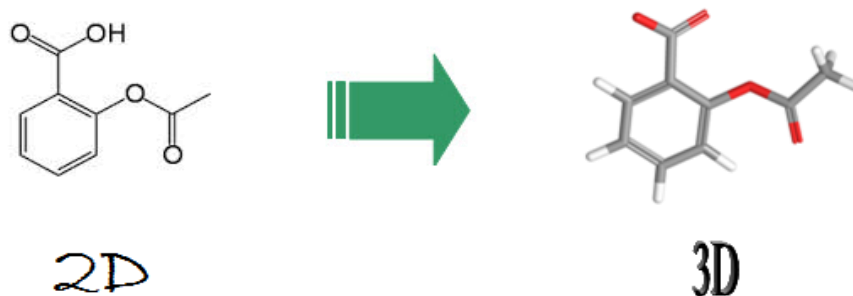
Η διαδικασία μελέτης μορίων τόσο με τη Μοριακή Πρόσδεση όσο με τις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (παράγραφος 3.6) αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια (Σχήμα 3.2):



Σχήμα 3.2: Στάδια μελέτης μορίων που λαμβάνουν μέρος στη μοριακή πρόσδεση ή/και το QSAR.

3.3.1 Σχεδιασμός δομών

Ο σχεδιασμός δομών, αρχικά διδιάστατος (2D) και έπειτα τριδιάστατος (3D) (Σχήμα 3.3) επιτυγχάνεται σταδιακά ή τμηματικά (με χρήση έτοιμων τμημάτων από βάση δεδομένων) με τη χρήση λογισμικών σχεδιασμού. Εάν υπάρχουν κρυσταλλογραφικά δεδομένα για κάποιο μόριο χρησιμοποιείται η δομή αυτή ως εναρκτήριο για την περαιτέρω ανάλυση. Η δόμηση οπτικοποιείται με τη χρήση Μοριακών Γραφικών.



Σχήμα 3.3: Η αυτόματη μετατροπή του μορίου της ασπιρίνης από διδιάστατη μορφή σε τριδιάστατη.

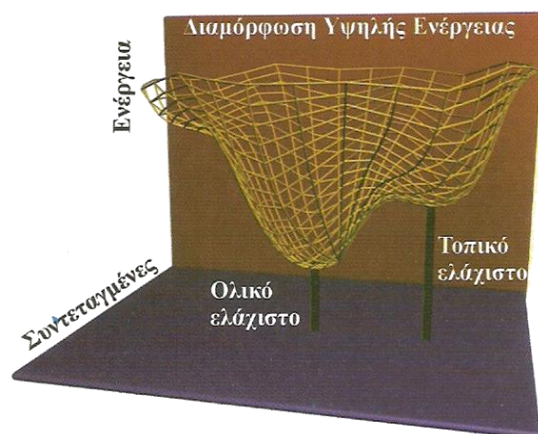
3.3.2 Ελαχιστοποίηση ενέργειας (energy minimization)

Κάθε μοριακό σύστημα περιέχει εσωτερική ενέργεια. Αυτή αποτελείται από δύο συνιστώσες: την κινητική και τη δυναμική. Η κινητική ενέργεια σχετίζεται με τη μάζα, και την ταχύτητα του συστήματος. Η δυναμική ενέργεια σχετίζεται με τη διαμόρφωση του μορίου.

Η δυναμική ενέργεια ενός μορίου είναι συνάρτηση των συντεταγμένων των ατόμων του και της διεύθεσης των ατόμων του. Η διεύθεση ενός ατόμου που αντιστοιχεί στη μικρότερη ενέργεια είναι και η πιο σταθερή.¹¹⁸ Πιο συγκεκριμένα, ένα μόριο N ατόμων προσδιορίζεται από $3N$ καρτεσιανές συντεταγμένες (ή $3N-6$ εσωτερικές), οι οποίες ορίζουν την πολυδιάστατη επιφάνεια της δυναμικής ενέργειας (PES – Potential Energy Surface). Κάθε ένα σημείο της επιφάνειας αντιστοιχεί σε μία διαμόρφωση του μορίου που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη δυναμική ενέργεια. Σε μια επιφάνεια ενέργειας μπορεί να υπάρχουν πολλά ενεργειακά ελάχιστα (τοπικά ελάχιστα). Αυτό που θα αντιστοιχεί στη μικρότερη ενέργεια όλων είναι γνωστό ως το ολικό ελάχιστο (global energy minimum) (Σχήμα 3.4).

Στη Μοριακή Μοντελοποίηση, προκειμένου να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των διευθετήσεων των ατόμων του μορίου (διαμορφώσεις), οι οποίες αντιστοιχούν στα σημεία της επιφάνειας με τη χαμηλότερη ενέργεια, εφαρμόζονται οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας (minimization algorithms). Έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός αλγόριθμων ελαχιστοποίησης της ενέργειας. Το συνηθέστερο κριτήριο επιλογής του καταλληλότερου είναι ο χρόνος που απαιτείται για να προσεγγισθεί το τοπικό

ενεργειακό ελάχιστο. Στους αλγόριθμους αυτούς η εναρκτήρια διαμόρφωση του μορίου, «κατέρχεται» την επιφάνεια ενέργειας και σταματά στο πρώτο ενεργειακό ελάχιστο που «συναντά». Στην παράγραφο 3.3.2.1 αναφέρονται οι ευρέως σε χρήση αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης, οι περισσότεροι από τους οποίους εφαρμόστηκαν στην παρούσα διατριβή.



Σχήμα 3.4: Δυναμική επιφάνεια. Κάθε ένα σημείο της επιφάνειας αντιστοιχεί σε μία διαμόρφωση του μορίου, που χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη δυναμική ενέργεια. (Η εικόνα έχει σχεδιαστεί από τον Δρ. Κ. Παπακωνσταντίνου)

3.3.2.1 Μέθοδοι και αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης της ενέργειας

Η ελαχιστοποίηση της ενέργειας των μορίων είναι μία σημαντική διαδικασία στη μοριακή μοντελοποίηση, καθώς δίνει τις βελτιωμένες μοριακές δομές που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια σε όλους τους μετέπειτα υπολογισμούς. Το MacroModel¹²³ της εταιρίας Schrödinger είναι ένα πρόγραμμα μοριακής μοντελοποίησης με πολλαπλές εφαρμογές και είναι βασισμένο στη θεωρία των πεδίων δυνάμεων μοριακής μηχανικής. Διαθέτει μία μεγάλη επιλογή από πεδία δυνάμεων, αλλά και ένα μεγάλο αριθμό από μεθόδους ελαχιστοποίησης της ενέργειας, επιτρέποντας τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας μιας ευρείας τάξης μοριακών δομών.

Τα πεδία δυνάμεων που είναι διαθέσιμα στο MacroModel είναι τα εξής:

Μοριακής Μηχανικής (MM) MM2*: Όλες οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στο πεδίο δυνάμεων MM2* είναι πανομοιότυπες με αυτές του αυθεντικού πεδίου δυνάμεων MM2 που σχεδιάστηκε από τον Allinger¹²⁴ με τις εξής διαφορές:

- Στην ηλεκτροστατική εξίσωση, όπου στο MM2* χρησιμοποιούνται μερικά φορτία και ο νόμος του Coulomb, ενώ στο MM2 χρησιμοποιούνται δίπολα των δεσμών και η εξίσωση Jeans.
- Στην εξίσωση των κάμψεων εκτός επιπέδου, όπου στο MM2* χρησιμοποιείται μία αντικανονική περιστροφή, ενώ στο MM2 χρησιμοποιείται η απόσταση πυραμιδοποίησης (pyramidalization distance). Η διαφορά είναι σχεδόν ασήμαντη εκτός από τις περιπτώσεις σημαντικής στρέβλωσης των συστημάτων sp^2 .
- Στη μεταχείριση των συζεύξεων, όπου στο MM2* γίνεται με τη χρήση ειδικών όρων στρέψης V1, V2 και V3 για τα διάφορα συζευγμένα συστήματα (conjugated systems), ενώ στο MM2 γίνεται με τη χρήση ενός π υπολογισμού αυτοσυνεπούς πεδίου (Self-Consistent Field, SCF) για ασυνήθιστα συστήματα. Ο όρος στρέψης V1 σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις διπλού-διπλού, ο V2 με τη σύζευξη δεσμού, και ο V3 με τη στερεοχημική ενέργεια.

MM3*: Όλες οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στο πεδίο δυνάμεων MM3* είναι πανομοιότυπες με αυτές του αυθεντικού πεδίου δυνάμεων MM3 που σχεδιάστηκε από τον Allinger *et al.*¹²⁵ εκτός από τις διαφορές που παρουσιάζονται παραπάνω.

Assisted Model Building with Energy Refinement (AMBER)*: 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.¹²⁶ Η μοναδική διαφορά του AMBER* από το αυθεντικό πεδίο δυνάμεων AMBER είναι ότι στο πρώτο χρησιμοποιούνται για τους δεσμούς υδρογόνου ο πρόσφατα σχεδιασμένος από τον Kollman όρος 6,12-Lennard-Jones¹²⁷ και μία βελτιωμένη παράμετρος για τον αμιδικό σκελετό των πεπτιδίων.¹²⁸

Optimized Potentials for Liquid Simulations (OPLS): Όλες οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στο πεδίο δυνάμεων OPLS είναι πανομοιότυπες με αυτές του πεδίου δυνάμεων OPLS/AMBER που σχεδιάστηκε από τον Jorgensen.¹²⁹

AMBER94: Όλες οι εξισώσεις του πεδίου δυνάμεων AMBER94 και οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι πανομοιότυπες με αυτές που

προτείνει ο Kollman και οι συνεργάτες του για το αυθεντικό πεδίο δυνάμεων AMBER.¹²⁶ Οι διαφορές που παρουσιάζει η έκδοση AMBER94 που χρησιμοποιείται από το MacroModel είναι οι εξής:

- Τα μερικά φορτία στο MacroModel προσδιορίζονται από δίπολα δεσμών και όχι ως τιμές φορτίων. Τα μερικά φορτία υπάρχει πιθανότητα να διαφέρουν ελαφρώς μεταξύ των δύο εκδόσεων. Η διαφορά αυτή εντοπίζεται στο πέμπτο δεκαδικό ψηφίο.
- Οι αντικανονικές περιστροφές των ατόμων δεν προσδιορίζονται από το AMBER σε περιπτώσεις μορίων υψηλής συμμετρίας. Το γεγονός αυτό δίνει μερικές φορές μικρές αυξήσεις στην ενέργεια των μορίων ή μικρές διαφορές στη γεωμετρία τους όταν υπολογιστούν από τα δύο πεδία δυνάμεων. Η δημοσίευση που αναφέρεται στο πεδίο δυνάμεων AMBER δίνει δύο τύπους ατόμων αζώτου με διαφορετικές παραμέτρους van der Waals, αλλά στο πρόγραμμα AMBER 4.1 χρησιμοποιείται ένας τύπος παραμέτρων για το άτομο αζώτου. Στο AMBER94 χρησιμοποιούνται οι παράμετροι του προγράμματος AMBER 4.1.

Merck Molecular Force Field (MMFF): Η έκδοση που χρησιμοποιείται στο MacroModel είναι ακριβώς η ίδια που περιγράφεται από τον Halgren.¹³⁰⁻¹³⁶ Το MacroModel παρέχει και τους δύο τύπους πεδίου δυνάμεων MMFF, το MMFF94 και MMFF94s.

OPLS_2001: Το πεδίο δυνάμεων αυτό, 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 εξισώσεις που χρησιμοποιούνται στο OPLS_2001 είναι πανομοιότυπες με αυτές του αυθεντικού πεδίου δυνάμεων OPLS-AA.¹³⁷ Το OPLS_2001 έχει δοκιμαστεί σε μία ευρεία ποικιλία από οργανικά συστήματα και έχει επικυρωθεί η αξιοπιστία των υπολογισμών που προσφέρει για τα συστήματα αυτά. 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 παράμετροί είχαν προσδιοριστεί με ακρίβεια. Με εξαίρεση τη 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,¹³⁸ όλες οι υπόλοιπες παράμετροι του OPLS_2001 είναι με ακρίβεια προσδιορισμένες. 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, βελτίωσαν σημαντικά τις ενέργειες διαμόρφωσης της κυστεΐνης και της μεθειονίνης στις πρωτεΐνες.

OPLS_2005: Το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005 είναι μία ενισχυμένη έκδοση του OPLSAA και παρέχει μεγάλη κάλυψη των απαιτήσεων που έχουν οι λειτουργικές ομάδες των οργανικών μορίων. Αποτελεί την τελευταία τεχνολογία ανάπτυξη της εταιρίας Schrödinger. Ειδικότερα, όλες οι περιστροφικές παράμετροι μετασκευάστηκαν για να αναπαράγουν τις ενέργειες διαμόρφωσης μορίων, που 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 δίνουν πιο ακριβείς υπολογισμούς.¹³⁸

Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης της ενέργειας που παρέχονται από το MacroModel είναι οι εξής:

Ο αλγόριθμος Polak-Ribiere Conjugate Gradient (PRCG): Ο αλγόριθμος αυτός ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων σύγκλισης και χρησιμοποιεί επίσης τη συνάρτηση πρώτης παραγώγου Polak-Ribiere.¹³⁹ Χαρακτηριστικό του αλγόριθμου αυτού 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.

Ο αλγόριθμος Truncated Newton Conjugate Gradient (TNCG): Ο αλγόριθμος αυτός χρησιμοποιεί μία συνάρτηση δεύτερης παραγώγου για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας και παρουσιάζει μεγάλη επιτυχία στην παραγωγή μοριακών δομών πολύ χαμηλής ενέργειας.¹⁴⁰

Ο αλγόριθμος Oren-Spedicato Variable Metric (OSVM): Ο αλγόριθμος αυτός ανήκει στις μεθόδους μεταβλητής μετρικής (variable metric) και

χρησιμοποιεί την τροποποίηση Oren-Spedicato της μεθόδου Fletcher-Powell quasi-Newton.¹⁴¹ Η ταχύτητα των επαναλήψεων είναι σχετικά χαμηλή. Η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται για μοριακές δομές με πολύ στρεβλωμένη γεωμετρία.

Ο αλγόριθμος Steepest Descent (SD): Η μέθοδος αυτή θα ήταν προτιμότερο να μη χρησιμοποιείται από μόνη της για την ελαχιστοποίηση μοριακών δομών αλλά σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους, καθώς δεν επιτυγχάνεται πλήρης σύγκλιση στο τέλος της ελαχιστοποίησης. Είναι αποτελεσματική, στην ελαχιστοποίηση της ενέργειας μοριακών δομών που σχεδιάζονται με κάποιο σχεδιαστικό λογισμικό και οι οποίες είναι πάρα πολύ μακριά από κάποιο ενεργειακό ελάχιστο, αλλά πρέπει στη συνέχεια να χρησιμοποιείται μια άλλη μέθοδος για περαιτέρω ελαχιστοποίηση της ενέργειας.¹²³

Ο αλγόριθμος Full Matrix Newton Raphson (FMNR): Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική για την πλήρη σύγκλιση μοριακών δομών και χρησιμοποιείται συνήθως σε μεγάλα μοριακά συστήματα.¹²³

Ο αλγόριθμος Low-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (LBFGS): Η μέθοδος αυτή είναι αποτελεσματική σε μεγάλα μοριακά συστήματα.

Το λογισμικό της εταιρίας Tripos κάνει χρήση των αλγορίθμων ελαχιστοποίησης ενέργειας πρώτης τάξης Βαθύτατης Κατάδυσης (Steepest Descent), Βαθμιδωτής Σύζευξης (Conjugated Gradient) και του αλγορίθμου Powell. Με χρήση της μεθόδου που χρησιμοποιείται στον τελευταίο αλγόριθμο δεν υπολογίζεται το ολικό ελάχιστο, αλλά το ελάχιστο που βρίσκεται δίπλα στο σημείο εκκίνησης. Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται συνήθως μετά από κάποια άλλη τεχνική ελαχιστοποίησης στην οποία έχει εντοπιστεί το περίπου σωστό ελάχιστο.

3.4 Επιπλέον εργαλεία προετοιμασίας δομών

Απαραίτητη για τη μοριακή πρόσδεση και ένα βήμα πριν από αυτή αποτελεί η κατάλληλη προετοιμασία τόσο του υποδοχέα όσο και του μορίου που πρόκειται να προσδεθεί. Οι δομές πρέπει να είναι σαφώς προσδιορισμένες, με κατάλληλο τύπο ατόμων και δεσμών, ιοντισμό, ταυτομέρεια και ατομικά

φορτία. Η εταιρία Schrödinger προσφέρει δύο εργαλεία που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία του υποδοχέα όσο και του προσδέτη παρέχοντας υψηλής ποιότητας τριδιάστατες αρχικές δομές για τους υπολογισμούς μοντελοποίησης.

3.4.1 Η εφαρμογή προετοιμασίας πρωτεϊνών (Protein Preparation Wizard)

Οι τριδιάστατες δομές των πρωτεϊνών είναι καταχωρημένες κυρίως στη Βάση Δεδομένων Πρωτεϊνών της Brookhaven ως αρχεία PDB από όπου μπορούν να αντληθούν. Όπως προαναφέρθηκε, τα αρχεία PDB πρέπει πρώτα να προετοιμαστούν καθώς δεν είναι κατάλληλα να χρησιμοποιηθούν ως έχουν σε υπολογισμούς μοντελοποίησης. Ένα τυπικό αρχείο PDB περιέχει πληροφορίες για τα άτομα άνθρακα, οξυγόνου, αζώτου και θείου του υποδοχέα-πρωτεΐνης, για τον προσδέτη, αν φυσικά υπάρχει συγκρυσταλλωμένος με την πρωτεΐνη, για τα μέταλλα σε περιπτώσεις μεταλλοπρωτεϊνών και για τυχόν συμπράγοντες της πρωτεΐνης, καθώς και για τα μόρια νερού (μόνο για το άτομο οξυγόνου). Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι σε μία X-ray κρυσταλλογραφία δεν αποτυπώνονται τα άτομα υδρογόνου και συνεπώς δεν παρέχεται καμία πληροφορία για τον ιοντισμό και την ταυτομέρεια των αμινοξέων, όπως είναι η His, το Asp και το Glu.

Πολλά αρχεία PDB περιέχουν περισσότερες από μία (υπο-)μονάδες της ίδιας πρωτεΐνης και θα ήταν προτιμότερο να διατηρηθεί μόνο η μία για να επιτευχθούν πιο εύκολα και ταχύτερα οι υπολογισμοί. Λόγω της περιορισμένης διακριτικής ικανότητας των πειραμάτων ακτίνων X είναι δύσκολος ο διαχωρισμός μεταξύ της ομάδας -NH και -CO των αμινοξέων, για αυτόν τον λόγο αυτές οι θέσεις πρέπει να ελέγχονται. Στις PDB μοριακές δομές μπορεί να παρατηρηθεί επίσης απουσία πληροφοριών που αφορούν τη σύνδεση των αμινοξέων, η οποία πρέπει να ελέγχεται μαζί με τη σειρά των δεσμών και τα τυπικά φορτία. Όλα τα προηγούμενα προβλήματα μπορούν να λυθούν με την εφαρμογή του Protein Preparation Wizard¹⁴², η οποία παρέχει μία σειρά από αυτοματοποιημένα βήματα για την προετοιμασία των αρχείων PDB παρέχοντας υψηλής ποιότητας τριδιάστατες δομές για τους

υπολογισμούς μοντελοποίησης. Τα αυτοματοποιημένα βήματα που προσφέρονται στην εφαρμογή Protein Preparation Wizard είναι τα εξής:

1. Προσδιορισμός της τάξης των δεσμών (assign bond orders):

Επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός της τάξης των δεσμών των αμινοξέων και ελέγχεται αν υπάρχουν ασύνδετα αμινοξέα στην πεπτιδική αλυσίδα.

2. Προσθήκη ατόμων υδρογόνου (add hydrogens): Προστίθενται όλα τα άτομα υδρογόνου στη μοριακή δομή, τα οποία βοηθούν στον καθορισμό του ιοντισμού και της ταυτομέρειας των αμινοξέων.

3. Έλεγχος μετάλλων (treat metals): Ελέγχεται αν το μέταλλο έχει τον σωστό τύπο ατόμου, τη σωστή γεωμετρία και το σωστό τυπικό φορτίο (formal charge).

4. Έλεγχος των δισουλφιδικών δεσμών (treat disulfides): Ανιχνεύονται, προσδιορίζονται και σε περίπτωση απώλειας προστίθενται δεσμοί μεταξύ ατόμων θείου που απέχουν απόσταση μέχρι 3,2 Å.

5. Ανίχνευση επικαλύψεων (find overlaps): Ανιχνεύονται τα άτομα τα οποία βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη από 0,8 Å και προειδοποιείται ο χρήστης για τον αριθμό των ατόμων αυτών έτσι ώστε να ελεγχθούν και να διορθωθούν.

6. Διαγραφή μορίων νερού (delete waters): Διαγράφονται ολόκληρα μόρια νερού που δεν διαδραματίζουν κανένα ρόλο στη σταθεροποίηση της δομής της πρωτεΐνης ή στην πρόσδεση του προσδέτη. Με την επιλογή αυτή είναι δυνατό να διαγραφούν τα μόρια νερού σε μία απόσταση καθορισμένη (σε Å) από τον χρήστη από κάθε ετερομάδα (heteroatom, Het) της πρωτεΐνης.

7. Δημιουργία ετεροκαταστάσεων (generate Het States): Προσδιορίζεται ο ιοντισμός και η ταυτομέρεια των ετερομάδων. Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιείται η εφαρμογή Erik, η οποία καθορίζει τον ιοντισμό και την ταυτομέρεια των αμινοξέων σε pH = 7.

8. Βελτιστοποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου (optimization of hydrogen bonding network): Βελτιστοποιείται το δίκτυο δεσμών υδρογόνου δίνοντας τον κατάλληλο προσανατολισμό στις ομάδες υδροξυλίου, στα μόρια νερού, στις ομάδες αμιδίου των Asn και Gln και στο ιμιδαζόλιο της His.

9. Διαδικασία βελτιστοποίησης της δομής (optimizing the structure): Το τελικό στάδιο της προετοιμασίας της πρωτεΐνης αποτελεί η ελαχιστοποίηση

της ενέργειας της με χρήση περιορισμών. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται με τη χρήση της εφαρμογής Impref. Πριν ξεκινήσει η διαδικασία ελαχιστοποίησης προσδιορίζεται η τιμή RMSD από την οποία θα επιτραπεί να παρεκκλίνει η ελαχιστοποιημένη δομή από την αρχική δομή. Κατά τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005. Διατίθεται επίσης η επιλογή βελτιστοποίησης μόνο των θέσεων των ατόμων υδρογόνου διατηρώντας τα υπόλοιπα άτομα σταθερά, που είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη.

3.4.2 Η εφαρμογή προετοιμασίας προσδετών (LigPrep)

Η εφαρμογή LigPrep¹⁴³ είναι μία συλλογή εργαλείων μοντελοποίησης για την προετοιμασία υψηλής ποιότητας μεγάλου αριθμού τριδιάστατων μοριακών δομών (high quality 3D structures) ξεκινώντας από διδιάστατες ή τριδιάστατες δομές. Το αποτέλεσμα της εφαρμογής του LigPrep είναι η παραγωγή χαμηλής ενέργειας τριδιάστατων δομών των προσδετών, με κατάλληλη στερεοχημεία και ιοντισμό. Τα βήματα που ακολουθούνται στην εφαρμογή του LigPrep για τα μόρια-προσδέτες είναι τα εξής:

- 1. Μετατροπή δομών από διδιάστατη σε τριδιάστατη μορφή:** Το LigPrep μπορεί να μετατρέψει τη διδιάστατη δομή (μορφής .sdf, smiles κ.α.) σε τριδιάστατη οικείας με το πρόγραμμα μορφής.
- 2. Προσθήκη ατόμων υδρογόνου (add hydrogen atoms):** Το LigPrep εντοπίζει τα άτομα που χρειάζονται προσθήκη ατόμων υδρογόνου για να έχουν συμπληρωμένο σθένος και τα προσθέτει αυτόματα.
- 3. Απομάκρυνση μη επιθυμητών μοριακών δομών (remove unwanted molecules):** Αν υπάρχουν μοριακές δομές που δεν είναι επιθυμητή η μελέτη τους υπάρχει επιλογή με την οποία εντοπίζονται στο LigPrep και απομακρύνονται αυτόματα.
- 4. Ουδετεροποίηση φορτισμένων ομάδων (neutralize charged groups):** Οι φορτισμένες ομάδες πρέπει να εξουδετερωθούν προτού δημιουργηθεί η κατάσταση ιοντισμού. Κατά την εξουδετέρωση στο LigPrep, ιόντα υδρογόνου προστίθενται ή αφαιρούνται.
- 5. Δημιουργία καταστάσεων ιοντισμού (generate ionization states):** Στο LigPrep υπάρχει δυνατότητα αυτόματου προσδιορισμού της κατάστασης ιοντισμού κάθε προσδέτη στο pH που καθορίζεται από τον χρήστη.

6. Δημιουργία ταυτομερών (generate tautomers): Στο LigPrep μπορεί να δημιουργηθούν αυτόματα όλα τα πιθανά ταυτομερή μίας μοριακής δομής και να αποθηκευτούν αυτόματα. Η λειτουργία αυτή είναι ελεγχόμενη από τον χρήστη, ο οποίος μπορεί να επιλέξει ή όχι τη δημιουργία των ταυτομερών ανάλογα αν ενδιαφέρεται να τα μελετήσει.

7. Φιλτράρισμα δομών (filter the structures): Η επιλογή αυτή επιτρέπει το φιλτράρισμα των μοριακών δομών βασισμένο σε κάποια ιδιότητά τους, όπως είναι π.χ. το μοριακό βάρος, η τιμή της οποίας καθορίζεται από τον χρήστη.

8. Δημιουργία εναλλακτικών χειρόμορφων κέντρων (generate alternative chiralities): Η επιλογή αυτή δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας μοριακών δομών όπως εναντιομερών και διαστερομερών τα οποία αποθηκεύονται αυτόματα. Η λειτουργία αυτή είναι ελεγχόμενη από τον χρήστη, ο οποίος μπορεί να επιλέξει ή όχι τη δημιουργία των επιπλέον δομών ανάλογα αν ενδιαφέρεται να τις μελετήσει.

9. Δημιουργία χαμηλής ενέργειας διαμορφώσεων των μη αρωματικών δακτυλίων (generate low-energy ring conformations): Με την εφαρμογή αυτή μπορούν να δημιουργηθούν χαμηλής ενέργειας διαμορφώσεις για μη αρωματικούς δακτυλίους, για τους οποίους η διαμόρφωση δεν είναι γνωστή.

10. Απομάκρυνση των προβληματικών μοριακών δομών (remove problematic structures): Στο σημείο αυτό όλες οι μοριακές δομές οι οποίες δεν μπορούν να υποβληθούν στο τελευταίο στάδιο βελτιστοποίησης της μοριακής τους δομής απορρίπτονται.

11. Βελτιστοποίηση της μοριακής δομής (optimize the geometry): Στο τελικό αυτό στάδιο βελτιστοποιούνται οι μοριακές δομές των προσδετών που πέρασαν όλα τα υπόλοιπα στάδια χρησιμοποιώντας μία περιορισμένη έκδοση του MacroModel.

3.5 Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking)

Μέσω των *in silico* πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης καθίσταται δυνατή η κατανόηση της τοποθέτησης και των αλληλεπιδράσεων που παρατηρούνται κατά την πρόσδεση μιας ένωσης σε ένα μεγαλομόριο-στόχο (υποδοχέας). Υπάρχουν δύο μοντέλα-θεωρίες που εξηγούν την εξειδίκευση της πρόσδεσης μίας ένωσης στο μεγαλομόριο:

A) Το μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς που προτάθηκε από τον E. Fischer το 1894.¹⁴⁴ Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η δομή του ενεργού κέντρου του υποδοχέα είναι τέτοια, ώστε να προσαρμόζεται η ένωση τέλεια στον υποδοχέα, όπως ένα μικρό κομμάτι σε ένα μεγάλο πάζλ.

B) Το μοντέλο της επαγομένης προσαρμογής που προτάθηκε από τον D.E. Koshland το 1958,¹⁴⁵ σύμφωνα με το οποίο πρώτα γίνεται η πρόσδεση της ένωσης στον υποδοχέα και στη συνέχεια οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων της ένωσης και του ενεργού κέντρου συντελούν στην «τέλεια προσαρμογή» (Σχήμα 3.5).



Σχήμα 3.5: Τα δύο μοντέλα που εξηγούν την εξειδίκευση της πρόσδεσης της ένωσης στο μεγαλομόριο - στόχο: το μοντέλο κλειδιού - κλειδαριάς (αριστερά), και το μοντέλο της επαγομένης προσαρμογής (δεξιά). (Η εικόνα έχει σχεδιαστεί από τον Δρ. Κ. Παπακωνσταντίνου)

Μοριακή πρόσδεση ορίζεται η πρόβλεψη της δομής του συμπλόκου, που προκύπτει από την πρόσδεση ενός μορίου προσδέτη (πρόσδεμα) σε ένα μεγαλύτερο μόριο υποδοχέα.¹²¹ Ο προσδέτης μπορεί να είναι όπως ήδη αναφέρθηκε ένα φαρμακευτικό μόριο και το μεγαλομόριο ένα ένζυμο ή τμήμα της έλικας του DNA. Η μοριακή πρόσδεση μικρών μορίων προσδετών στο ενεργό κέντρο υποδοχέων 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 διαφέρει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του. Τρία όμως

βασικά χαρακτηριστικά είναι κοινά σε όλους του αλγόριθμους μοριακής πρόσδεσης:

1. Η ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη,
2. Ο σχηματισμός του συμπλέγματος υποδοχέα-προσδέτη και
3. Η βαθμολόγηση της πρόσδεσης, δηλαδή ο υπολογισμός της ενέργειας πρόσδεσης χρησιμοποιώντας τη συνάρτηση υπολογισμού της ενέργειας πρόσδεσης, η οποία διαφέρει από αλγόριθμο σε αλγόριθμο.

Υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι με τους οποίους χρησιμοποιούνται διαφορετικές παράμετροι (για παράδειγμα δυνάμεις Coulomb και van der Waals, δεσμοί υδρογόνου) ώστε να βαθμολογήσουν το μοτίβο πρόσδεσης διαφόρων υπό μελέτη ενώσεων. Στις παραγράφους 3.5.5 και 3.5.6 περιγράφονται αναλυτικά οι αλγόριθμοι Surfex-Dock και GLIDE που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

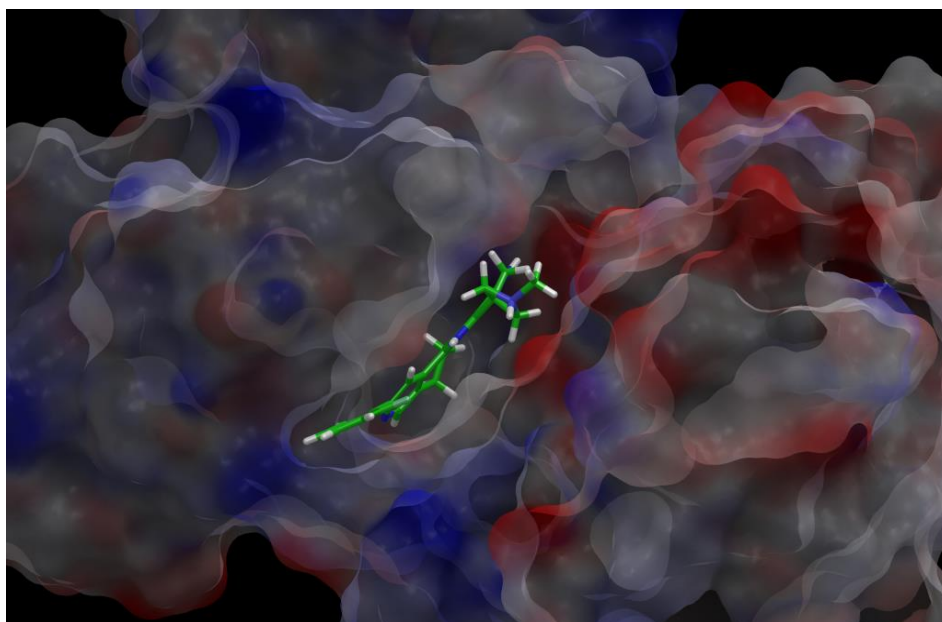
3.5.1 Η ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη

Η διαμορφωτική ανάλυση του προσδέτη, κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης σε ένα υποδοχέα, είναι απαραίτητη διαδικασία, αφού συνήθως δεν είναι γνωστή η διαμόρφωση με την οποία προσδένεται στο ενεργό κέντρο.¹²¹ 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.

3.5.2 Σχηματισμός του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη

Κατά την αλληλεπίδραση του προσδέτη με το ενεργό κέντρο υποδοχέα υπάρχουν πολλοί τοπογραφικοί περιορισμοί.¹²¹ Σε κάθε αλγόριθμο χρησιμοποιείται διαφορετική μεθοδολογία για να τοπογραφηθεί το ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Η διαδικασία της τοπογράφησης εξαρτάται από τον προσδιορισμό των πεδίων τα οποία εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο κάποιου υποδοχέα και τα οποία θα καθορίσουν τις αλληλεπιδράσεις του προσδέτη με αυτό. Η διαδικασία αυτή συνήθως καταλήγει στη δημιουργία ενός αρχείου το

οποίο αποτελεί την υπολογιστική απεικόνιση του ενεργού κέντρου του υποδοχέα. Για παράδειγμα, ο αλγόριθμος Surflex-Dock δημιουργεί το αρχείο «protomol» το οποίο περικλείει όλη την απαραίτητη πληροφορία για το ενεργό κέντρο ενός υποδοχέα, ενώ, αντίστοιχα, ο αλγόριθμος GLIDE δημιουργεί το αρχείο «grid». Οι αλληλεπιδράσεις που εμπλέκονται στη μοριακή αναγνώριση είναι οι ηλεκτροστατικές, οι van der Waals, οι υδρόφοβες, οι δεσμοί υδρογόνου και οι αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις επιστοιβάξης.¹⁴⁶ 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 (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6: Μόριο προσδεμένο στο ενεργό κέντρο υποδοχέα-ενζύμου.

3.5.3 Η ενέργεια πρόσδεσης

Η ενέργεια που χαρακτηρίζει τις αλληλεπιδράσεις ενός προσδέτη με έναν υποδοχέα, ονομάζεται ενέργεια πρόσδεσης και δίνεται από την εξίσωση (1). Η ενέργεια αυτή αποτελεί το άθροισμα των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (EI-Electrostatic Interactions), των επαγωγικών αλληλεπιδράσεων (II-Inductive Interactions), των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (HI-Hydrophobic Interactions) και των συνδυασμένων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων (CII-Combined Intermolecular Interactions) όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου και οι αρωματικές (π-π) αλληλεπιδράσεις επιστοιβάξης μεταξύ των δύο μορίων.

Για τον υπολογισμό της τελικής ενέργειας πρόσδεσης το άθροισμα αυτό ελαττώνεται κατά τον όρο που εκφράζει την απώλεια ενέργειας ή εντροπίας κατά την πρόσδεση υποδοχέα-προσδέτη (E^*).

$$E_{binding} = EEI + EII + EHI + ECII + E^* \quad (1)$$

Ο υπολογισμός της ενέργειας πρόσδεσης, αφού τοποθετηθεί ο προσδέτης στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα, γίνεται με τη χρήση της συνάρτησης υπολογισμού της ενέργειας πρόσδεσης, η οποία διαφέρει από αλγόριθμο σε αλγόριθμο.¹²¹

3.5.4 Αλγόριθμοι μοριακής πρόσδεσης

Ο αριθμός των αλγόριθμων μοριακής πρόσδεσης, που είναι διαθέσιμοι για την εκτίμηση και τον προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέτη είναι μεγάλος. Λόγω του μεγάλου ερευνητικού ενδιαφέροντος συνεχώς αναπτύσσονται νέα λογισμικά που χρησιμοποιούν νέες μεθοδολογίες προσέγγισης.¹⁴⁷ Πολλοί αλγόριθμοι μοιράζονται και κοινές μεθοδολογίες, αλλά ο καθένας συμπεριλαμβάνει καινοτόμες τροποποιήσεις και η ποικιλομορφία τόσο στην πολυπλοκότητα όσο και στην υπολογιστική ισχύ και ταχύτητα παρέχει μία πληθώρα τεχνικών για την αποτελεσματική αντιμετώπιση του σύγχρονου προβλήματος του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων.¹⁴⁸ Υποθέτοντας ότι η μοριακή δομή του υποδοχέα είναι διαθέσιμη, μία αρχική πρόκληση στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων είναι η πρόβλεψη τόσο του προσανατολισμού του προσδέτη μέσα στο ενεργό κέντρο όσο και της συγγένειας πρόσδεσης του σε αυτό (η οποία ποσοτικοποιείται με την ενέργεια πρόσδεσης).¹²¹ Εξαιτίας της αύξησης της υπολογιστικής ισχύος και της απόδοσης των αλγόριθμων μοριακής πρόσδεσης είναι επί του παρόντος δυνατή η μοριακή πρόσδεση χιλιάδων προσδετών και η εικονική διαλογή (virtual screening) των ενώσεων που παρουσιάζουν την ευνοϊκότερη πρόσδεση με σκοπό στη συνέχεια να μελετηθούν πειραματικά για τη δράση τους έναντι της πρωτεΐνης-στόχου.^{149, 150}

3.5.4.1 Συναρτήσεις βαθμολόγησης των αλγόριθμων μοριακής πρόσδεσης

Η συνάρτηση βαθμολόγησης (scoring function) είναι μία γρήγορη προσεγγιστική μαθηματική μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη βαθμολόγηση των μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ προσδέτη-υποδοχέα. Με τη χρήση της συνάρτησης βαθμολόγησης είναι δυνατή η διάκριση των ενεργειακά ευνοϊκών τρόπων πρόσδεσης ενός προσδέτη από τους ενεργειακά μη ευνοϊκούς κατά τη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης. Μία υψηλής ακρίβειας συνάρτηση βαθμολόγησης απαιτεί κατά κανόνα μεγαλύτερη υπολογιστική ισχύ και χρόνο με αποτέλεσμα συχνά η πολυπλοκότητα των συναρτήσεων να ελαττώνεται, με επακόλουθη ελάττωση της ακρίβειάς τους. Οι μέθοδοι βαθμολόγησης συνήθως περιλαμβάνουν πεδία δυνάμεων μοριακής μηχανικής όπως είναι το AMBER,¹⁵¹ το OPLS¹⁵² ή το CHARMM¹⁵³ και εμπειρικές εξισώσεις υπολογισμού της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης¹⁵⁴ ή άλλες.¹⁵⁵

Ένα σημαντικό μειονέκτημα των αλγόριθμων που υπάρχουν επί του παρόντος, είναι ότι δεν μπορούν να υπολογιστούν οι επιδράσεις της επιδιалύτωσης στο υπό μελέτη σύστημα και δεν χρησιμοποιούνται μοντέλα διαλυτών κατά τη διάρκεια της μοριακής πρόσδεσης. Σε όλες της μεθόδους μοριακής πρόσδεσης, η διαδικασία επιτελείται υπό κενό και το σχηματιζόμενο σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη βαθμολογείται στη συνέχεια από την εξίσωση βαθμολόγησης χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η επιδιалύτωση του. Επιπλέον, ο ρόλος των μορίων διαλύτη που βρίσκονται προσδεμένα στην κρυσταλλογραφική δομή του υποδοχέα (συνήθως μόρια νερού) καθώς και ορισμένα ιόντα συχνά δεν λαμβάνονται υπόψη στους υπολογισμούς.

3.5.5 Ο αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης Surflex-Dock

Ο αλγόριθμος Surflex-Dock είναι ένας εμπειρικός αλγόριθμος βαθμολόγησης της πρόσδεσης ενώσεων στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου-στόχου.^{156, 157} Παρέχεται από το λογισμικό πακέτο SYBYL της εταιρίας Tripos. Η χρήση του περιορίζει επιτυχώς τα αποτελέσματα που εμπίπτουν στις περιπτώσεις «ψευδώς θετικά» (false positives) και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για

να βοηθήσει στη διαλογή δραστικών αναστολέων συγκεκριμένων στόχων από βιβλιοθήκες μεγάλου αριθμού ενώσεων.^{158, 159}

3.5.5.1 Protomol

Η χρήση του αλγόριθμου Surflex-Dock επιτρέπει την πραγματοποίηση της πρόσδεσης, αφού οριστεί ο διαμορφωτικός χώρος εντός του ενζύμου, στον οποίο πρόκειται να προσδεθεί η ένωση (Protomol). Το «Protomol» είναι μία υπολογιστική αναπαράσταση του ενεργού κέντρου του υποδοχέα χωρίς αυτό να συνεπάγεται όμως ότι αποτελεί και ένα διαμορφωτικό κλειστό χώρο με καθορισμένα όρια στον οποίο αποκλειστικά μπορεί να γίνει η πρόσδεση. Ο ορισμός αυτού του χώρου βοηθάει στην κατεύθυνση της ένωσης προς την αρχική της τοποθέτηση στο ένζυμο. Η βαθμολόγηση των διαφορετικών διαμορφώσεων της ένωσης γίνεται με βάση την τοποθέτηση τους στο ένζυμο και όχι στα αυστηρά όρια του αρχικού διαμορφωτικού χώρου.

Ο τρόπος με τον οποίο δημιουργείται ο αρχικός διαμορφωτικός χώρος είναι ο εξής.¹⁶⁰ Αρχικά, η επιφάνεια του υποδοχέα θεωρείται ότι καλύπτεται από τρεις τύπους αισθητήρων αλληλεπιδράσεων (probes), η χρήση των οποίων υποδεικνύει περιοχές ύπαρξης δεσμών υδρογόνου και ευνοϊκών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων του ενεργού κέντρου του υποδοχέα. Συγκεκριμένα, περιοχές με παρουσία αισθητήρων μεθανίου (CH_4) καταμετρώνται ως περιοχές στερικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, περιοχές με παρουσία αισθητήρων N-H ως περιοχές δωτών δεσμών υδρογόνου και περιοχές με παρουσία αισθητήρων C=O ως δέκτες δεσμών υδρογόνου. Στη συνέχεια, με τη χρήση μιας συνάρτησης βαθμολόγησης τοποθετούνται και προσανατολίζονται οι αισθητήρες αλληλεπίδρασης με τέτοιο τρόπο ώστε να βελτιστοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις τους με τα άτομα του ενεργού κέντρου του υποδοχέα. Κάθε βαθμολόγηση ενός αισθητήρα αλληλεπίδρασης αντιπροσωπεύει τη συνεισφορά του στην πρόσδεση κάποιου ατόμου του προσδέτη που παρουσιάζει ίδιες ιδιότητες με τον συγκεκριμένο αισθητήρα αλληλεπίδρασης. Στο τέλος, μόνο οι αισθητήρες αλληλεπίδρασης με την ευνοϊκότερη βαθμολόγηση καταμετρώνται για το επόμενο βήμα.

3.5.5.2 Η διαδικασία μοριακής πρόσδεσης

Αφού οριστεί ο διαμορφωτικός χώρος στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα, πραγματοποιείται η τοποθέτηση του προσδέτη. Για την πρόσδεση ευέλικτων προσδετών στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα γίνεται χρήση του αλγόριθμου Surfex-Dock και της μεθόδου Hammerhead. Η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:¹⁵⁷

I. Δημιουργία θραυσμάτων του προσδέτη

Ο προσδέτης χωρίζεται σε θραύσματα (μικρά τμήματα) τα οποία τοποθετούνται με διαφορετικούς συνδυασμούς εντός του ενεργού κέντρου του υποδοχέα ώστε να επιτευχθούν οι τελικοί προσανατολισμοί του προσδέτη. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με την ταυτοποίηση των δεσμών που έχουν τη δυνατότητα να περιστρέφονται, όπως είναι οι απλοί δεσμοί, οι αμιδικοί δεσμοί, οι μη κυκλικοί αλειφατικοί δεσμοί και οι μη τελικοί δεσμοί. Η διαχείριση της ευελιξίας των δακτυλίων είναι προαιρετική στο Surfex-Dock. Στα άτομα μεταξύ δύο δεσμών που έχουν δυνατότητα περιστροφής, αλλά και σε άτομα συνδέσμου (linker atoms) πραγματοποιείται η θραύση του προσδέτη. Στη συνέχεια γίνεται διαμορφωτική ανάλυση των θραυσμάτων. Στο τελικό στάδιο της διαδικασίας, γίνεται ομαδοποίηση των παρόμοιων διαμορφωτικά θραυσμάτων για να δημιουργηθούν τελικά ποικίλα σύνολα θραυσμάτων διαφορετικών διαμορφώσεων.

II. Τοποθέτηση των θραυσμάτων στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα με βάση τους αισθητήρες αλληλεπίδρασης

Αρχικά τοποθετούνται τα διάφορα θραύσματα στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα με βάση τους αισθητήρες αλληλεπίδρασης διατηρώντας σταθερή τη διαμόρφωση τους ενώ απορρίπτονται τα θραύσματα τα οποία εισχωρούν υπερβολικά στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Στη συνέχεια κατατάσσονται τα τοποθετημένα θραύσματα σύμφωνα με τη βαθμολόγησή τους. Τα θραύσματα εκείνα που παρουσιάζουν την υψηλότερη βαθμολόγηση χρησιμοποιούνται στη συνέχεια ως θραύσματα βάσης (head fragments) για την ανοικοδόμηση του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

III. Πρόσδεση των υπόλοιπων θραυσμάτων του προσδέτη

Ξεκινώντας από το θραύσμα βάση του προσδέτη, στο Surfex-Dock τοποθετείται το επόμενο θραύσμα στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα, του οποίου η διαμόρφωση έχει ήδη αναλυθεί. Βελτιστοποιούνται οι προσανατολισμοί και εξακολουθούν να περιορίζονται αυτοί που εισχωρούν υπερβολικά στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Οι ευνοϊκότερες διαμορφώσεις διατηρούνται και αξιολογούνται ώστε να λάβουν τη βαθμολογία πρόσδεσης.

3.5.5.3 Η συνάρτηση βαθμολόγησης

Η εμπειρική συνάρτηση βαθμολόγησης που χρησιμοποιεί ο αλγόριθμος Surfex-Dock αποτελείται από το άθροισμα ενός αριθμού μη γραμμικών συναρτήσεων. Οι συναρτήσεις αυτές εμπλέκουν αποστάσεις των van der Waals επιφανειών μεταξύ κατάλληλων ζευγών ατόμων υποδοχέα-προσδέτη. Τα ζεύγη ατόμων υποδοχέα-προσδέτη, των οποίων η απόσταση της van der Waals επιφάνειάς τους είναι μεγαλύτερη από 2 Å απορρίπτονται. Κάθε άτομο στα ζεύγη ατόμων που απομένουν χαρακτηρίζεται στη συνέχεια ως πολικό ή μη πολικό και του αποδίδεται το κατάλληλο φορτίο. Η συνάρτηση βαθμολόγησης του Surfex-Dock περιλαμβάνει τους ακόλουθους όρους:¹⁶¹

- ✓ **Υδρόφοβος:** Αποτελεί το άθροισμα της ενέργειας των αλληλεπιδράσεων όλων των ζευγών των ατόμων, στα οποία τουλάχιστον το ένα άτομο είναι μη πολικό. Τα άτομα αυτά πρέπει να βρίσκονται σε τέτοια απόσταση, έτσι ώστε οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις τους να είναι ελκτικές και όχι απωστικές.
- ✓ **Πολικός:** Αποτελεί το άθροισμα της ενέργειας των αλληλεπιδράσεων όλων των ζευγών των ατόμων τα οποία είναι πολικά και τα οποία είναι ικανά να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου και σε γέφυρες αλάτων.
- ✓ **Απωστικός:** Αποτελεί το άθροισμα της ενέργειας όλων των ζευγών των πολικών ατόμων των οποίων οι αλληλεπιδράσεις είναι απωστικές.
- ✓ **Εντροπικός:** Είναι μία συνάρτηση, στην οποία μοντελοποιείται η απώλεια εντροπίας μεταφοράς και περιστροφής του προσδέτη που προσδένεται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Στη συνάρτηση αυτή λαμβάνεται υπόψη ο αριθμός των δεσμών του προσδέτη που παρουσιάζουν δυνατότητα περιστροφής και το μοριακό του βάρος.

- ✓ **Επιδιαλύτωση:** Είναι μία συνάρτηση, με την οποία υπολογίζεται η διαφορά μεταξύ των πιθανών δεσμών υδρογόνου που μπορεί να σχηματίσει ο προσδέτης με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα και των πραγματικών δεσμών υδρογόνου στους οποίους συμμετέχει.

Οι πιο κυρίαρχοι όροι της συνάρτησης βαθμολόγησης είναι ο υδρόφοβος και ο πολικός, ενώ ο ρόλος της επιδιαλύτωσης θεωρείται αμελητέος. Η βαθμολόγηση της πρόσδεσης ενός προσδέτη εκφράζεται σε μονάδες $-\log K_d$ και αποδίδει τη συγγένεια πρόσδεσης κάθε προσδέτη που προσδένεται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. *Η σταθερά K_d (dissociation constant) αποτελεί τη σταθερά διάστασης του συμπλόκου υποδοχέα-προσδέτη και όσο μικρότερη είναι, τόσο ευνοϊκότερη θεωρείται η πρόσδεση ενός προσδέτη ή όσο μεγαλύτερος είναι ο αρνητικός λογάριθμος της K_d , τόσο ευνοϊκότερη θεωρείται η πρόσδεση ενός προσδέτη.*

3.5.6 Ο αλγόριθμος μοριακής πρόσδεσης GLIDE

Ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους αλγόριθμους μοριακής πρόσδεσης είναι το GLIDE (Grid-based Ligand Docking with Energetics) του πακέτου λογισμικού Maestro της εταιρίας Schrödinger.¹⁶² Η χρήση του GLIDE επιτρέπει την πρόσδεση μικρών ευέλικτων μορίων στο ενεργό κέντρο υποδοχέα σταθερής διαμόρφωσης και αναζητούνται οι ευνοϊκότερες αλληλεπιδράσεις προσδέτη-υποδοχέα. Ο υποδοχέας μπορεί να είναι μία πρωτεΐνη ή ένας μη πρωτεϊνικός συμπαράγοντας. Η μοριακή πρόσδεση με χρήση του αλγόριθμου GLIDE μπορεί να επιτευχθεί θεωρώντας τον προσδέτη άκαμπτο ή εύκαμπτο, ενώ ο υποδοχέας παραμένει άκαμπτος (επιτρέπεται μόνο η περιστροφή ορισμένων υδροξυλομάδων). Εάν επιλεγεί ο προσδέτης να είναι άκαμπτος τότε αυτός προσδένεται στον υποδοχέα ως έχει, ενώ εάν επιλεγεί να είναι εύκαμπτος πριν ξεκινήσει η πρόσδεση δημιουργείται ένα σύνολο διαμορφώσεων που μπορεί να αποκτήσει. Η θέση, ο προσανατολισμός και η διαμόρφωση κάθε προσδέτη που λαμβάνει στο ενεργό κέντρο του ενζύμου ονομάζεται «πόζα πρόσδεσης» (ligand pose). Οι πόζες πρόσδεσης που δημιουργούνται^{163, 164} περνούν μέσα από μια σειρά φίλτρων ιεράρχησης που εκτιμούν και αξιολογούν τις αλληλεπιδράσεις του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Τα ιεραρχικά φίλτρα ελέγχουν το

μέγεθος του προσδέτη και τη συμπληρωματικότητα των αλληλεπιδράσεων του με το ενεργό κέντρο του ενζύμου χρησιμοποιώντας μία μέθοδο βασισμένη στη θεωρία πλέγματος.¹⁵⁴ Οι προσανατολισμοί που ελέγχονται από τα ιεραρχικά φίλτρα και θεωρούνται ενεργειακά ευνοϊκοί υποβάλλονται στη συνέχεια στο τελικό στάδιο της μοριακής πρόσδεσης, στο 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, η οποία χρησιμοποιείται για να βαθμολογείται η πρόσδεση των δημιουργούμενων προσανατολισμών ενός προσδέτη. Εξ' ορισμού χρησιμοποιείται η συνάρτηση βαθμολόγησης GlideScore για τη βαθμολόγηση της πρόσδεσης και δεν υπάρχουν άλλες επιλογές συναρτήσεων βαθμολόγησης. Ο όρος βαθμολόγησης Emodel χρησιμοποιείται για να κατατάσσει τους προσανατολισμούς του προσδέτη και να επιλέγει αυτούς που θα αναφερθούν στον χρήστη. Το Emodel περιλαμβάνει τη βαθμολόγηση του GlideScore, την ενέργεια μη δεσμικών αλληλεπιδράσεων και την εσωτερική ενέργεια της διαμόρφωσης που δημιουργήθηκε για τον προσδέτη.

3.5.6.1 Ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη

Το πρώτο βήμα της μοριακής πρόσδεσης ενός προσδέτη με τον αλγόριθμο GLIDE είναι η ανάλυση του διαμορφωτικού του χώρου. Κατά τη διαδικασία αυτή διεξάγεται μία εμπειρική διαλογή κατά την οποία 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.¹⁶³ Κάθε προσδέτης κατά τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης χωρίζεται στην περιοχή του πυρήνα (region core) και τις περιστρεφόμενες ομάδες (rotamer groups). 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 κατά τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης του προσδέτη. Άτομα άνθρακα και αζώτου τα οποία συνδέονται με άτομα υδρογόνου (όπως ομάδες $-CH_3$, $-NH_2$, $-^+NH_3$) δεν λαμβάνονται ως περιστρεφόμενες ομάδες γιατί δεν έχουν ιδιαίτερη διαμορφωτική σημασία.

Κατά τη διαδικασία της διαμορφωτικής ανάλυσης, κάθε περιοχή πυρήνα αντιπροσωπεύεται από ένα σύνολο βασικών διαμορφώσεων, ο αριθμός των οποίων 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. Ο πυρήνας μαζί με τις διαμορφώσεις των περιστροφικών ομάδων συνδυάζονται στη συνέχεια για να δώσουν τις τελικές διαμορφώσεις που θα προσδεθούν στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

3.5.6.2 Τοποθέτηση του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα

Για κάθε διαμόρφωση του πυρήνα του προσδέτη, πραγματοποιείται μία αναζήτηση πιθανών θέσεων πρόσδεσης και προσανατολισμών στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Η αναζήτηση ξεκινά με την επιλογή των σημείων πρόσδεσης (site points) σε ένα ισομερώς κατανομημένο πλέγμα διαστάσεων 2 \AA , το οποίο καλύπτει το ενεργό κέντρο του υποδοχέα (Σχήμα 3.7).

Οι αποστάσεις από κάθε σημείο πρόσδεσης στο πλέγμα προς την επιφάνεια του υποδοχέα υπολογίζονται με βάση μία σειρά από προκαθορισμένες κατευθύνσεις και ταξινομούνται σε ομάδες αποστάσεων εύρους 1 \AA . Παρομοίως, οι αποστάσεις από το κέντρο του προσδέτη (το οποίο θεωρείται το μεσαίο σημείο των δύο ατόμων του προσδέτη που έχουν τη μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ τους) προς την επιφάνεια του προσδέτη υπολογίζονται και ταξινομούνται σε ομάδες αποστάσεων εύρους 1 \AA . Η δεύτερη φάση της διαδικασίας τοποθέτησης του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα

διεξάγεται με την τοποθέτηση των ατόμων του προσδέτη τα οποία βρίσκονται σε μία καθορισμένη απόσταση από τη διάμετρο του προσδέτη (τη γραμμή που συνδέει τα δύο άτομα του προσδέτη, τα οποία βρίσκονται στη μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ τους). Αυτό γίνεται αρχικά με την επιλογή πιθανών προσανατολισμών της διαμέτρου του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Στη συνέχεια, λαμβάνονται υπόψη οι αλληλεπιδράσεις ενός υποσυνόλου ατόμων τα οποία δύνανται να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου ή σε αλληλεπιδράσεις με ιόντα μετάλλων, όταν πρόκειται για μεταλλοπρωτεΐνες και βαθμολογούνται. Αν η βαθμολόγηση είναι ευνοϊκή, τότε ο συγκεκριμένος προσανατολισμός του προσδέτη θεωρείται αποδεκτός και βαθμολογούνται όλες οι αλληλεπιδράσεις όλων των ατόμων με το ενεργό κέντρο του υποδοχέα.^{162, 163}



Σχήμα 3.7: Στο GLIDE η διαδικασία πρόσδεσης ξεκινά με την επιλογή των σημείων πρόσδεσης στο πλέγμα.

3.5.6.3 Η συνάρτηση βαθμολόγησης

Όσες διαμορφώσεις περάσουν από όλα αυτά τα φίλτρα αξιολογούνται από τη συνάρτηση GlideScore (GS) και λαμβάνουν την τελική βαθμολογία πρόσδεσης. Όσο πιο αρνητική είναι η βαθμολογία αυτή, τόσο πιο ισχυρή είναι η πρόσδεση του μορίου στον υποδοχέα.

Στη συνάρτηση GScore (2) αθροίζονται τα επιμέρους αθροίσματα από τις παρακάτω συνισταμένες:¹⁶³

$$\mathbf{GScore} = 0.065 * \mathbf{vdW} + 0.130 * \mathbf{Coul} + \mathbf{Lipo} + \mathbf{HBond} + \mathbf{Metal} + \mathbf{BuryP} + \mathbf{RotB} + \mathbf{Site} \quad (2)$$

όπου

- ✓ **vdW**: ενέργεια των αλληλεπιδράσεων van der Waals. Ο όρος αυτός υπολογίζεται με ελαττωμένα τα αμιγή ιοντικά φορτία των ομάδων που φέρουν τυπικά φορτία (formal charges), 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 ενζύμου 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 εμπíπτουν στους δεσμούς υδρογόνου σε μία υδρόφοβη περιοχή του ενεργού κέντρου.

Κατά τη διάρκεια ενός *in silico* πειράματος πρόσδεσης στο GLIDE, μπορούν να εφαρμοστούν τρία επίπεδα ακρίβειας. Το επίπεδο **HTVS** (High Throughput

Virtual Screening) διαλογής υψηλού ρυθμού απόδοσης, το οποίο είναι κατάλληλο για πολύ μεγάλες βιβλιοθήκες δεδομένων καθώς οι υπολογισμοί διεξάγονται ταχέως. Το επίπεδο **SP** (Standard Precision) παρέχει υψηλότερο βαθμό ακρίβειας αλλά διεξάγεται αρκετά ταχέως στη διεκπεραίωση μικρότερου αριθμού ενώσεων. Τέλος, το επίπεδο **XP** (Extra Precision)¹⁶⁵ παρέχει υψηλή ακρίβεια αλλά χρειάζεται μεγαλύτερος χρόνος για τη διεκπεραίωση των υπολογισμών. Συνήθως χρησιμοποιείται το επίπεδο XP λόγω της μεγάλης ακρίβειας των υπολογισμών, της ικανότητας του να απορρίπτονται οι ψευδώς θετικές (false positives) βαθμολογίες και του ικανοποιητικού συσχετισμού μεταξύ ευνοϊκών λύσεων και επιτυχούς βαθμολογίας (GlideScore).¹⁶⁶ Κατά τη μέθοδο XP, στον αλγόριθμο τοποθετούνται αρχικά τμήματα του προσδέτη στο ενεργό κέντρο και δομείται το μόριο δεσμό προς δεσμό. Οι λύσεις που προκύπτουν, υποβάλλονται σε ελαχιστοποίηση ενέργειας και αξιολογούνται από τη συνάρτηση βαθμολόγησης XP.

Η XP συνάρτηση βαθμολόγησης (XP GScore) περιέχει επιπρόσθετους όρους σε σχέση με τη συνάρτηση βαθμολόγησης GlideScore, όπως είναι αυτός της επιδιάλυψης του συστήματος που περιλαμβάνει επιπρόσθετα όρους βασισμένους στις αλληλεπιδράσεις των μορίων νερού με διάφορες φορτισμένες και πολικές ομάδες του προσδέτη και του υποδοχέα. Επιπλέον, στη συνάρτηση XP GScore επιβραβεύεται η πρόσδεση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβα ενεργά κέντρα υποδοχέων. Ο όρος βαθμολόγησης της ενέργειας των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στη συνάρτηση XP GScore αναπτύχθηκε για να αντισταθμίζει την υποτίμηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που γίνεται από άλλες συναρτήσεις βαθμολόγησης. Στον όρο αυτόν μπορεί να προστεθούν αρκετά kcal·mol⁻¹ σε περιπτώσεις ευνοϊκών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και αρωματικών (π-π) αλληλεπιδράσεων επιστοίβαξης.

Η XP συνάρτηση βαθμολόγησης παρέχεται από την παρακάτω εξίσωση:¹⁶⁵

$$\mathbf{XP\ GlideScore = E_{coul} + E_{vdW} + E_{bind} + E_{penalty}} \quad (3)$$

όπου οι ενέργειες E_{bind} και $E_{penalty}$ δίνονται από τις εξισώσεις (4) και (5), αντίστοιχα:

$$E_{\text{bind}} = E_{\text{hyd_enclosure}} + E_{\text{hb_nn_motif}} + E_{\text{hb_cc_motif}} + E_{\text{PI}} + E_{\text{hb_pair}} + E_{\text{phobic_pair}} \quad (4)$$

$$E_{\text{penalty}} = E_{\text{desolv}} + E_{\text{ligand_strain}} \quad (5)$$

όπου

- ✓ $E_{\text{hyd_enclosure}}$: ενέργεια υδροφοβικού εγκλεισμού
- ✓ $E_{\text{hb_nn_motif}}$: ενέργεια υδρογονικών δεσμών από ουδέτερα άτομα
- ✓ $E_{\text{hb_cc_motif}}$: ενέργεια υδρογονικών δεσμών από φορτισμένα άτομα
- ✓ E_{PI} : ενέργεια π-κατιοντικών αλληλεπιδράσεων
- ✓ $E_{\text{hb_pair}}$: ενέργεια ζευγών ατόμων που εμπλέκονται σε υδρογονικούς δεσμούς
- ✓ $E_{\text{phobic_pair}}$: ενέργεια ζευγών ατόμων που εμπλέκονται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

3.6 Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (Quantitative Structure-Activity Relationships, QSAR)

Οι Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (QSAR) κατατάσσονται στις πρώτες προσπάθειες για την ανάπτυξη του ορθολογικού σχεδιασμού έχοντας ως κύριο στόχο τη σύνθεση μικρότερου αριθμού ενώσεων που θα ελέγχονται για τη βιολογική τους δράση. Η ελαχιστοποίηση του παράγοντα τύχη και των χρονοβόρων και δαπανηρών πειραμάτων της σύνθεσης και του βιολογικού ελέγχου νέων ουσιών, αποτελεί τον ουσιαστικό στόχο της προσπάθειας αυτής. Ακολουθώντας, με τη μέθοδο QSAR επιτυγχάνεται όλο και λιγότερα πειραματόζωα να θυσιάζονται αλλά και το περιβάλλον να επιβαρύνεται λιγότερο. Τελικός στόχος της τεχνικής QSAR είναι η εύρεση μιας γραμμικής εξίσωσης του τύπου (6) ανάμεσα σε μια συγκεκριμένη δράση / δραστικότητα, που αποτελεί την εξαρτημένη μεταβλητή (μεταβλητή απόκρισης), και στα δομικά χαρακτηριστικά μιας σειράς παρόμοιων δομικά μορίων, μορίων δηλαδή που έχουν προκύψει από την ίδια ένωση-οδηγό με κατάλληλες τροποποιήσεις στη δομή.

$$\text{Βιολογική δράση} = \alpha_0 + (\alpha_1 \cdot P_1) + (\alpha_2 \cdot P_2) + \dots + (\alpha_n \cdot P_n) \quad (6)$$

Όπου, οι παράμετροι $P_1 - P_n$ εκφράζουν συγκεκριμένες ιδιότητες των επιλεγμένων μορίων (π.χ. λιποφιλία) που μπορούν να συσχετιστούν με τη

βιολογική τους δράση. Οι παράμετροι αυτές καλούνται περιγραφικές μεταβλητές (descriptors) και οι τιμές τους υπολογίζονται είτε πειραματικά είτε θεωρητικά, για το κάθε μόριο χωριστά. Αντίστοιχα, οι συντελεστές $\alpha_0 - \alpha_n$ υπολογίζονται με τη χρήση γραμμικής ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης.¹⁶⁷ Οι εξισώσεις τύπου (6) συνοδεύονται πάντα από στατιστικά στοιχεία, όπως ο συντελεστής συσχέτισης r (r^2), η τυπική απόκλιση (s) και η δοκιμασία Fisher, με βάση τα οποία εκτιμάται η αξιοπιστία τους.

Για να είναι ένα μοντέλο QSAR αξιόπιστο, απαραίτητο στοιχείο αποτελεί η προσεκτική επιλογή των δεδομένων. Ιδανικά, ο αριθμός των ενώσεων θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγάλος και οι τιμές της βιολογικής τους δράσης να είναι καλά κατανοημένες σε ένα μεγάλο εύρος ώστε να ποικίλουν μεταξύ υψηλών έως πολύ χαμηλών τιμών δραστηριότητας. *Οι τιμές της βιολογικής δραστηριότητας (IC_{50} , EC_{50} , K_i , κ.α.) μετατρέπονται στον αντίστοιχο αρνητικό δεκαδικό λογάριθμό τους, και συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η προκύπτουσα τιμή, τόσο πιο δραστική είναι η ένωση.*

Υπάρχει πληθώρα παραμέτρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ενός μοντέλου QSAR: φυσικοχημικές σταθερές, μοριακές παράμετροι, υποδομικά χαρακτηριστικά, τοπολογικοί δείκτες ή παράμετροι που προέρχονται από κβαντικούς υπολογισμούς, όπως η διπολική ροπή, τα μερικά φορτία, ή μεγέθη ενέργειας E_{LUMO} και E_{HOMO} , όπου E είναι η ενέργεια του τροχιακού LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) και του τροχιακού HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital), αντίστοιχα.¹⁶⁸⁻¹⁷¹ Μία καταγραφή των περιγραφικών μεταβλητών, ως προς το πληροφοριακό τους περιεχόμενο, την προέλευσή τους και τον τρόπο υπολογισμού τους, περιλαμβάνεται στο βιβλίο των Todeschini και Consonni.¹⁷¹ Αξιοσημείωτο είναι ότι η ισχυρή επιμέρους συσχέτιση ιδιότητας-δραστηριότητας αυξάνει την ποιότητα των προβλέψεων του μοντέλου QSAR.¹⁷²

3.6.1 Ιστορική αναφορά

Οι πρώιμες μελέτες σχέσης δομής-δράσης αρχίζουν στα μέσα του 19ου αιώνα. Το 1863 στο πανεπιστήμιο του Στρασβούργου, ο Gros στη διατριβή του, παρατήρησε πρώτος την αντίστροφη σχέση μεταξύ της τοξικότητας των πρωτοταγών αλειφατικών αλκοολών και της διαλυτότητάς τους στο νερό.¹⁷³

Λίγα χρόνια αργότερα, στο έργο των Crum-Brown και Frazer σχετίζεται η φυσιολογική δράση μιας ουσίας με τη χημική σύστασή της (1868).¹⁷⁴ Μερικές δεκαετίες αργότερα, ο Richet παρατήρησε ότι η κυτταροτοξικότητα μίας ομάδας απλών οργανικών ενώσεων ήταν αντιστρόφως ανάλογη της διαλυτότητάς τους στο νερό (1893).¹⁷⁵ Αυτή η ανακάλυψη ακολουθήθηκε από τις έρευνες των Meyer και Overton, οι οποίοι απέδειξαν ότι η αναισθητική δράση μιας ομάδας οργανικών ενώσεων μεταβαλλόταν ανάλογα με τον συντελεστή μερισμού τους σε ελαιόλαδο/νερό (1899).^{176, 177}

Κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού του 20ου αιώνα, ο Ferguson εισήγαγε μια θερμοδυναμική γενίκευση στη συσχέτιση της αναισθητικής δράσης με την ικανότητα κορεσμού των πτητικών ενώσεων (1939).¹⁷⁸ Την ίδια χρονιά, ο Hammett έθεσε τα θεμέλια για τη σύγχρονη μέθοδο QSAR συσχετίζοντας τις ηλεκτρονικές ιδιότητες των οργανικών οξέων και βάσεων με τις σταθερές ιοντισμού τους και τη χημική αντιδραστικότητά τους.¹⁷⁹ Το 1964, δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά από τον βιοχημικό Hansch και τον Fujita η πρώτη εφαρμογή ποσοτικής συσχέτισης της βιολογικής δράσης με τη χημική δομή, με τη βοήθεια της Στατιστικής.¹⁸⁰ Η δημοσίευση αυτή αποτέλεσε τομή για την ανάπτυξη των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης ως νέου ερευνητικού πεδίου στον σχεδιασμό των φαρμάκων. Το 1988, ο Cramer πρώτος εισήγαγε τις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης τριών διαστάσεων (3D-QSAR, Three Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship), που βασίζονται στην τριδιάστατη δομή των ενώσεων.^{181, 182}

3.6.2 3D Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (3D-QSAR)

Οι κλασικές μελέτες QSAR, ή 2D-QSAR συσχετίζουν τη βιολογική δράση των φαρμάκων με φυσικοχημικές / μοριακές ιδιότητες (όπως η λιποφιλία), χωρίς να λαμβάνεται υπόψη η τριδιάστατη δομή ή η χειρομορφία των μορίων. Ωστόσο, για τον υπολογισμό πολλών παραμέτρων (όπως τα προαναφερθέντα κβαντομηχανικά μεγέθη E_{HOMO} , E_{LUMO} , μερικά φορτία, διπολική ροπή κ.λπ., παράμετροι όγκου και επιφάνειας van der Waals ή προσιτής στον διαλύτη κ.λπ.) έχει προηγηθεί γεωμετρική βελτιστοποίηση των μορίων στη θερμοδυναμικά ευνοϊκή διαμόρφωση.^{171, 181, 183-187} Οι παράμετροι αυτές αποτελούν περιγραφικές μεταβλητές 3D και εισάγουν έμμεσα την

επίδραση της τριδιάστατης δομής των ενώσεων (όχι όμως και του υποδοχέα) στην ανάλυση. Οι μελέτες κλασικού QSAR έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη νέων φαρμακομορίων και φυτοφαρμάκων,¹⁸⁸⁻¹⁹¹ ενώ οι σύγχρονες εξελίξεις, τόσο στο πεδίο των στατιστικών τεχνικών όσο και στην ανάπτυξη λογισμικών για τον γρήγορο υπολογισμό πληθώρας περιγραφικών μεταβλητών, έχουν ανοίξει νέες προοπτικές για την εφαρμογή τους στον πολυπαραγοντικό σχεδιασμό των φαρμάκων.^{192, 193}

Από την άλλη, έχουν αναπτυχθεί παράλληλα οι Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης τριών διαστάσεων (3D-QSAR), οι οποίες συγκρίνουν τα μόρια μεταξύ τους με βάση την τριδιάστατη δομή τους, θεωρώντας μοριακά πεδία ή δείκτες ομοιότητας στον χώρο, που δυνάμει αντιστοιχούν σε αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα και καθορίζουν τη βιολογική δράση. Κατ' αυτόν τον τρόπο αν και η δομή του υποδοχέα δεν υπεισέρχεται στην ανάλυση, φαίνεται να είναι έμμεσα παρούσα.^{194, 195} Επιπλέον, η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα των μοντέλων 3D-QSAR και παρέχει πληροφορίες, που μπορούν να οδηγήσουν σε υποθέσεις για το ίδιο το ενεργό κέντρο του υποδοχέα, στην περίπτωση που δεν είναι γνωστή η δομή του.^{196, 197}

3.6.3 Οι μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA

Οι περισσότερο ευρέως χρησιμοποιημένες μεθοδολογίες στις μελέτες 3D-QSAR είναι η μέθοδος CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis – Συγκριτική Ανάλυση Μοριακών Πεδίων)¹⁸² και η μέθοδος CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis – Συγκριτική Ανάλυση Δεικτών Μοριακής Ομοιότητας (CoMSIA)).¹⁹⁸ Οι δύο μέθοδοι βασίζονται στην τριδιάστατη δομή των χημικών ενώσεων και τη γνώση της βιολογικής τους δραστηριότητας.

Ακολούθως περιγράφονται τα στάδια που περιλαμβάνουν οι μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA, ενώ στο Σχήμα 3.8 παρουσιάζεται η πορεία που ακολουθείται σε μία τυπική ανάλυση CoMFA/CoMSIA.



Σχήμα 3.8: Η πορεία που ακολουθείται κατά τη μελέτη 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA.

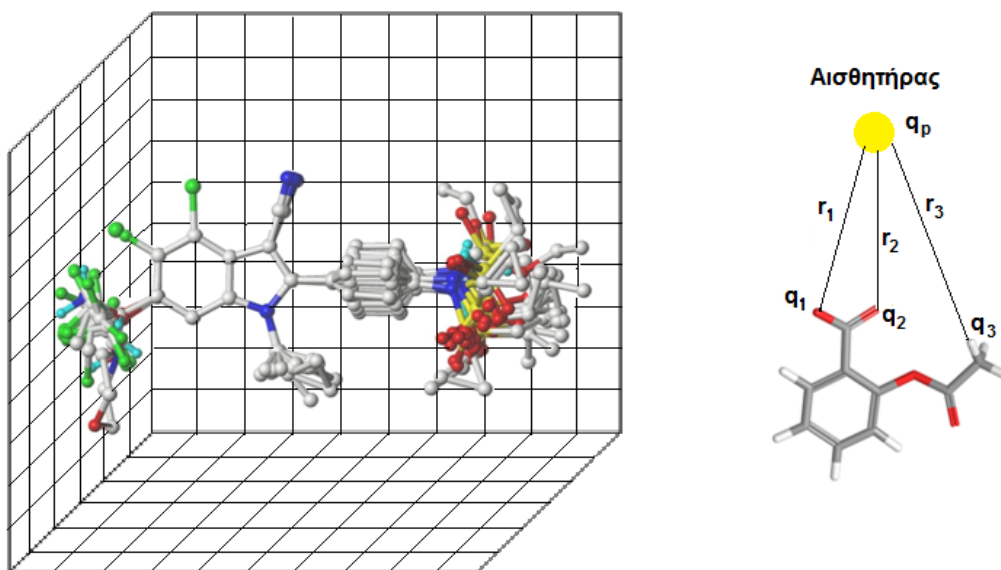
- 1. Επιλογή δεδομένων.** Τα μόρια που θα μελετηθούν πρέπει να δρουν σε κοινό υποδοχέα με τον ίδιο μηχανισμό, δηλαδή να συνδέονται σε ταυτόσημες θέσεις με την ίδια σχετική γεωμετρία. Σημαντική προϋπόθεση αποτελεί το γεγονός ότι τα μόρια πρέπει να εμφανίζουν μεγάλο εύρος, καλώς κατανεμημένης, βιολογικής δραστηριότητας, όπως προαναφέρθηκε.
- 2. Διαχωρισμός δεδομένων.** Επιλέγεται (συνήθως τυχαία ή με χρήση κατάλληλου λογισμικού) μία ομάδα μορίων από το παραπάνω σύνολο, που θα αποτελέσει την ομάδα εκμάθησης ή ομάδα εκπαίδευσης (training set), και που θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή του μοντέλου 3D-QSAR. Τα μόρια που απομένουν αποτελούν την ομάδα ελέγχου ή ομάδα δοκιμής (test set) και χρησιμοποιούνται στη συνέχεια στον έλεγχο της αξιοπιστίας του μοντέλου.
- 3. Υπολογισμός σημειακών (μερικών) ατομικών φορτίων.** Αφού επιλεγούν οι ενεργειακά ευνοϊκότερες διαμορφώσεις (έπειτα από την πρόσδεσή τους ή όχι στον υποδοχέα) υπολογίζονται τα σημειακά ατομικά φορτία της κάθε δομής. Στην παράγραφο 3.6.3.2 περιγράφεται αναλυτικά η μέθοδος υπολογισμού των φορτίων.

4. Ευθυγράμμιση (alignment). Επιλέγεται το μόριο (συνήθως το πιο δραστικό, αλλά και σχετικά δύσκαμπτο μόριο, από το σύνολο δεδομένων) που θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο (template molecule) για τη διαδικασία της ευθυγράμμισης. Σε περιπτώσεις που είναι γνωστός ο υποδοχέας με τον οποίο τα μόρια αλληλεπιδρούν και προηγείται η πρόσδεσή τους σε αυτόν, εφαρμόζεται η τεχνική ευθυγράμμισης βασισμένη στη δομή του υποδοχέα και τα φαρμακοφόρα σημεία του (structure-based alignment ή pharmacophore alignment). Στη διαδικασία της ευθυγράμμισης, κάθε μόριο «τοποθετείται» σε έναν εικονικό «κύβο» (box), ο οποίος περιλαμβάνει ένα δικτυωτό πλέγμα (grid/lattice), και άτομα-αισθητήρες (probe atoms) σε αποστάσεις που απέχουν ομοίως μεταξύ τους, της τάξης του 1 ή 2 Å (Σχήμα 3.9). Τα άτομα-αισθητήρες είναι συνήθως άτομο άνθρακα υβριδισμού sp^3 , ή άτομο με φορτίο +1 και χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της τιμής των στερικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων σε κάθε σημείο του πλέγματος. Οι τιμές αυτές αντιστοιχούν στην ενέργεια που δέχεται ο αισθητήρας στα συγκεκριμένα σημεία του τριδιάστατου πλέγματος λόγω της παρουσίας των μορίων εντός αυτού. Οι στερικές αλληλεπιδράσεις στο μοντέλο CoMFA υπολογίζονται σύμφωνα με το δυναμικό Lennard-Jones, ενώ οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις υπολογίζονται σύμφωνα με το δυναμικό Coulomb. Οι τιμές αυτών των πεδίων τοποθετούνται σε στήλες μαζί με τις τιμές της βιολογικής δράσης (μεταβλητή απόκρισης) και δημιουργείται ο πίνακας, που θα χρησιμοποιηθεί για τη συσχέτιση με τη βιολογική δράση.

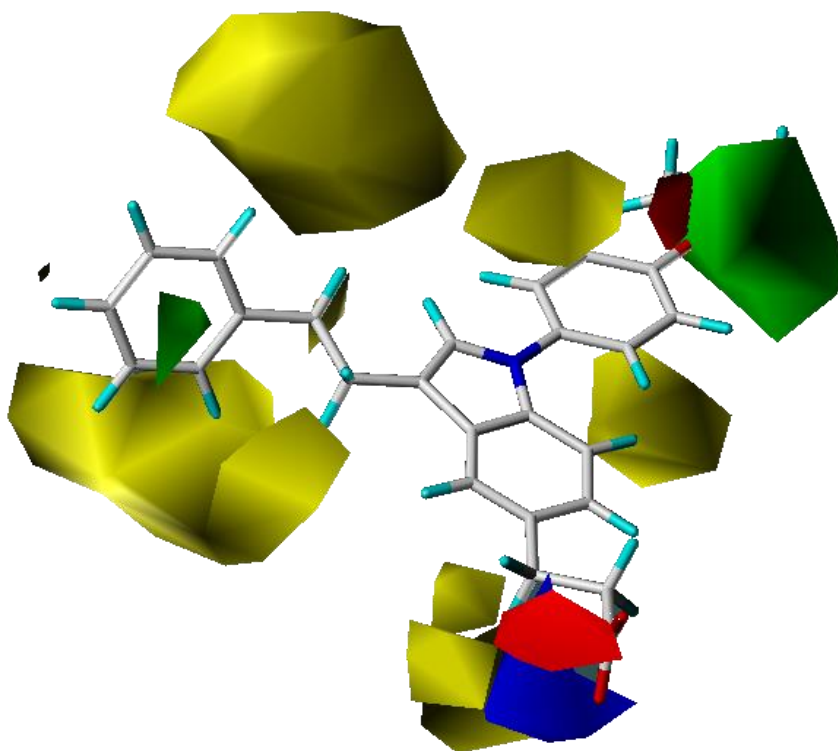
5. Εφαρμογή της μεθόδου των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS). Τα στερικά και ηλεκτροστατικά πεδία τοποθετημένα στις στήλες του πίνακα, αποτελούν τις περιγραφικές μεταβλητές, οι οποίες από αρκετές χιλιάδες περιορίζονται σε λιγότερες χιλιάδες αν θεωρηθεί μια ελάχιστη τιμή σ (όπου σ τυπική απόκλιση κάθε στήλης περιγραφικών μεταβλητών). Η διαχείριση ενός τόσο μεγάλου αριθμού περιγραφικών μεταβλητών καθίσταται εφικτή με εφαρμογή της μεθόδου των μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS. Η στατιστική αυτή τεχνική βασίζεται στη μέθοδο των προβολών από ένα πολυδιάστατο χώρο σε ένα χώρο λιγότερων διαστάσεων, οι οποίες αποτελούν τις Κύριες Συνιστώσες και

είναι γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών.¹⁹⁹ Στην παράγραφο 3.6.3.3 περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία.

6. **Αναπαράσταση αποτελεσμάτων.** Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται με τη μορφή τριδιάστατων ισοϋψών χαρτών (3D contour maps). Αυτοί οι χάρτες παρουσιάζουν τις ευνοϊκές και μη στερικές περιοχές γύρω από τα μόρια, καθώς και τις ευνοϊκές και μη περιοχές για ηλεκτροθετικούς ή ηλεκτραρνητικούς υποκαταστάτες σε ορισμένες θέσεις, τμήματα δηλαδή της χημικής ένωσης τα οποία επιδρούν στη δραστηκότητά της, είτε αυξάνοντας είτε μειώνοντας τη (Σχήμα 3.10).
7. **Έλεγχος αξιοπιστίας.** Αξιολογούνται τα στατιστικά στοιχεία του μοντέλου. Συνήθως πραγματοποιείται μία διαδικασία ελέγχου αξιοπιστίας με τη διαδικασία διασταυρούμενης επικύρωσης (cross-validation) για να διαπιστωθεί η εσωτερική ικανότητα πρόβλεψης (internal predictive ability) του μοντέλου που προέκυψε.
8. **Πρόβλεψη.** Τέλος, πραγματοποιούνται οι προβλέψεις για τα μόρια της ομάδας ελέγχου (test set) ή για νέες μοριακές δομές που έχουν σχεδιαστεί, είτε με απλή ποιοτική επισκόπηση των μοντέλων ή ποσοτικά, με υπολογισμό των πεδίων των μορίων, εισαγωγή τους στο μοντέλο και υπολογισμό της βιολογικής δραστηκότητας. Στην παράγραφο 3.6.3.4 περιγράφεται αναλυτικότερα η ως άνω διαδικασία.



Σχήμα 3.9: Ευθυγράμμιση μοριακών δομών και τοποθέτηση τους στο πλέγμα (αριστερά), και αλληλεπίδραση κάθε μορίου με τον αισθητήρα (δεξιά).



Σχήμα 3.10: Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων ανάλυσης CoMFA με τη μορφή τριδιάστατων ισοϋψών χαρτών (3D contour maps).

Η μεθοδολογία CoMSIA αποτελεί επέκταση της μεθοδολογίας CoMFA.¹⁹⁸ Αναπτύχθηκε από τον Klebe ερευνητή στην εταιρία BASF, που είναι το μεγαλύτερο εργοστάσιο παραγωγής χημικών στον κόσμο, και έχει έδρα στην πόλη Ludwigshafen της Γερμανίας. Η βασική διαφορά της με τη μεθοδολογία CoMFA έγκειται στη χρήση δεικτών ομοιότητας (similarity indices) για τον υπολογισμό των περιγραφικών μεταβλητών αντί για μοριακά πεδία. Οι δείκτες ομοιότητας του αισθητήρα προς τα άτομα των μορίων είναι εξαρτώμενοι από την απόσταση στο τριδιάστατο πλέγμα. Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης τεχνικής έγινε για την αποφυγή προβλημάτων που παρατηρήθηκαν στη μέθοδο CoMFA.²⁰⁰ Συγκεκριμένα, στη μέθοδο CoMFA η επίδραση της εντροπίας δεν λαμβάνεται υπόψη, ή λαμβάνεται υπόψη κατά τρόπο μη ικανοποιητικό. Επιπλέον τα δυναμικά Lennard-Jones και Coulomb παρουσιάζουν «μοναδικότητες» στις θέσεις των ατόμων, ενώ λαμβάνουν πολύ υψηλές τιμές στις περιοχές πλησίον της επιφάνειας van der Waals. Επίσης, κατά την ανάπτυξη ενός μοντέλου CoMSIA λαμβάνονται υπόψη, περισσότερες μοριακές αλληλεπιδράσεις. Πλην των ηλεκτροστατικών και

στερικών αλληλεπιδράσεων, υπολογίζονται οι υδρόφοβες συνεισφορές καθώς και η επίδραση της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (ως δότες και δέκτες), χρησιμοποιώντας κατάλληλους αισθητήρες.¹⁹⁸

3.6.3.1 Επιλογή ομάδας εκμάθησης και ομάδας ελέγχου

Ο διαχωρισμός των δεδομένων σε ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου αποτελεί σημαντικό βήμα στην εξαγωγή μοντέλου 3D-QSAR και για αυτόν τον λόγο πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή. Οι ενώσεις της ομάδας εκμάθησης πρέπει να παρουσιάζουν τη μέγιστη δυνατή ποικιλία υποκαταστατών και χαρακτηριστικών ομάδων και το μέγιστο δυνατό εύρος δραστηριότητας. Με την ίδια λογική επιλέγονται και οι ενώσεις της ομάδας ελέγχου. Για παράδειγμα, δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί η επίπτωση από την παρουσία ενός πολικού υποκαταστάτη σε κάποια θέση μίας ένωσης της ομάδας ελέγχου όταν δεν υπάρχει ούτε μία ένωση με πολικό υποκαταστάτη στη συγκεκριμένη θέση στην ομάδα εκμάθησης. Η αναλογία των ενώσεων κυμαίνεται συνήθως από 70:30 έως και 4:1.

3.6.3.2 Μέθοδος υπολογισμού φορτίων

Τα ηλεκτροστατικά σημειακά φορτία των ατόμων ενός μορίου μπορούν να υπολογιστούν με διάφορες ημι-εμπειρικές μεθόδους. Στο εμπορικό πακέτο SYBYL της Tripos υπολογίζεται το τυπικό φορτίο (formal charge) σε κάθε άτομο του μορίου που διαθέτει φορτίο. Αυτός ο υπολογισμός βασίζεται στον αριθμό ελεύθερων σθενών (free valences) κάθε ατομικού είδους και τον αριθμό δεσμών που αποδίδονται στη συγκεκριμένη περίπτωση σε κάθε άτομο. Για τον υπολογισμό των μερικών φορτίων συνήθως χρησιμοποιείται η μέθοδος Gasteiger-Hückel. Η μέθοδος αυτή αποτελεί συνδυασμό δύο άλλων μεθόδων: της μεθόδου των Gasteiger-Marsili²⁰¹ για τον υπολογισμό της σ συνιστώσας του μερικού φορτίου, η οποία στηρίζεται σε μερική εξίσωση της ηλεκτραρνητικότητας των τροχιακών (Partial Equalization of Orbital Electronegativity, PEOE) και της μεθόδου του Hückel²⁰² για τον υπολογισμό της π συνιστώσας του μερικού φορτίου, η οποία στηρίζεται σε μερική εξίσωση της π-ηλεκτραρνητικότητας (Partial Equalization of π-Electronegativity, PEPE). Το τελικό συνολικό μερικό φορτίο είναι το άθροισμα των φορτίων όπως αυτά υπολογίζονται με τις δύο μεθόδους. Τα τυπικά φορτία ατόμων που

περιλαμβάνονται σε ολόκληρο το συζυγιακό σύστημα π θεωρείται ότι είναι απεντοπισμένα. Για τον λόγο αυτόν, υπολογίζονται πρώτα τα φορτία Hückel ώστε να χρησιμοποιηθούν ως βάση για τον υπολογισμό των φορτίων Gasteiger-Marsili.

3.6.3.3 Ανάλυση των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS)

Η στατιστική ανάλυση στις μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA πραγματοποιείται με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS).^{199, 203} Η ανάλυση των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, όπως αναφέρθηκε, βασίζεται στη μέθοδο των προβολών και εξάγει κάποιες κύριες συνιστώσες που αποτελούν γραμμικό συνδυασμό μιας πληθώρας μεταβλητών, στην περίπτωση της μεθόδου CoMFA, των ηλεκτροστατικών και στερικών πεδίων, στην περίπτωση της μεθόδου CoMSIA των δεικτών ομοιότητας στα διάφορα σημεία του πλέγματος. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι μια εξίσωση με χιλιάδες συντελεστές που συνοδεύεται από στατιστικά στοιχεία. Ανάλογα με το «βάρος» κάθε αρχικής μεταβλητής διαμορφώνονται τα ποσοστά της συνεισφοράς των διαφορετικών μοριακών πεδίων ή δεικτών ομοιότητας στη διαμόρφωση κάθε συνιστώσας. Με βάση αυτήν την πληροφορία επιτυγχάνεται αναπαράσταση (οπτικοποίηση) των αποτελεσμάτων που προαναφέρθηκε (Σχήμα 3.10).

Η ανάλυση των μερικών ελαχίστων τετραγώνων διεξάγεται σε δύο στάδια.

Στο πρώτο στάδιο κατασκευάζονται μοντέλα στα οποία εφαρμόζεται μία εσωτερική επικύρωση (cross-validation) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Leave-One-Out (LOO). Στη μέθοδο αυτή, κάθε φορά εξάγεται μία ένωση από την ομάδα εκμάθησης και η δραστηκότητά της προβλέπεται στη συνέχεια χρησιμοποιώντας το μοντέλο που δημιουργήθηκε.²⁰⁴ Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται κυκλικά μέχρις ότου κάθε ένωση έχει βγει από την ομάδα εκμάθησης και έχει προβλεφθεί ακριβώς μία φορά. Με τη μέθοδο LOO προσδιορίζονται ο συντελεστής της διασταυρούμενης επικύρωσης r_{cv}^2 (ή Q^2), το τυπικό σφάλμα των προβλέψεων της διασταυρούμενης επικύρωσης (Standard Error of Prediction, *SEP*), και ο βέλτιστος αριθμός των συνιστωσών (Optimum Number of Components, *ONC*). Ο συντελεστής της διασταυρούμενης επικύρωσης r_{cv}^2 (Q^2) υπολογίζεται από την εξίσωση (7):

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs} - Y_{pred})^2}{\sum(Y_{obs} - \bar{Y})^2} \quad (7)$$

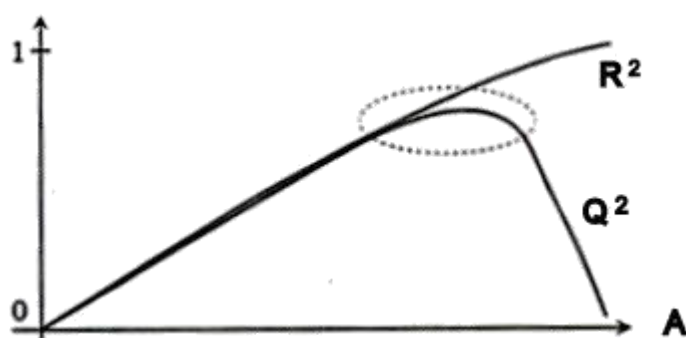
Όπου οι Y_{obs} και Y_{pred} υποδηλώνουν τις παρατηρούμενες και προβλεπόμενες, αντίστοιχα, τιμές δραστηριότητας της ένωσης που παραλείπεται κάθε φορά από την ομάδα εκμάθησης, ενώ η \bar{Y} υποδηλώνει τον μέσο όρο των παρατηρούμενων τιμών δραστηριότητας της ομάδας εκμάθησης. Ένα μοντέλο θεωρείται αποδεκτό, όταν η τιμή της Q^2 υπερβαίνει το 0,5.²⁰⁵ Το μοντέλο με την υψηλότερη τιμή Q^2 και τη χαμηλότερη τιμή SEP οδηγείται για περαιτέρω ανάλυση. Αυτό που προκύπτει από το στάδιο αυτό είναι ο καθορισμός του βέλτιστου αριθμού συνιστωσών.

Στο δεύτερο στάδιο, χρησιμοποιώντας τον βέλτιστο αριθμό συνιστωσών που προήλθε από το προηγούμενο στάδιο, εφαρμόζεται μία μη διασταυρούμενη επικυρωμένη μέθοδος (No validation) και η τιμή της μη διασταυρούμενης επικύρωσης R^2_{ncv} (R^2) υπολογίζεται από την εξίσωση (8):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs} - Y_{calc})^2}{\sum(Y_{obs} - \bar{Y})^2} \quad (8)$$

Όπου Y_{obs} και Y_{calc} είναι η παρατηρούμενη τιμή δραστηριότητας και η τιμή της δραστηριότητας που υπολογίζεται από το μοντέλο, αντίστοιχα, για κάθε ένωση εντός της ομάδας εκμάθησης, και \bar{Y} είναι ο μέσος όρος των παρατηρούμενων τιμών δραστηριότητας της ομάδας εκμάθησης.

Η στατιστική σπουδαιότητα του μοντέλου περιγράφεται από το τυπικό σφάλμα εκτίμησης (Standard Error of Estimate, SEE) και την τιμή πιθανότητας (δοκιμασία Fisher, F). Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ ο συντελεστής συσχέτισης R^2 βαίνει αυξανόμενος με την αύξηση του αριθμού των συνιστωσών A τείνοντας στο 1, ο συντελεστής Q^2 ακολουθεί παραβολική σχέση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.11. Η εφαρμογή της μη διασταυρούμενης επικυρωμένης μεθόδου οδηγεί στη δημιουργία του τελικού μοντέλου 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA.



Σχήμα 3.11: Απεικόνιση των συντελεστών R^2 και Q^2 ως προς τον αριθμό των συνιστωσών A .

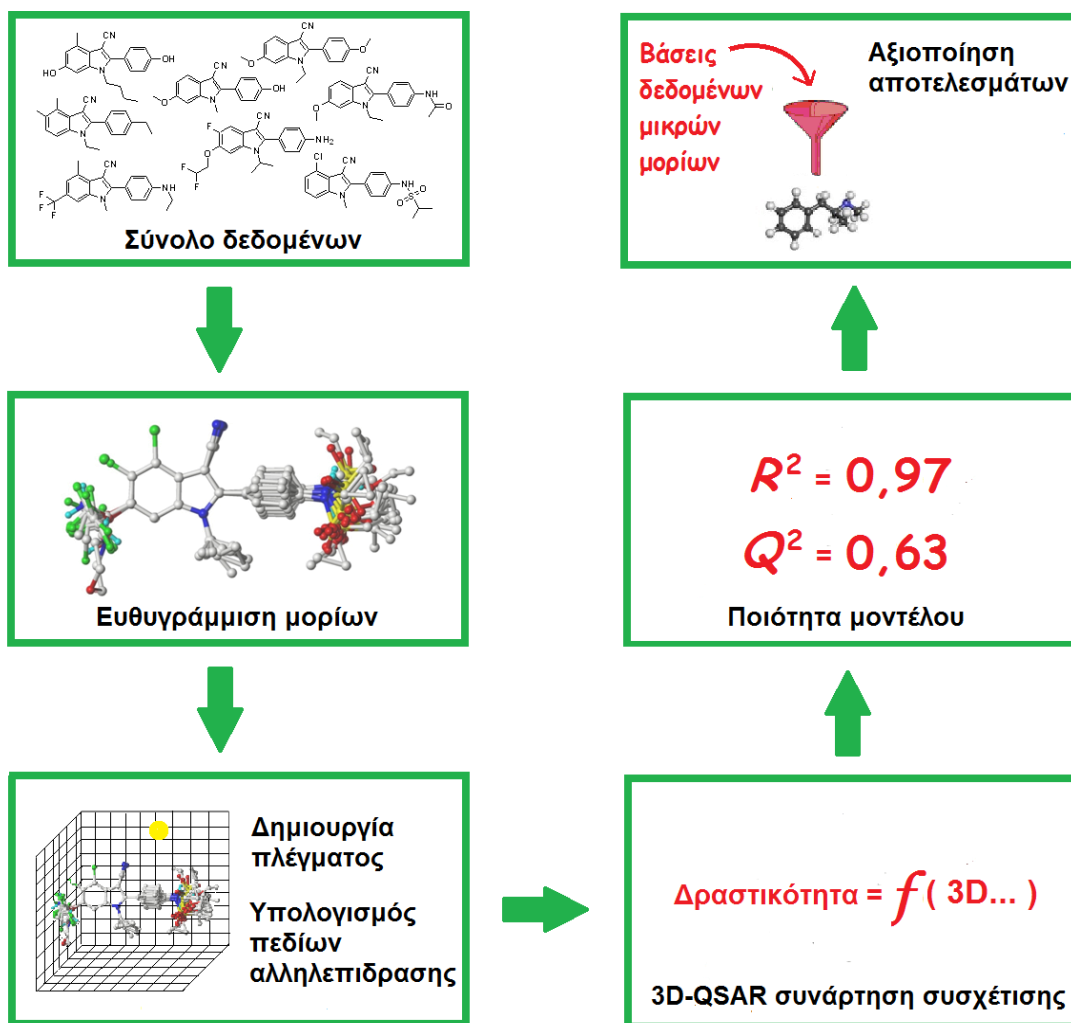
3.6.3.4 Επικύρωση του μοντέλου 3D-QSAR

Η δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA αξιολογείται με μία εξωτερική ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιώντας τα μόρια που δεν έχουν συμπεριληφθεί στην ομάδα εκμάθησης κατά τη διαδικασία διεξαγωγής του μοντέλου.²⁰⁶ Ο συντελεστής συσχέτισης για την ομάδα ελέγχου (R^2_{test}) υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση (9):

$$R^2_{test} = 1 - \frac{\sum(Y_{pred(test)} - Y_{test})^2}{\sum(Y_{test} - \bar{Y}_{train})^2} \quad (9)$$

Όπου $Y_{pred(test)}$ και Y_{test} υποδηλώνουν τις προβλεπόμενες και παρατηρούμενες τιμές δραστηκότητας της ομάδας ελέγχου, αντίστοιχα, και η τιμή \bar{Y}_{train} υποδηλώνει τον μέσο όρο των παρατηρούμενων τιμών δραστηκότητας της ομάδας εκμάθησης. Για ένα ικανοποιητικό μοντέλο 3D-QSAR, η τιμή του R^2_{test} θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0.5.

Στο Σχήμα 3.12 περιγράφεται συνοπτικά η διαδικασία ανάπτυξης μοντέλου 3D-QSAR με τελικό στάδιο την αξιοποίηση των αποτελεσμάτων, όταν τα στατιστικά στοιχεία ικανοποιούν κάποια όρια.



Σχήμα 3.12: Συνοπτική αναπαράσταση ανάπτυξης μοντέλου 3D-QSAR.

3.6.4 Δημιουργία μοντέλου 3D-QSAR μέσω PHASE

Το PHASE είναι ένα ακόμη ευρέως διαδεδομένο λογισμικό δημιουργίας μοντέλων 3D-QSAR και παρέχεται από την εταιρία Schrödinger. Μέσω του PHASE μπορούν να αναπτυχθούν 3D μοντέλα ενώσεων που είτε βασίζονται στα φαρμακοφόρα σημεία (pharmacophore-based model) μιας ένωσης είτε στα κοινά άτομα (atom-based model).^{207, 208}

Στις μέρες μας, η χρήση των 3D φαρμακοφόρων στη μοντελοποίηση έχει καθιερωθεί παρέχοντας αρκετά πλεονεκτήματα στα πρώτα στάδια του ορθολογικού σχεδιασμού. Αρχικά, μπορούν να εντοπισθούν τα χημικά χαρακτηριστικά, τα οποία θεωρούνται σημαντικά για τις αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τον προσδέτη, και επομένως στη βιολογική δράση. Ακόμη, η διαλογή που βασίζεται στα φαρμακοφόρα επιτρέπει την ανάκτηση προσδετών

με δομικά ποικίλους βιοϊσοστερικούς σκελετούς, που δεν θα μπορούσαν να ανακαλυφθούν με συστηματική παραγωγοποίηση των ήδη χημικών ενώσεων.

Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του PHASE μπορούν να γίνουν αντιληπτά τα χαρακτηριστικά του φαρμακοφόρου, να ευθυγραμμιστούν οι δομές, να προβλεφθεί η δρασικότητά τους, καθώς και να αναζητηθούν νέα υποσχόμενα μόρια με τη χρήση των 3D βάσεων δεδομένων.²⁰⁷ Ξεκινώντας από ένα σύνολο δρασικών ενώσεων, και χρησιμοποιώντας μια σειρά από τεχνικές βαθμολόγησης, προσδιορίζονται τα χαρακτηριστικά των 3D δομών που είναι υποθετικά και θεωρητικά κρίσιμα για τη δρασικότητά τους. Μέσω του PHASE, πραγματοποιούνται συστηματικές εξερευνήσεις των περιστρεφόμενων δεσμών, καθώς και υπολογισμοί που συνδέονται με τις ενέργειες των διαμορφώσεων, διατηρώντας μόνο τις πιο λογικές με βάση την ενέργεια διαμορφώσεις.

Η διαδικασία που ακολουθείται στο PHASE 3.4 για τη δημιουργία μοντέλου αποτελείται από πέντε βήματα:

1. Προετοιμασία μορίων: Εισάγονται τα μόρια και προετοιμάζονται χρησιμοποιώντας αρχικά την εφαρμογή LigPrep¹⁴³ ώστε να επιτευχθεί ο ιοντισμός τους σε μία δεδομένη τιμή pH, και να παραχθούν τα ταυτομερή και στερεοϊσομερή τους. Στη συνέχεια, ακολουθεί η παραγωγή πολλαπλών διαμορφώσεων των μορίων (διαμορφωτική ανάλυση) με την εφαρμογή του MacroModel¹²³ και της μεθόδου ConfGen, στην οποία χρησιμοποιείται μία συνδυασμένη αναζήτηση πολλαπλών ελαχίστων Monte Carlo (Monte Carlo Multiple Minimum) και Χαμηλής Συχνότητας (Low Mode). Τέλος, όλα τα μόρια ελαχιστοποιούνται με το πεδίο OPLS_2005.¹³⁸ Η προετοιμασία των μορίων μπορεί να προηγηθεί της εισαγωγής τους στον πίνακα του PHASE. Στη συνέχεια, ορίζονται τα όρια για τις τιμές δρασικότητας, διαχωρίζοντας τις ενώσεις σε τρεις ομάδες, τις δρασικές, τις μη δρασικές και τις ενδιάμεσες.

2. Δημιουργία τοποθεσιών (sites): Χρησιμοποιούνται χημικά χαρακτηριστικά που θα ορίσουν τις φαρμακοφόρες τοποθεσίες. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι ο δότης και δέκτης δεσμών υδρογόνου, η υδροφοβία, το θετικό ή αρνητικό φορτίο, ο αρωματικός δακτύλιος κ.α..

- 3. Εύρεση υποθέσεων κοινού φαρμακοφόρου (CPHs):** Κάνοντας χρήση των αποτελεσμάτων του προηγούμενου βήματος, δημιουργούνται υποθέσεις φαρμακοφόρου που είναι κοινό για όλα τα μόρια. Επιλέγεται το μέγεθος των φαρμακοφόρων, δηλαδή ο μέγιστος αριθμός των τοποθεσιών καθώς και η απόσταση μεταξύ των φαρμακοφόρων τοποθεσιών. Οι υποθέσεις φαρμακοφόρου μπορεί να περιέχουν τρία έως επτά τοποθεσίες, ενώ όσο περισσότερες είναι οι τοποθεσίες, τόσο πιο αξιόπιστο θα είναι το παραχθέν μοντέλο. Τέλος, επιλέγεται από τον χρήστη ο αριθμός των δραστικών ενώσεων που πρέπει να ταιριάζει με το φαρμακοφόρο μοντέλο που θα δημιουργηθεί.
- 4. Βαθμολόγηση φαρμακοφόρων μοντέλων:** Στο βήμα αυτό, επιτυγχάνεται η ευθυγράμμιση όλων των μορίων στο μοντέλο. Τα μοντέλα κατατάσσονται βάσει μιας συνάρτησης η οποία εξαρτάται από:
- ✓ την ποιότητα της ευθυγράμμισης (RMSD)
 - ✓ τον ορισμό ενός διανύσματος που μετρά την απόκλιση της γωνίας μεταξύ των διανυσματικών χαρακτηριστικών στα μόρια, και
 - ✓ τον ορισμό μιας βαθμολόγησης βασισμένης στην αλληλοεπικάλυψη των στερεοχημικών μοντέλων των βαρέων ατόμων σε κάθε ζεύγος μορίων.
- 5. Δημιουργία Μοντέλου QSAR:** Το σύνολο των ενώσεων χωρίζεται τυχαία σε δύο ομάδες, την ομάδα εκπαίδευσης και την ομάδα δοκιμής, με αναλογία που ορίζεται από τον χρήστη. Οι δομές ευθυγραμμίζονται στο βέλτιστο φαρμακοφόρο και δημιουργείται ένα ορθογώνιο πλέγμα που περιστοιχίζει τα ευθυγραμμισμένα μόρια. Η μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της τυπικής απόκλισης. Όπως και στις μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA, οι ευνοϊκές και μη τοποθεσίες αναπαρίστανται με επιφάνειες (κύβοι) διαφορετικών χρωμάτων

Η διαμορφωτική ανάλυση του προσδέτη αποτελεί σπουδαίο τμήμα της διαδικασίας για την κατασκευή φαρμακοφόρων. Αυτή στοχεύει στην εύρεση της διαμόρφωσης που προσδένεται στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα και είναι συνεπώς υπεύθυνη για τη βιολογική δράση. Η θεωρητική διαμορφωτική ανάλυση αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στην αναζήτηση πολλών και διαφορετικών δομών, δεδομένου ότι η φασματοσκοπία NMR δίνει μία μόνο

βιοδραστική ανάλυση, ενώ η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ πολλές φορές δεν αντιπροσωπεύει το βιολογικό περιβάλλον.

Τα στατιστικά στοιχεία ενός μοντέλου 3D-QSAR που προκύπτουν μέσω του λογισμικού PHASE είναι τα εξής:

- ✓ SD (Standard Deviation): Είναι η τυπική απόκλιση της παλινδρόμησης. Πρόκειται δηλαδή για το RMS σφάλμα (τετραγωνική ρίζα των μέσων όρων των τετραγώνων των σφαλμάτων) στις τιμές δραστηκότητας, όπως κατανέμονται σε $n-m-1$ βαθμούς ελευθερίας (n = ενώσεις, m = παράγοντες PLS).
- ✓ R^2 (R-squared): Είναι ο συντελεστής καθορισμού για την παλινδρόμηση. Για παράδειγμα, όταν η τιμή του R^2 ισούται με 0,80, σημαίνει ότι το μοντέλο «αιτιολογεί» το 80% της διασποράς στις παρατηρούμενες δραστηκότητες. Η τιμή του R^2 κυμαίνεται πάντα μεταξύ 0 και 1, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 0,80 θεωρούνται ικανοποιητικές.
- ✓ F (F-ratio): Είναι η αναλογία μεταξύ της διασποράς των τιμών στο μοντέλο προς τις παρατηρούμενες τιμές δραστηκότητας. Στατιστικά, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του F, τόσο πιο σημαντική είναι η παλινδρόμηση.
- ✓ P: Είναι το επίπεδο σημαντικότητας του F. Μικρές τιμές P σηματοδοτούν ένα ικανοποιητικό μοντέλο. Για παράδειγμα, μία τιμή του P ίση με 0,05, σημαίνει ότι το F είναι έγκυρο στο 95%.
- ✓ Σταθερότητα (Stability): Είναι η σταθερότητα των προβλέψεων του μοντέλου όταν αλλάζει η ομάδα εκπαίδευσης. Η μέγιστη τιμή που μπορεί να πάρει είναι 1. Ο παράγοντας αυτός έχει σημασία για τη σύγκριση μοντέλων από διαφορετικές φαρμακοφόρες υποθέσεις.
- ✓ RMSE: Είναι το RMS σφάλμα (τετραγωνική ρίζα των μέσων όρων των τετραγώνων των σφαλμάτων) στις προβλέψεις της ομάδας δοκιμής.
- ✓ Q^2 (Q-squared): Άμεσα ανάλογο του R^2 , αλλά βασίζεται στις προβλέψεις της ομάδας δοκιμής. Σημειώνεται ότι το Q^2 μπορεί να λάβει αρνητικές τιμές, όταν η διασπορά στα σφάλματα είναι μεγαλύτερες από τη διασπορά στις παρατηρούμενες τιμές δραστηκότητας. Τιμές μεγαλύτερες του 0,65 θεωρούνται ικανοποιητικές.
- ✓ Pearson-R: Είναι η τιμή της συσχέτισης μεταξύ της προβλεπόμενης και παρατηρούμενης τιμής δραστηκότητας για την ομάδα δοκιμής.

Πρέπει να τονιστεί ότι η τιμή του R^2 πάντα αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των παραγόντων PLS, ενώ το ίδιο δεν είναι απαραίτητα ότι ισχύει και για την τιμή του Q^2 .

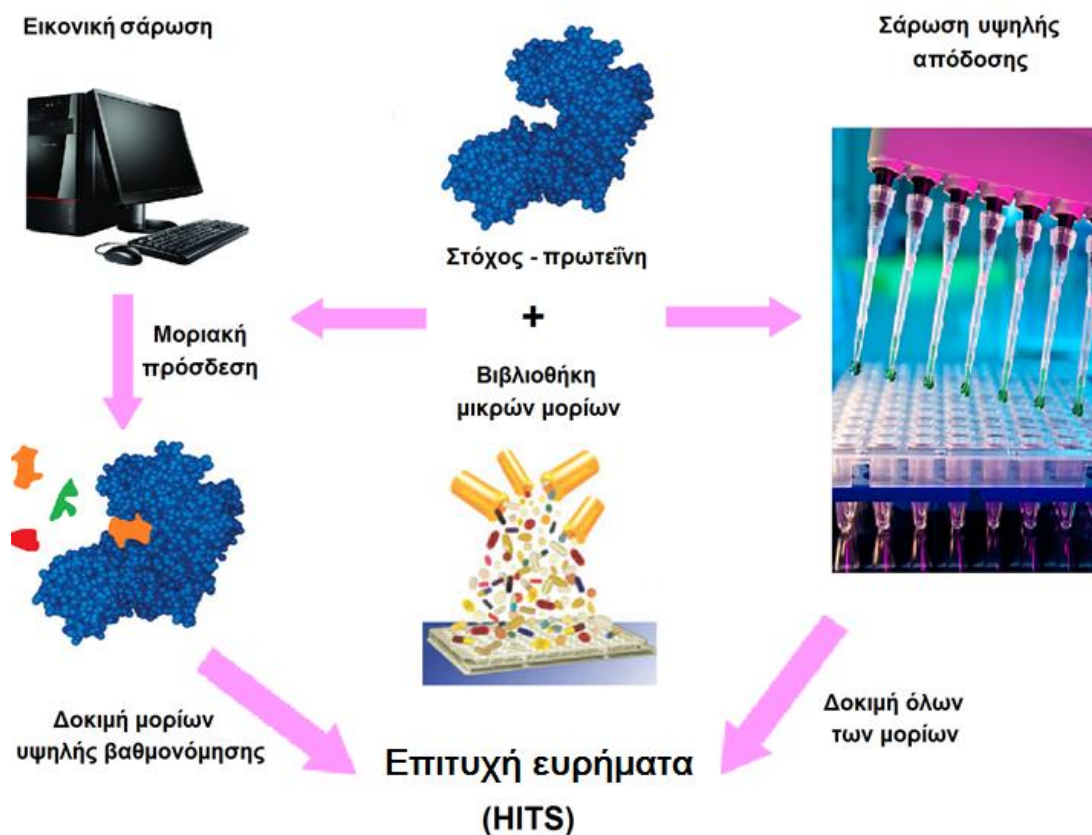
Τα δύο λογισμικά, CoMFA/CoMSIA της Tripos και το PHASE της Schrödinger, μπορούν να συνδυαστούν ώστε να εξαχθεί ένα μοντέλο 3D-QSAR με τη μεθοδολογία του CoMFA/CoMSIA, που όμως η ευθυγράμμιση των μορίων έχει πραγματοποιηθεί στην υπόθεση κοινού φαρμακοφόρου μοντέλου κατά τη διαδικασία του PHASE.

3.7 Εικονική Διαλογή

Όπως περιγράφεται από τον Clark, ο Horvath ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τη φράση «Virtual Screening (VS)» - Εικονική Διαλογή (Σάρωση), το 1997.^{209, 210} Μετά από αυτή τη δημοσίευση, μία εντυπωσιακή αύξηση των δημοσιεύσεων αποδεικνύεται (από δεδομένα που λαμβάνονται από το 1997 έως το 2008), που περιγράφει την ανάπτυξη και την εφαρμογή των τεχνολογιών εικονικής διαλογής. Το 1998, οι Stahl, Walters και Murcko έδωσαν τον πρώτο περιγραφικό όρο για την εικονική διαλογή. Πρόκειται για την ανάλυση μεγάλων βιβλιοθηκών που περιέχουν χημικές ενώσεις με τη χρήση υπολογισμών υψηλής απόδοσης, με σκοπό την εύρεση νέων υποψήφιων φαρμάκων.²¹¹ Σκοπός της εικονικής διαλογής, πιο συγκεκριμένα, είναι η εύρεση νέων δομών που δεσμεύονται στην πρωτεΐνη-στόχο.

Στο πλαίσιο της εικονικής διαλογής χρησιμοποιούνται υπολογιστικά μοντέλα έτσι ώστε να γίνει προσομοίωση των φαρμακευτικών ιδιοτήτων μιας ουσίας. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται η δοκιμή πολύ μεγαλύτερου αριθμού υποψήφιων φαρμάκων σε σύγκριση με τη μέθοδο του εργαστηρίου. Για αυτόν τον λόγο, η εικονική διαλογή θεωρείται η *in silico* (υπολογιστική) ανάλογη μέθοδος της διαλογής υψηλής απόδοσης (High Throughput Screening, HTS) (Σχήμα 3.13). Μάλιστα, σε μία μελέτη από τον Doman *et al.* έχει βρεθεί ότι η εικονική διαλογή παρέχει επιτυχέστερα αποτελέσματα από την πειραματική διαλογή ενώσεων.²¹² Έχει αναδειχθεί ως μία αξιόπιστη, αποδοτική οικονομικά και λόγω εξοικονόμησης χρόνου τεχνική ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Η

εικονική διαλογή έχει ήδη παίξει ένα σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη μερικών ενώσεων που είναι τώρα στην κλινική φάση τους ή ακόμα και στην αγορά.

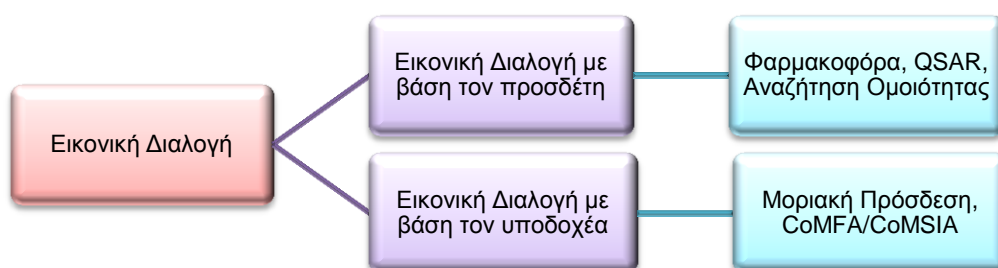


Σχήμα 3.13: Γραφική σύγκριση εικονικής διαλογής και διαλογής υψηλής απόδοσης.

Η παραπάνω παρατήρηση φυσικά, δεν δείχνει ότι δεν υπάρχουν άλλες προκλήσεις που απομένουν να ξεπεραστούν από τους ερευνητές που ασχολούνται με την εικονική διαλογή. Υπάρχει μια αυξανόμενη ανάγκη για ενσωμάτωση πολλών πληροφοριακών πόρων και την οικοδόμηση ενός συστήματος ώστε να στηρίξει συναινετικά το αποτέλεσμα πολλών στρατηγικών εικονικής διαλογής. Η εικονική διαλογή συνεχίζει να εξελίσσεται και εν τω μεταξύ, είναι σοφό να εξερευνηθούν όσες προσεγγίσεις είναι δυνατόν ώστε να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα ανάκτησης μεγαλύτερου αριθμού νέων δραστικών χημειοτύπων. Διαφορετικοί αλγόριθμοι μηχανικής μάθησης έχουν αναπτυχθεί προς την κατεύθυνση αυτή με στόχο τη αύξηση της αξιοπιστίας και τα ποσοστά επιτυχίας. Όταν μεγάλες βάσεις δεδομένων με εικονικές δομές ή *de novo* σχεδιασμό των ενώσεων συμμετέχουν στη διαδικασία εικονικής διαλογής, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στον τομέα της προσβασιμότητας σύνθεσης των προτεινόμενων ενώσεων. Μερικές

από τις προτεινόμενες δομές θα μπορούσε να είναι αρκετά περίπλοκες και ως εκ τούτου να είναι δύσκολο να συντεθούν εάν απαιτείται σύνθεση με πολλά στάδια και προσεκτικά ελεγχόμενες αντιδράσεις. Συνθετικοί χημικοί και ειδικοί της Χημειοπληροφορικής μπορούν να συνεργαστούν στενά και να εξασφαλιστεί η προσβασιμότητα σύνθεσης των προτεινόμενων ενώσεων με επακόλουθη εύρεση νέων ενώσεων, μορίων-οδηγών (hit compounds).

Μέχρι σήμερα, αρκετές μελέτες έχουν δημοσιευθεί εξαιτίας των μεγάλων συνόλων δεδομένων που διατίθενται, καθώς έχει αναφερθεί και μια ποικιλία από τεχνικές και ροές εργασίας, προκειμένου να ιεραρχούνται τα πιθανά ευρήματα. Οι τεχνικές εικονικής διαλογής που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό πιθανών ισχυρών αναστολέων μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: (α) εικονική διαλογή με βάση τον προσδέτη (Ligand-based Virtual Screening, LBVS), και (β) εικονική διαλογή με βάση τη δομή του υποδοχέα-στόχου (Structure-based Virtual Screening, SBVS) (Σχήμα 3.14).^{213, 214}



Σχήμα 3.14: Τεχνικές της εικονικής διαλογής με σκοπό την ανάπτυξη νέων ισχυρών αναστολέων.

Στην πρώτη κατηγορία, διερευνώνται τα βιολογικά δεδομένα με σκοπό τον εντοπισμό γνωστών δραστικών ή αδρανών ενώσεων που θα χρησιμοποιηθούν για την ανάκτηση άλλων δυνητικά δραστικών μορίων με βάση τις μετρήσεις ομοιότητας, τα κοινά φαρμακοφόρα και τις περιγραφικές τιμές. Στις τεχνικές εικονικής διαλογής με βάση τον υποδοχέα, χρησιμοποιείται η γνώση σχετικά με τον υποδοχέα-στόχο, και ως εκ τούτου, οι υποψήφιοι προσδέτες προσδένονται στον στόχο χρησιμοποιώντας υπολογιστικούς αλγόριθμους και λειτουργίες βαθμολόγησης για την εκτίμηση της πιθανότητας ότι ο προσδέτης θα προσδένεται στον στόχο με υψηλή συγγένεια.

3.7.1 Βάσεις Δεδομένων – Χημικές Βιβλιοθήκες

Η εικονική διαλογή πραγματοποιείται αναζητώντας τις κατάλληλες ενώσεις μέσα από βιβλιοθήκες χημικών ενώσεων. Τέτοιες βιβλιοθήκες είναι εμπορικά διαθέσιμες και μπορούν να περιέχουν ενώσεις που έχουν συντεθεί αλλά ακόμα και δομές που δεν έχουν προχωρήσει στη σύνθεσή τους. Οποιοδήποτε μόριο που μπορεί να διανοηθεί ένας ερευνητής θεωρητικά μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της εικονικής διαλογής. Αυτό έχει οδηγήσει στην έννοια του χημικού χώρου (chemical space) όπου συμπεριλαμβάνεται μία πλήρης συλλογή όλων των πιθανών, πραγματικών και φανταστικών, μορίων που μπορούν να παραχθούν.²¹⁵ Γνωστές χημικές βιβλιοθήκες μικρών μορίων είναι η ChEMBL, η PubChem, η SureChEMBL, η DrugBank, η HitFinder, η ZINC και άλλες.

3.7.1.1 Η βάση δεδομένων της ChEMBL

Η ChEMBL είναι μία βάση δεδομένων που περιέχει πληροφορίες, σχετικά με τη λειτουργία, την πρόσδεση και τις ADMET (Απορρόφησης – Κατανομής – Μεταβολισμού – Απέκκρισης – Τοξικότητας) ιδιότητες ενός μεγάλου αριθμού βιοδραστικών ενώσεων που εμφανίζουν φαρμακο-ομοιότητα. Όλα τα δεδομένα αντλούνται από τη βιβλιογραφία, πάντα από διεθνείς επιστημονικές δημοσιεύσεις που έχουν κριθεί, σε ταχτική βάση και στη συνέχεια επιμελούνται και τυποποιούνται ώστε να μεγιστοποιηθεί η ποιότητά τους και η χρησιμότητά τους.²¹⁶ Μέχρι σήμερα, η βάση δεδομένων της ChEMBL περιλαμβάνει πάνω από 12 εκατομμύρια μετρήσεις δραστηριότητας για περισσότερο από 1,5 εκατομμύριο ενώσεις και 10.000 πρωτεϊνικούς στόχους.²¹⁷ Τα δεδομένα της ChEMBL διατίθενται και η λήψη τους μπορεί να γίνει ελεύθερα από την ιστοσελίδα της, στη διεύθυνση <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (Σχήμα 3.15).

Σχήμα 3.15: Η αρχική σελίδα του ιστοτόπου της βάσης δεδομένων της ChEMBL.

3.7.1.2 Η βάση δεδομένων της PubChem

Η PubChem είναι μια δωρεάν διαθέσιμη βάση δεδομένων που αρχειοθετούνται οι χημικές δομές μικρών οργανικών μορίων καθώς και οι πληροφορίες για τις βιολογικές τους δράσεις στο πλαίσιο του χάρτη πορείας για την πρωτοβουλία ιατρικής έρευνας του Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας (NIH) των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Μέχρι σήμερα, η PubChem είναι η μεγαλύτερη στη διάθεση του κοινού μοριακή βάση δεδομένων με εκατομμύρια καταχωρήσεις.²¹⁸

3.7.1.3 Η βάση δεδομένων της SureChEMBL

Η SureChEMBL βάση δεδομένων (open patent data) είναι μια συλλογή με περισσότερες από 15 εκατομμύρια χημικές δομές που έχουν αντληθεί από τα διπλώματα ευρεσιτεχνίας πλήρους κειμένου των Ηνωμένων Πολιτειών (US), το Ευρωπαϊκό Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας (EP) και του Παγκόσμιου Οργανισμού (WO) από την 1^η Ιανουαρίου 1976. Η βάση δεδομένων SureChEMBL, όπως και αυτή της ChEMBL, αποτελεί μέρος της οικογένειας της EMBL-EBI.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

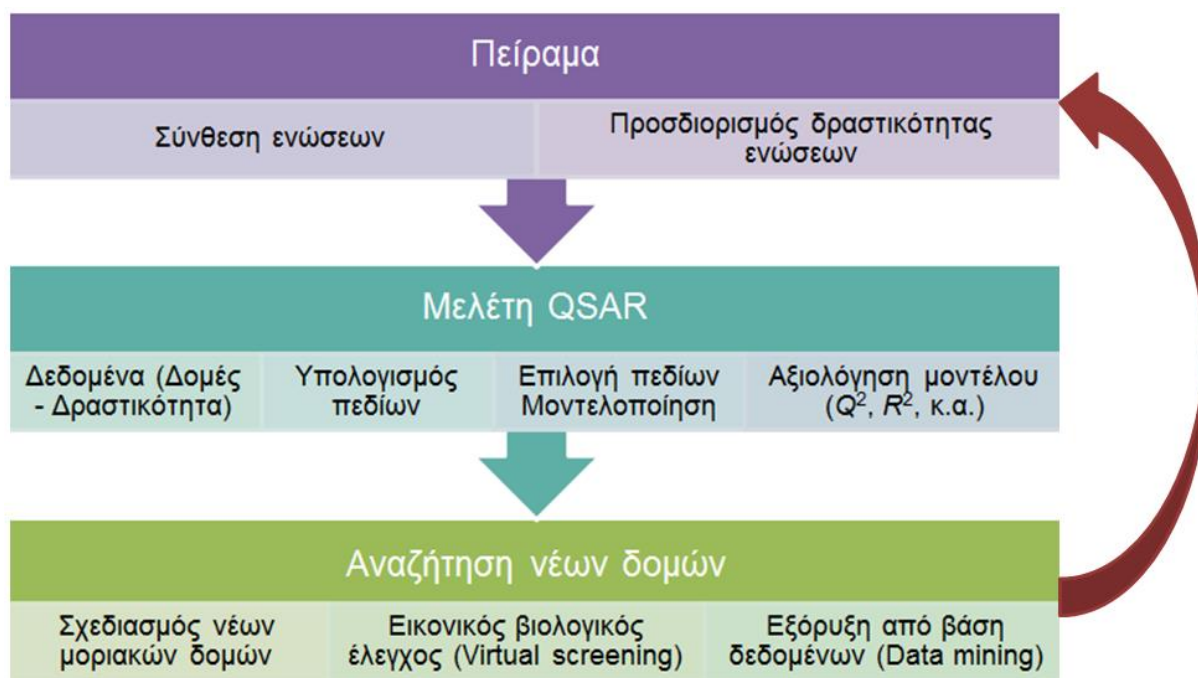
Σκοπός της διατριβής αποτέλεσε η εξερεύνηση χημικών βάσεων δεδομένων προς ανακάλυψη καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C και της μεσογειακής αναιμίας (β-θαλασσαιμίας) με τη χρήση 3D-QSAR.

Είναι γνωστό ότι η διαδικασία για την ανάπτυξη ενός φαρμάκου εξακολουθεί να είναι χρονοβόρα και δαπανηρή και ότι απαιτείται η συμμετοχή επιστημόνων από διαφορετικά επιστημονικά πεδία. Για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C και της μεσογειακής αναιμίας, όπου ακόμα δεν υπάρχει αποτελεσματική φαρμακευτική αγωγή, εκατοντάδες νέες ενώσεις έχουν συντεθεί, ώστε να ελεγχθούν για τη βιολογική τους δράση. Επιτυχία στις προκλινικές δοκιμές (*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*) οδηγεί στο στάδιο των κλινικών μελετών (στον ανθρώπινο οργανισμό). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οι ενώσεις μπορούν να τροποποιηθούν δομικά ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα.

Ένας τρόπος για να ελαττωθεί το μεγάλο κόστος και ο χρόνος παραγωγής κάποιου φαρμάκου είναι να επιταχυνθεί η διαδικασία ανακάλυψης των χημικών δομών που θα εισέλθουν στις προκλινικές και κλινικές δοκιμές. Η νέα προσέγγιση για τον σχεδιασμό φαρμάκων μέσω του *in silico* ορθολογικού σχεδιασμού (Rational Drug Design) στοχεύει προς αυτή την κατεύθυνση και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια.

Η έρευνα μέσω του Ορθολογικού Σχεδιασμού επιτελείται με κυκλική πορεία: ξεκινάει από τη σύνθεση και τον βιολογικό έλεγχο ενώσεων και καταλήγει πάλι σε σύνθεση και βιολογικό έλεγχο νέων ενώσεων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Κεντρικό ρόλο στην προσπάθεια σύνθεσης μικρότερου αριθμού ενώσεων που ελέγχονται για τη βιολογική τους δράση διαδραματίζουν οι μελέτες των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης (Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR).

Στο παρακάτω σχήμα αναπαριστάται συνοπτικά το διάγραμμα σχεδιασμού μοριακών δομών με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, συνδυάζοντας το πειραματικό και το υπολογιστικό μέρος μιας μελέτης με χρήση του 3D-QSAR, για την αναζήτηση νέων δομών, ως μελλοντικά υποψήφια φάρμακα.



Η παρούσα διδακτορική διατριβή στηρίζεται σε μελέτες 3D-QSAR και στη δημιουργία τριδιάστατων μοντέλων πρόβλεψης χρησιμοποιώντας τις μεθοδολογίες CoMFA και CoMSIA, και αυτή του φαρμακοφόρου μοντέλου, ώστε να αναζητηθούν νέες βελτιωμένες δομές αξιοποιώντας τα αποτελέσματα των μελετών. Κατά τη διδακτορική διατριβή εφαρμόζονται τα βήματα της μελέτης QSAR και αναζήτησης νέων δομών (όπως περιγράφεται στο παραπάνω σχήμα).

Ξεκινώντας πάντα με δεδομένα από τη βιβλιογραφία, όπου περιέχουν συντεθειμένες και βιολογικά αξιολογημένες ενώσεις (πρώτο βήμα στο παραπάνω σχήμα), αναπτύσσονται μελέτες QSAR και δημιουργούνται μοντέλα τριών διαστάσεων, όπου και αξιολογούνται για την ισχύ τους με διάφορους τρόπους επικύρωσης (δεύτερο βήμα στο παραπάνω σχήμα). Τα γραφικά αποτελέσματα των μελετών QSAR, οι ισοϋψείς χάρτες τριών διαστάσεων παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τα δομικά χαρακτηριστικά που είναι υπεύθυνα για την επιθυμητή βιολογική τους δράση και αξιοποιούνται περαιτέρω (τρίτο βήμα στο παραπάνω σχήμα). Ως εκ τούτου, με την εφαρμογή μελετών 3D-QSAR προτείνονται προς σύνθεση και αξιολόγηση νέες δομές με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, ή/και εντοπίζονται από βάσεις δεδομένων μέσω της εικονικής διαλογής (Virtual Screening).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΑΣΗΣ CHEMBL ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΙΝΔΟΛΙΟΥ ΠΟΥ ΔΡΟΥΝ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΟΥ ΗCV

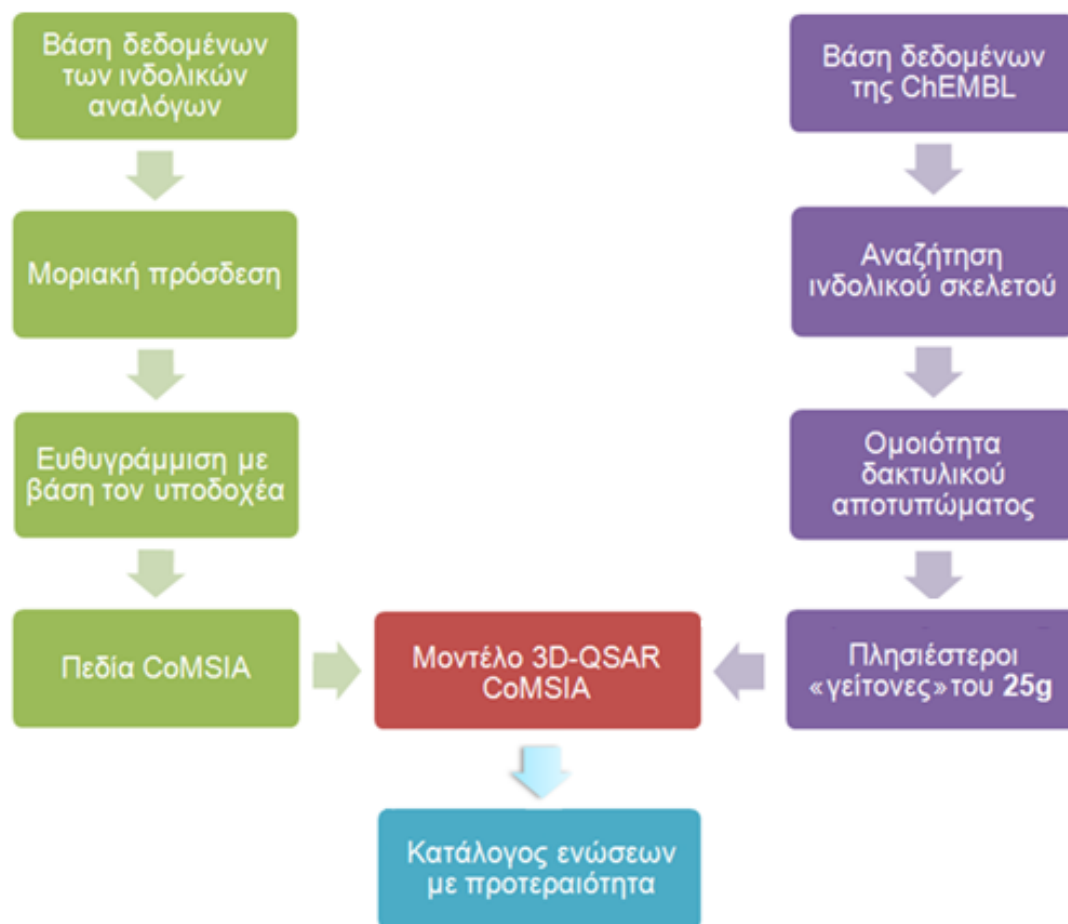
4.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ροή εργασίας πολλαπλών βημάτων, στην οποία συνδυάζονται η μοριακή πρόσδεση, η μέθοδος του 3D-QSAR CoMSIA, η αναζήτηση ομοιότητας και η εικονική διαλογή. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι αφενός να γίνουν κατανοητά τα δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την πρόσδεση 41 *N*-υποκατεστημένων παραγώγων του ινδολίου στην RNA πολυμεράση NS5B GT1b του ΗCV, που χρησιμοποιείται ως υποδοχέας, και αφετέρου να εντοπιστούν νέοι αναστολείς της πολυμεράσης. Τα 41 *N*-υποκατεστημένα ανάλογα του ινδολίου έχουν συντεθεί και αξιολογηθεί για τη δραστηριότητα τους σε δοκιμασίες αναστολής του υπογονιδιωματικού αντίγραφου της αρχικής αντιγραφής του ΗCV χρησιμοποιώντας ένα γονίδιο-ανταποκριτή της λουσιφεράσης,²¹⁹ αλλά μέχρι σήμερα καμία ένωση του συνόλου δεν έχει συγκρυσταλλωθεί με την RNA πολυμεράση του ιού.

Αρχικά, έγιναν προσπάθειες όλες οι ενώσεις να προσδεθούν στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και συγκεκριμένα στην «παλάμη» II, θεωρώντας την ως την πιο πιθανή κοιλότητα πρόσδεσης. Στη συνέχεια, ο προσανατολισμός και η διαμόρφωση (πόζα) πρόσδεσης της κάθε ένωσης χρησιμοποιήθηκε σε μία ευθυγράμμιση με βάση τον υποδοχέα προκειμένου να παραχθούν τα πεδία CoMSIA. Το μοντέλο 3D-QSAR CoMSIA που αναπτύχθηκε, επικυρώθηκε για να διαπιστωθεί η αξιοπιστία του μοντέλου.

Η υπολογιστική ροή εργασίας που ακολουθήθηκε με σκοπό την εξαγωγή του μοντέλου 3D-QSAR CoMSIA απεικονίζεται γραφικά στο Σχήμα 4.1. Στα αποτελέσματα της προτεινόμενης αυτής ροής εργασίας απεικονίζεται η συσχέτιση των δομικών χαρακτηριστικών που φέρουν οι ενώσεις του συνόλου που μελετάται και της ανασταλτικής τους δράση στην RNA πολυμεράση του ιού της ηπατίτιδας C. Μάλιστα, η δυνατότητα πρόβλεψης και η ισχύς του μοντέλου καθορίστηκαν με ενώσεις που είναι γνωστή η δραστηριότητά τους,

και κατά συνέπεια, το μοντέλο μπορεί να χρησιμεύσει ως ένα πολύτιμο εργαλείο ορθολογικού σχεδιασμού για τη σύνθεση ισχυρότερων αναστολέων της RNA πολυμεράσης του HCV.



Σχήμα 4.1: Η υπολογιστική ροή εργασίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τον εντοπισμό νέων ενώσεων ως αναστολείς του HCV. Αρχικά, τα 41 *N*-υποκατεστημένα ανάλογα ινδολίου προσδένονται στη δραστική θέση της πολυμεράσης του HCV για τον υπολογισμό της βαθμολογίας πρόσδεσης. Η πόζα πρόσδεσης του κάθε αναστολέα χρησιμοποιείται σε μία ευθυγράμμιση με βάση τον υποδοχέα για τη δημιουργία των πεδίων CoMSIA. Στη συνέχεια, εξάγεται το μοντέλο 3D-QSAR CoMSIA, ώστε να υπολογιστεί με ακρίβεια η δραστικότητά τους και, τέλος, ανάλογα ινδολίου που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων της ChEMBL έρχονται σε προτεραιότητα για την εικονική διαλογή.

Τέλος, το παραχθέν *in silico* μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της δραστικότητας νέων ενώσεων πριν από τη σύνθεση και βιολογική αποτίμησή τους, μέσω της εικονικής διαλογής. Για τον σκοπό αυτόν, έγινε χρήση της βάσης δεδομένων της ChEMBL, όπου αναζητήθηκαν ενώσεις με δομή ανάλογης αυτής των ενώσεων του συνόλου που μελετάται, και συγκεκριμένα

του ινδολίου. Νέες ενώσεις εξήχθησαν μέσω του μοντέλου 3D-QSAR CoMSIA, των οποίων η δραστηριότητα προβλέπεται να είναι ισχυρή, και έτσι, μπορεί να τους δοθεί προτεραιότητα για βιολογική εξέταση.

4.2 Επιλογή και προετοιμασία της κρυσταλλογραφικής δομής της RNA πολυμεράσης του HCV

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, δεν υπάρχει κρυσταλλογραφική δομή ακτίνων Χ της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης του HCV συγκρυσταλωμένη με ανάλογο ινδολίου. Για τον λόγο αυτόν, έγινε αναζήτηση από την Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων RCSB προς εξεύρεση μιας κρυσταλλογραφικής δομής ακτίνων Χ της πολυμεράσης NS5B GT1b του HCV με άλλο μικρό μόριο ως αναστολέα. Η πιο πρόσφατη μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί με την υψηλότερη ανάλυση ήταν η κρυσταλλογραφική δομή με κωδικό PDB: 4KB7, και επιλέχθηκε ως ο υποδοχέας-στόχος στα πειράματα μοριακής πρόσδεσης.^{220, 221}

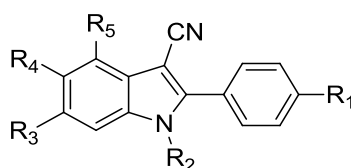
Το ένζυμο, αρχικά, προετοιμάστηκε με τη χρήση της εφαρμογής «Protein Preparation Wizard» της Schrödinger.¹⁴² Η εφαρμογή αυτή είναι μία συλλογή από εργαλεία για την προετοιμασία τριδιάστατων μοριακών δομών από κρυσταλλογραφικές δομές πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας το εργαλείο «Preprocess and analyze structure» ελέγχθηκε η σειρά των δεσμών, προστέθηκαν όλα τα άτομα υδρογόνου, ελέγχθηκαν όλοι οι δισουλφιδικοί δεσμοί, ενώ όλα τα μόρια νερού σε απόσταση μεγαλύτερη από 5 Å από την ενεργό θέση του ενζύμου διαγράφηκαν. Παρέμειναν δέκα μόρια νερού στο ενεργό κέντρο του ενζύμου για τους μετέπειτα υπολογισμούς. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας την εφαρμογή Erik 2.3¹⁴² προβλέφθηκε ο ιοντισμός και η ταυτομέρεια των αμινοξέων του ενζύμου.^{142, 222} Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου χρησιμοποιώντας το εργαλείο «H-bond assignment» για τις ομάδες υδροξυλίου των αμινοξέων Asn και Gln, καθώς και για τον δακτύλιο του ιμιδαζολίου στο αμινοξύ His. Τέλος, χρησιμοποιώντας την εφαρμογή «Impref» και το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005,¹³⁸ βελτιστοποιήθηκαν οι θέσεις των ατόμων υδρογόνου του ενζύμου διατηρώντας όλα τα υπόλοιπα άτομα αμετακίνητα.

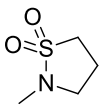
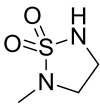
Είναι γνωστό ότι η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση NS5B του HCV παίζει κεντρικό ρόλο στην αντιγραφή του RNA ιού, και για αυτόν τον λόγο έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές κατηγορίες αναστολέων της NS5B.²²³ Η πλειονότητα των μη-νουκλεοζιτικών αναστολέων της NS5B που έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα, έχει δειχθεί ότι προσδένονται σε μία από τις τέσσερις κοιλότητες πρόσδεσης του ενζύμου, την «παλάμη» II.^{15, 224} Η πρωτεΐνη NS5B, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αποτελείται από 591 αμινοξέα και περιέχει τις μεταλλάξεις L47Q, F101Y, K114R και N316Y. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν δείξει ότι η θέση της «παλάμης II» είναι στρατηγικά τοποθετημένη δίπλα στο διατηρημένο καταλυτικό μοτίβο GDD (Glu-Asp-Asp), στον κόμβο που σχηματίζεται από το υπόστρωμα εισερχόμενου τριφωσφορικού νουκλεοτιδίου (NTP) και τα κανάλια του RNA.⁷⁷ Πρόκειται για τη βιοδραστική θέση, η οποία είναι υπεύθυνη για την εκκίνηση του RNA, την έναρξη, και την επιμήκυνσή του. Η κοιλότητα της «παλάμης» II αποτελείται από μια εξαιρετικά διατηρημένη υδρόφοβη σχισμή που σχηματίζεται μεταξύ του πλούσιου σε σερίνη S365 βρόχου, CSS, και την έλικα της παλάμης, Pro197-Ser210. Τυπικά, αυτή η κοιλότητα επάγει την πρόσδεση του προσδέτη, όπου οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Arg200 και Ser365 περιστρέφονται για να φιλοξενήσουν αναστολείς.⁷⁷

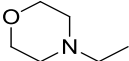
4.3 Σχεδιασμός και προετοιμασία των αναστολέων

Τα 41 *N*-υποκατεστημένα παράγωγα του ινδολίου της παρούσας μελέτης (Πίνακας 4.1) σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το σχεδιαστικό πακέτο μοριακής μοντελοποίησης του SYBYL 8.0.²²⁵ Όλα τα άτομα υδρογόνου προστέθηκαν και, στη συνέχεια, τα μόρια ελαχιστοποιήθηκαν ενεργειακά χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων της Tripos και όλους τους αλγόριθμους ελαχιστοποίησης της ενέργειας με σειρά: Steepest Descent, Powell και Conjugate Gradient (με βαθμίδα ελαχιστοποίησης 0,01 kcal/mol·Å). Τέλος, υπολογίστηκαν τα φορτία Gasteiger-Hückel για όλες τις ενώσεις.

Πίνακας 4.1: Οι μοριακές δομές των 41 *N*-υποκατεστημένων παραγώγων ινδολίου.



ID	Ένωση*	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	2	OMe	Et	OMe	H	H
2	7a	OH	Et	OMe	H	H
3	7b	OEt	Et	OMe	H	H
4	7c	NH ₂	Et	OMe	H	H
5	7d	SOMe	Et	OMe	H	H
6	7e	SO ₂ Me	Et	OMe	H	H
7	7f	CONH ₂	Et	OMe	H	H
8	8a	NHCO ₂ Et	Et	OMe	H	H
9	8b	NHCOMe	Et	OMe	H	H
10	8c	NHCOPh	Et	OMe	H	H
11	8d	NHSO ₂ Et	Et	OMe	H	H
12	8e	NHSO ₂ <i>i</i> -Pr	Et	OMe	H	H
13	9		Et	OMe	H	H
14	12		Et	OMe	H	H
15	16	NHSO ₂ Et	Et	H	H	H
16	17	NHSO ₂ <i>i</i> -Pr	Et	H	OMe	H
17	18	NHSO ₂ Et	Et	OMe	OMe	H
18	19	NHSO ₂ Et	Et	H	Cl	H
19	20	NHSO ₂ Et	Et	H	F	H
20	21	NHSO ₂ Et	Et	H	H	Cl

21	22	NHSO ₂ Et	Et	OH	H	H
22	23	NHSO ₂ Et	Et	CF ₃	H	H
23	24	NHSO ₂ Et	Et	OEt	H	H
24	25a	NHSO ₂ Et	Et	OCHF ₂	H	H
25	25b	NHSO ₂ Et	<i>i</i> -Pr	OCHF ₂	H	H
26	25c	NHSO ₂ Et	<i>c</i> -PrCH ₂	OCHF ₂	H	H
27	25d	NHSO ₂ <i>c</i> -Pr	<i>c</i> -PrCH ₂	OCHF ₂	H	H
28	25e	NHSO ₂ <i>c</i> -Pr	<i>c</i> -Bu	OCHF ₂	H	H
29	25f	NHSO ₂ <i>c</i> -Pr	<i>n</i> -Pr	OCHF ₂	H	H
30	25g	NHSO ₂ <i>c</i> -Pr	<i>i</i> -Pr	OCHF ₂	H	H
31	25h	NHSO ₂ <i>n</i> -Pr	Et	OCHF ₂	H	H
32	25i	NHSO ₂ <i>c</i> -Pr	Et	OCHF ₂	H	H
33	25j	NHSO ₂ <i>i</i> -Pr	Et	OCHF ₂	H	H
34	25k	NHSO ₂ <i>i</i> -Pr	<i>c</i> -PrCH ₂	OCHF ₂	H	H
35	26	Et	Et	OCH ₂ CH ₂ F	H	H
36	27	Et	Et	OCF ₃	H	H
37	29	Et	Et	COOH	H	H
38	30	Et	Et	CONH ₂	H	H
39	31	Et	Et	CH ₂ OH	H	H
40	32	Et	Et	CH ₂ OMe	H	H
41	33	Et	Et		H	H

*Η αρίθμηση των ενώσεων της δεύτερης στήλης του πίνακα έχει αντληθεί από την αντίστοιχη βιβλιογραφία 219.

4.4 Μοριακή πρόσδεση με χρήση του αλγόριθμου Surflex-Dock

Για τη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος Surflex-Dock από το πακέτο μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.¹⁵⁸ Ο αλγόριθμος Surflex-Dock υποστηρίζει μία αυτοματοποιημένη διαδικασία ευέλικτης πρόσδεσης για τον προσδέτη βασισμένη σε προσέγγιση ενός

άκαμπτου υποδοχέα.¹⁵⁹ Ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί μια εξιδανικευμένη δραστική τοποθεσία προσδέτη που ονομάζεται «protomol», ως στόχο για τη δημιουργία διαμορφώσεων του κάθε μορίου. Οι διαμορφώσεις αυτές αποκτούν βαθμονόμηση χρησιμοποιώντας τη λειτουργία βαθμολόγησης Hammerhead που περιέχει τους όρους των κυρίαρχων υδρόφοβων και πολικών επαφών. Σε αυτή τη μελέτη, για την παραγωγή του «protomol», οι παράμετροι *threshold* και *bloat* αφέθηκαν στις προεπιλεγμένες τιμές 0,50 και 0 Å, αντίστοιχα. Η συνολική βαθμολογία πρόσδεσης εκφράζεται σε $-\log K_d$. Κατά τη μοριακή πρόσδεση δεν χρησιμοποιήθηκαν περιορισμοί.

Κατά συνέπεια και έπειτα από την προαναφερθείσα απαραίτητη προετοιμασία, τα 41 *N*-υποκατεστημένα ανάλογα ινδολίου προσδέθηκαν στην «παλάμη» II της πολυμεράσης, κάθε ένωση έδωσε μία πόζα πρόσδεσης και σημειώθηκαν οι βαθμολογίες τους. Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Σημειώνεται ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή $-\log K_d$, τόσο πιο δραστική είναι η ένωση. Σύμφωνα με τα αριθμητικά αποτελέσματα, δεν βρέθηκε πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ βαθμολογίας πρόσδεσης και δραστικότητας των ενώσεων (Σχήμα Π1, Παράρτημα II).

Πίνακας 4.2: Οι τιμές EC_{50} και pEC_{50} , οι βαθμολογίες μοριακής πρόσδεσης ($-\log K_d$), οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές pEC_{50} και η διαφορά τους από τις πειραματικές για τα *N*-υποκατεστημένα παράγωγα ινδολίου.

ID	EC_{50} (μM)**	$-\log K_d$	Πειραματική pEC_{50}	Προβλεπόμενη pEC_{50}	Διαφορά
1	4,1	6,6499	5,3872	5,394	-0,0068
2	6,1	5,5697	5,2147	5,211	0,0037
3*	3,0	6,9588	5,5229	5,431	0,0919
4	7,7	5,4066	5,1135	5,042	0,0715
5	4,0	6,1834	5,3979	5,442	-0,0441
6*	2,6	6,2159	5,5850	5,396	0,1890
7	7,8	5,4369	5,1079	5,008	0,0999
8	1,3	8,3353	5,8861	5,899	-0,0129

9*	1,3	6,9813	5,8861	5,334	0,5521
10*	>100	6,9717	~4	5,548	-
11	0,47	8,4014	6,3279	6,077	0,2509
12	0,65	8,0327	6,1871	6,163	0,0241
13	2,0	7,9639	5,6990	5,866	-0,1670
14*	0,90	7,7307	6,0458	5,818	0,2278
15	9,0	6,5306	5,0458	5,055	-0,0092
16*	7,4	8,1149	5,1308	5,865	-0,7342
17*	4,0	8,0993	5,3979	5,872	-0,4741
18	7,5	6,8257	5,1249	5,223	-0,0981
19	0,59	6,4013	6,2291	5,918	0,3111
20	3,5	5,8230	5,4559	5,585	-0,1291
21	2,0	7,6463	5,6990	5,670	0,0290
22	0,36	7,5286	6,4437	6,416	0,0277
23	0,53	10,1101	6,2757	6,405	-0,1293
24	0,29	9,4398	6,5376	6,588	-0,0504
25*	0,20	9,4231	6,6990	6,782	-0,0830
26	0,30	9,8861	6,5229	6,540	-0,0171
27*	0,17	8,8401	6,7696	6,860	-0,0904
28	0,19	11,2499	6,7212	6,703	0,0182
29	0,25	9,0900	6,6021	6,619	-0,0169
30	0,075	8,3688	7,1249	7,253	-0,1281
31	0,22	9,7806	6,6576	6,672	-0,0144
32	0,10	9,3106	7,0000	6,858	0,1420
33*	0,12	7,8926	6,9208	6,532	0,3888
34*	0,08	8,6412	7,0969	7,082	0,0149
35	0,59	10,1156	6,2291	6,235	-0,0059

36	0,17	8,8272	6,7696	6,765	0,0046
37	>11	7,8275	~4,95	5,360	-
38	9,0	7,9316	5,0458	5,155	-0,1092
39	3,5	8,1740	5,4559	5,507	-0,0511
40*	5,0	8,8153	5,301	5,949	-0,6480
41	3,0	10,7206	5,5229	5,518	0,0049

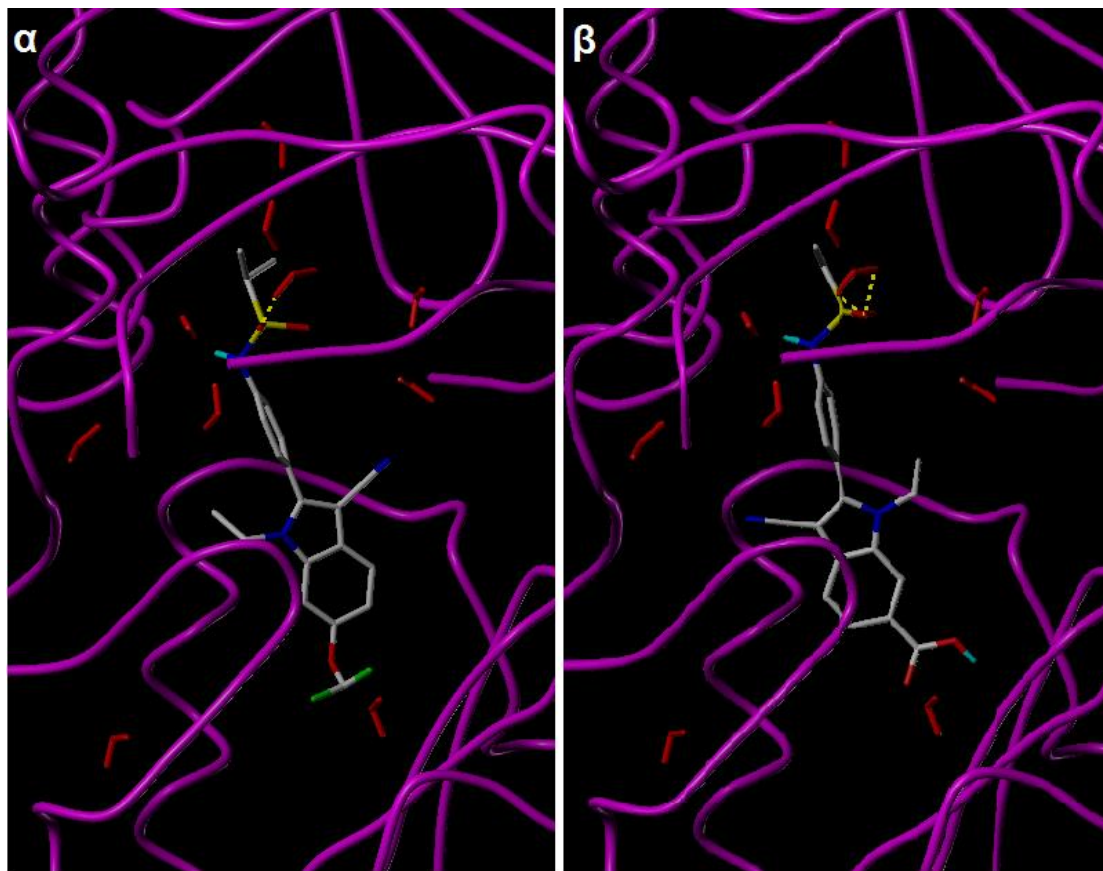
*Ενώσεις της ομάδας ελέγχου

**Τα κύτταρα Huh7 που φιλοξενούν ένα μονοσιστρονικό ρεπλικόνιο γονότυπου 1b του HCV απλώθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων (5.000 κύτταρα/φρεάτιο). Οι ενώσεις προστέθηκαν στις πλάκες με μια τελική συγκέντρωση 0,5% DMSO και οι πλάκες επώαστηκαν στους 37 °C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν 3 ημέρες μετά την χορήγηση της δόσης και το αντίγραφο RNA ποσοτικοποιήθηκε με την αντίδραση RT-PCR πραγματικού χρόνου και το GAPDH RNA ως γονίδιο αναφοράς.

Στην προσπάθεια να δοθεί εξήγηση στα *in silico* αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης, συγκρίνονται στο Σχήμα 4.2 τα αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης δύο παραγώγων, ενός δραστικού και ενός αδρανούς μορίου.

Όπως είναι φανερό, οι πόζες πρόσδεσης που υιοθετούν τα ανάλογα ινδολίου στη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα δεν είναι όμοιες. Ειδικότερα, ο προσανατολισμός της αδρανούς ένωσης (Σχήμα 4.2β) διαφέρει από αυτόν της δραστικής (Σχήμα 4.2α), καθώς το άτομο του αζώτου του ινδολικού δακτυλίου προσανατολίζεται προς το δεξί κεντρικό τμήμα της θέσης πρόσδεσης. Παρόλα αυτά, οι αντίστοιχες βαθμολογίες πρόσδεσης για τη δραστική και μη ένωση είναι σχεδόν ίδιες. Στον αλγόριθμο Surflex-Dock, τα αποτελέσματα πρόσδεσης περιέχουν τρεις πληροφορίες: τη συνολική βαθμολογία πρόσδεσης, την τιμή σύγκρουσης (crash value) και την πολική τιμή (polar value). Η συνολική βαθμολογία στον αλγόριθμο Surflex-Dock εκφράζει τις συγγένειες πρόσδεσης, οι οποίες περιλαμβάνουν τον υδρόφοβο, τον πολικό, και τον απωστικό όρο, και τους όρους εντροπίας και επιδιάλυψης. Η τιμή σύγκρουσης είναι ο βαθμός της ακατάλληλης εισχώρησης του προσδέτη στην πρωτεΐνη και της αλληλοεισχώρησης μεταξύ των ατόμων προσδέτη (self-clush) που διαχωρίζονται με περιστρεφόμενους δεσμούς. Οι βαθμολογίες σύγκρουσης κοντά στο 0 είναι πιο ευνοϊκές. Η πολική τιμή είναι η συνεισφορά των αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου και

γέφυρας άλατος με τη συνολική βαθμολογία. Η πολική τιμή μπορεί να είναι χρήσιμη για τον αποκλεισμό αποτελεσμάτων πρόσδεσης που δεν κάνουν δεσμούς υδρογόνου.²²⁶



Σχήμα 4.2: Τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης για α) ένα δραστικό παράγωγο (**25j**) και β) ένα μη δραστικό παράγωγο (**29**) με βαθμολογίες πρόσδεσης 7,89 και 7,83, αντίστοιχα.

Οι παραπάνω τιμές για τη δραστική ένωση **25j** και τη μη δραστική **29**, αντίστοιχα, έχουν ως εξής: Συνολική βαθμολογία πρόσδεσης = 7,8926, Τιμή σύγκρουσης = -2,1319, Πολική τιμή = 0,3960 (με έναν δεσμό υδρογόνου) και Συνολική βαθμολογία πρόσδεσης = 7,8275, Τιμή σύγκρουσης = -1,5800, Πολική τιμή = 0,7698 (με δύο δεσμούς υδρογόνου). Αυτό αιτιολογεί την απουσία της συσχέτισης μεταξύ των βαθμολογιών πρόσδεσης και της βιολογικής δραστηριότητας των ινδολικών παραγώγων. Ως εκ τούτου, η μοριακή πρόσδεση δεν μπόρεσε να εξηγήσει τέλεια τα βιολογικά δεδομένα της συγκεκριμένης σειράς.

4.5 Εξαγωγή του μοντέλου 3D-QSAR CoMSIA

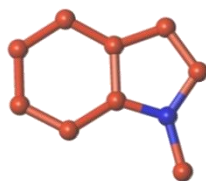
4.5.1 Ομάδα δεδομένων (Ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου)

Οι τιμές δραστηριότητας των 41 *N*-υποκατεστημένων ινδολικών παραγώγων, εκφρασμένες σε EC_{50} , μετατράπηκαν στον αντίστοιχο αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο pEC_{50} ($-\log EC_{50}$), και χρησιμοποιήθηκαν ως μεταβλητή απόκρισης στην ανάλυση CoMSIA. Το σύνολο των δεδομένων κατανεμήθηκε με τέτοιον τρόπο ώστε να ληφθεί μία αντιπροσωπευτική ομάδα εκμάθησης και ταυτόχρονα μία ομάδα ελέγχου.²²⁷⁻²³¹ Πιο συγκεκριμένα, η επιλογή των μορίων στην ομάδα εκμάθησης έγινε σύμφωνα με τη δομή και την κλίμακα της βιολογικής δραστηριότητας, έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνεται ένα ευρύ φάσμα δομών (από την άποψη των διαφορετικών υποκαταστατών, άτομα και δραστηριότητα) στους εκπροσώπους της ομάδας. Η κατανομή των τιμών δραστηριότητας για την ομάδα ελέγχου ακολουθεί την κατανομή των τιμών δραστηριότητας για την ομάδα εκμάθησης. Σύμφωνα με τους ερευνητές Golbraikh και Tropsha,²³¹ η προσέγγιση αυτή είναι ορθή, δεδομένου ότι αντιπροσωπευτικά σημεία της ομάδας ελέγχου πρέπει να είναι παρόμοια με εκείνα της ομάδας εκμάθησης, και αντιθέτως. Ο διαχωρισμός του συνόλου δεδομένων σε ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου έγινε με μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλογία, αυτή του 70:30.²³² Ως εκ τούτου, η ομάδα εκμάθησης (training set) περιλαμβάνει 29 ενώσεις, και η ομάδα ελέγχου (test set) τις υπόλοιπες δώδεκα ενώσεις.

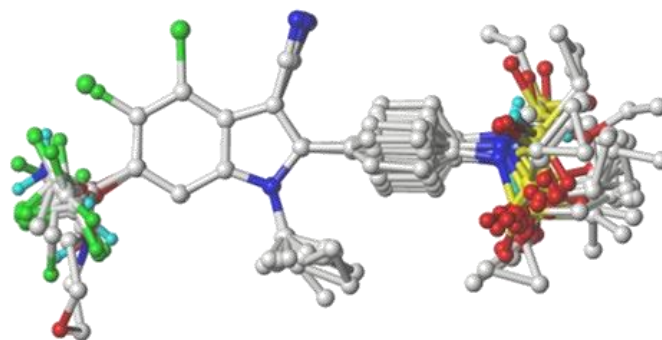
4.5.2 Ευθυγράμμιση της ομάδας δεδομένων (Dataset alignment)

Στη μέθοδο 3D-QSAR CoMSIA, η ευθυγράμμιση του συνόλου δεδομένων είναι πολύ σημαντική διεργασία για την εξαγωγή ενός αξιόπιστου μοντέλου. Στην παρούσα μελέτη, οι προσανατολισμοί που εξήχθησαν από τη μοριακή πρόσδεση των αναστολέων με το Surflex-Dock, χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο της ευθυγράμμισης. Η ένωση **25g**, το πιο δραστικό ανάλογο του συνόλου, χρησιμοποιήθηκε ως μόριο-οδηγός (template molecule) για την ευθυγράμμιση όλων των υπόλοιπων ενώσεων. Για την ευθυγράμμιση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν δέκα κοινά άτομα που φέρουν όλες οι ενώσεις και απεικονίζονται στο Σχήμα 4.3. Οι κυανο- και φαινυλομάδες, ομοίως κοινές για όλες τις ενώσεις δεν συμπεριλήφθησαν στο κοινό μοτίβο, έτσι ώστε οι

ενώσεις από την εικονική διαλογή που θα ακολουθήσει στη συνέχεια να μην περιορίζονται στο συγκεκριμένο δομικό μοτίβο. Η ευθυγράμμιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την εφαρμογή «database alignment» του πακέτου μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0 και τα αποτελέσματα της ευθυγράμμισης παριστάνονται στο Σχήμα 4.4.



Σχήμα 4.3: Το κοινό δομικό τμήμα (δέκα άτομα) των 41 ενώσεων που χρησιμοποιείται για την ευθυγράμμιση, βασισμένη στη διαμόρφωση της προσδεμένης ένωσης 25g (μόριο-οδηγός).



Σχήμα 4.4: Η υπέρθεση της ευθυγράμμισης των ενώσεων της ομάδας εκμάθησης που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση 3D-QSAR, βασισμένη στη διαμόρφωση της προσδεμένης ένωσης 25g.

4.5.3 Ανάλυση CoMSIA

Γενικότερα, τα μοντέλα CoMSIA δημιουργούνται κάνοντας χρήση όλων ή κάποιου συνδυασμού από τα παρακάτω πεδία ομοιότητας: στερικό, ηλεκτροστατικό, υδρόφοβο, δότη δεσμού υδρογόνου, και δέκτη δεσμού υδρογόνου.¹⁹⁸ Αυτά τα πεδία απεικονίζουν τις διάφορες ιδιότητες στις χωρικές περιοχές όπου παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της ανασταλτικής δραστηριότητας. Στην ανάλυση CoMSIA, τα πέντε διαφορετικά περιγραφικά πεδία δεν είναι εντελώς ανεξάρτητα το ένα από το άλλο.¹²² Ο υπολογισμός των πεδίων εφαρμόζεται για τις ενώσεις της ομάδας εκμάθησης. Για την επίτευξη του πιο σταθερού μοντέλου, τροποποιείται συστηματικά ο

συνδυασμός των πεδίων και επιλέγεται αυτός που δίνει μεγαλύτερη τιμή του συντελεστή συσχέτισης της διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης Q^2 , το μικρότερο σφάλμα, και τη μεγαλύτερη τιμή F . Στην παρούσα μελέτη, το σταθερότερο μοντέλο CoMSIA εξάγεται χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό των στερικού, υδρόφοβου, και δέκτη υδρογονικού δεσμού πεδίων (Πίνακας 4.3). Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών έξι αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή Q^2 στα 0,632 και στο χαμηλότερο SEP στα 0,453. Ο συντελεστής συσχέτισης της μη-διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης R^2_{train} στα 0,974, το SEE στα 0,120 και η τιμή F στα 131,324, δείχνουν μία επιτυχή στατιστικά συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pEC_{50} για τη μη-διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου CoMSIA.

Πίνακας 4.3: Τα στατιστικά αποτελέσματα του μοντέλου CoMSIA.

Μοντέλο CoMSIA	
ONC	6
Q^2	0,632
SEP	0,453
R^2_{train}	0,974
SEE	0,120
F	131,324
Στερικό / Υδρόφοβο / Δέκτης δεσμού H	0,276 / 0,421 / 0,303
R^2_{test}	0,664
$\overline{r_m^2}$	0,561
Δr_m^2	0,200

Όπου,

ONC : ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών που χρησιμοποιήθηκαν στην PLS ανάλυση

Q^2 : ο συντελεστής συσχέτισης της διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης για τις ενώσεις της ομάδας εκμάθησης

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

R^2_{train} : ο συντελεστής συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας εκμάθησης

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

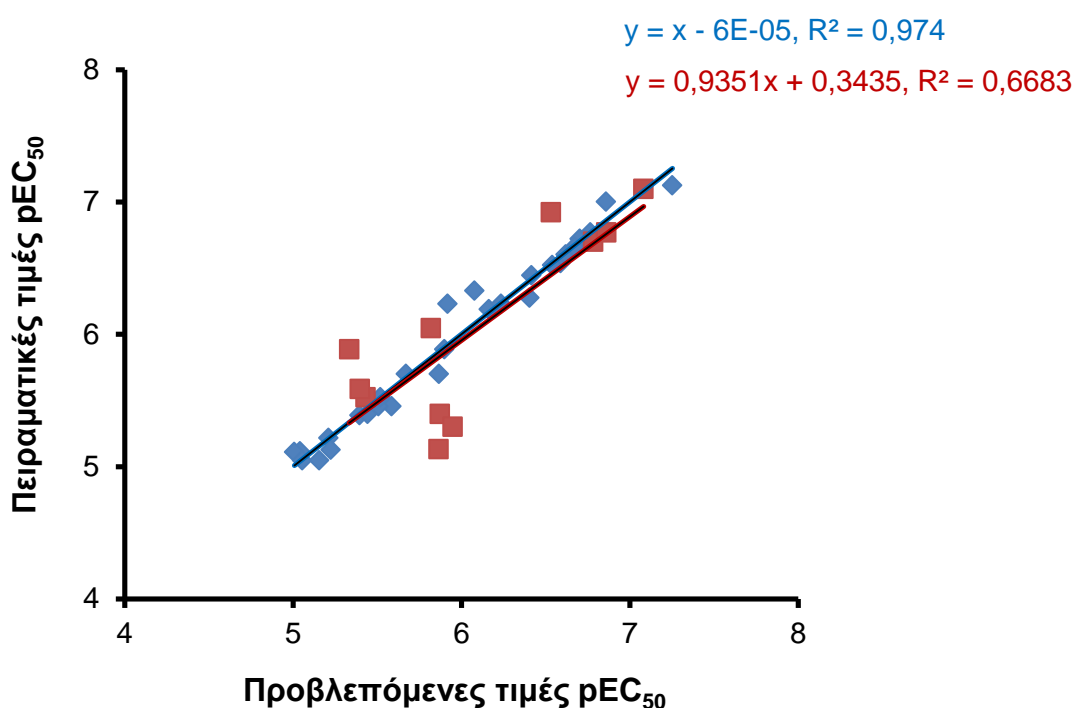
F : η τιμή του Fisher test

Στεरिकό / Υδρόφοβο / Δέκτης δεσμού H: Η συνεισφορά του στερικού, υδρόφοβου και δέκτη δεσμών υδρογόνου πεδίου στην PLS ανάλυση

R^2_{test} : ο συντελεστής συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας ελέγχου

$\overline{r_m^2}$ και Δr_m^2 : παράμετροι για την εξωτερική ισχύ πρόβλεψης του μοντέλου χρησιμοποιώντας την ομάδα ελέγχου

Στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pEC_{50} . Η ανάλυση CoMSIA δείχνει ότι η σχετική συνεισφορά των πεδίων είναι 27,6%, 42,1% και 30,3% για το στεरिकό, το υδρόφοβο, και του δέκτη δεσμού υδρογόνου πεδίο, αντίστοιχα.



Σχήμα 4.5: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών pEC_{50} και των πειραματικών για το μοντέλο CoMSIA, τόσο για την ομάδα εκμάθησης όσο και για την ομάδα ελέγχου.

4.5.4 Επικύρωση του μοντέλου 3D-QSAR CoMSIA

Για να εκτιμηθεί περαιτέρω η σταθερότητα και η δυνατότητα πρόβλεψης του εξαχθέντος μοντέλου CoMSIA πραγματοποιήθηκε εξωτερική επικύρωση.^{233,}

²³⁴ Η επικύρωση διεξήχθη χρησιμοποιώντας τα δώδεκα μόρια που δεν περιλαμβάνονται στη δημιουργία του μοντέλου. Οι προβλεπόμενες τιμές pEC_{50} είναι, σε αντιστοιχία με τις πειραματικές τιμές, εντός των ορίων ανοχής σφάλματος (Σχήμα 4.5). Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης για τις ενώσεις της

ομάδας ελέγχου, R^2_{test} , υπολογίστηκε στα 0,664, αποδεικνύοντας την ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pEC_{50} .

Περαιτέρω, η εξωτερική ισχύ πρόβλεψης του ανεπτυγμένου μοντέλου 3D-QSAR εξετάστηκε χρησιμοποιώντας την ομάδα ελέγχου με τον υπολογισμό της τιμής r_m^2 . Το r_m^2 είναι ένας νέος, αυστηρός και ισχυρός στατιστικός δείκτης που έχει αναφερθεί για πρώτη φορά σε δημοσίευση των Roy *et al.*²³⁵ Στη μελέτη τους έδειξαν ότι ακόμη και όταν η τιμή του Q^2 είναι υψηλή, αυτό δεν αποτελεί επαρκή προϋπόθεση για τη δυνατότητα πρόβλεψης και την ισχύ του μοντέλου. Για να θεωρηθεί αξιόπιστο το μοντέλο, η τιμή του $\overline{r_m^2}$ θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 0,5 και η τιμή του Δr_m^2 μικρότερη από 0,2. Παρακάτω δίνονται οι εξισώσεις υπολογισμού των μετρήσεων του r_m^2 .^{235, 236}

$$\overline{r_m^2} = \frac{r_m^2 + r'_m{}^2}{2} \quad (10)$$

$$\Delta r_m^2 = |r_m^2 - r'_m{}^2| \quad (11)$$

$$r_m^2 = r^2(1 - |\sqrt{r^2 - r_o^2}|) \quad (12)$$

$$r'_m{}^2 = r^2(1 - |\sqrt{r^2 - r_o'^2}|) \quad (13)$$

Όπου r^2 και r_o^2 είναι οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης μεταξύ των παρατηρούμενων (άξονας Y) και των προβλεπόμενων (άξονας X) τιμών δραστηριότητας των ενώσεων της ομάδας ελέγχου, με τομή (intercept) και χωρίς τομή σε άξονα, αντίστοιχα, και $r_o'^2$ είναι η τιμή του συντελεστή συσχέτισης μεταξύ των παρατηρούμενων (άξονας X) και των προβλεπόμενων (άξονας Y) τιμών δραστηριότητας των ενώσεων της ομάδας ελέγχου χωρίς τομή σε άξονα. Στην παρούσα μελέτη οι δείκτες $\overline{r_m^2}$ και Δr_m^2 υπολογίστηκαν στα 0,56 και 0,2, αντίστοιχα (Πίνακας 4.3). Οι μετρήσεις του r_m^2 υπολογίστηκαν με χρήση της εφαρμογής στον ελεύθερα προσβάσιμο διαδικτυακό τόπο <http://aptsoftware.co.in/rmsquare/>. Η έννοια του r_m^2 μπορεί επίσης να εφαρμοστεί και στην ομάδα εκμάθησης.

Τέλος, το μοντέλο επικυρώθηκε και με την εφαρμογή του κόμβου ENALOS KNIME (Enalos Model Acceptability Criteria KNIME node),²³⁷ καθώς πέρασε

επιτυχώς τις προτεινόμενες δοκιμές (κριτήρια) που αφορούν την ομάδα ελέγχου και εγκαθίδρυσε ο Δρ. Trovsha για τη δυνατότητα πρόβλεψης ενός μοντέλου (Πίνακας 4.4). Πιο συγκεκριμένα, οι Golbraikh και Trovsha πρότειναν ένα σύνολο παραμέτρων για τον καθορισμό της ικανότητας πρόβλεψης ενός μοντέλου QSAR.^{206, 231, 237} Σύμφωνα με τους ερευνητές, ένα μοντέλο μπορεί να θεωρηθεί ικανοποιητικό και αποδεκτό, όταν ικανοποιούνται οι παρακάτω προϋποθέσεις για την ομάδα ελέγχου:

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

Όπου R^2 το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης των προβλεπόμενων έναντι των παρατηρούμενων τιμών δραστηκότητας της ομάδας ελέγχου για τη γραμμή παλινδρόμησης, R_{ext}^2 ο συντελεστής συσχέτισης της ομάδας ελέγχου (R^2_{test}), R_0^2 και $R'_0{}^2$ οι συντελεστές συσχέτισης των προβλεπόμενων έναντι των παρατηρούμενων τιμών δραστηκότητας και των παρατηρούμενων έναντι των προβλεπόμενων τιμών δραστηκότητας της ομάδας ελέγχου για τις γραμμές παλινδρόμησης μέσω της αρχής των αξόνων, αντίστοιχα, και k και k' οι κλίσεις των αντίστοιχων γραμμών παλινδρόμησης μέσω της αρχής των αξόνων.

Πίνακας 4.4: Κριτήρια αποδοχής μοντέλου με χρήση του κόμβου Enalos KNIME.

Κριτήριο	Εκτίμηση	Αποτέλεσμα
$R^2 > 0,6$	ΘΕΤΙΚΗ	$R^2 = 0,668$
$R_{ext}^2 > 0,5$	ΘΕΤΙΚΗ	$R_{ext}^2 = 0,664$
$(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0,1$	ΑΡΝΗΤΙΚΗ	$(R^2 - R_0^2) / R^2 = 0,167$
ή $(R^2 - R'_0{}^2) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R'_0{}^2) / R^2 = 0,004$
$ (R_0^2 - R'_0{}^2) < 0,3$	ΘΕΤΙΚΗ	$ (R_0^2 - R'_0{}^2) = 0,109$
$0,85 < k < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 0,991$
ή $0,85 < k' < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k' = 1,005$
ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ		

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.4 υποδεικνύουν ότι αυτή η ευθυγράμμιση μπορεί να λάβει αποτελεσματικά υπόψη τις αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη, και συνεπώς το μοντέλο CoMSIA είναι αξιόπιστο και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό νέων αναστολέων της αντιγραφής του HCV με τα προαναφερθέντα δομικά χαρακτηριστικά.

4.5.5 Ισοΰψεις χάρτες CoMSIA

Τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης CoMSIA μπορούν να παρουσιαστούν γραφικά στους ισοΰψεις χάρτες πεδίων. Σε αυτούς τους χάρτες σκιαγραφείται η στατιστική σχέση μεταξύ των πεδίων CoMSIA και της πειραματικής τιμής δραστηριότητας των ενώσεων έναντι της RNA πολυμεράσης του HCV. Οι τιμές των πεδίων εξάγονται από το γινόμενο $StDev * Coeff$ που προκύπτει με τον πολλαπλασιασμό του συντελεστή περιγραφής του πεδίου (descriptor coefficient) και της αντίστοιχης τυπικής απόκλισης (standard deviation).

Πιο αναλυτικά, σε αυτούς τους χάρτες γίνονται ορατές οι περιοχές γύρω από την ένωση που αλληλεπιδρούν θετικά ή αρνητικά με τον υποδοχέα. Οι χάρτες χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν τα δομικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη βιολογική δραστηριότητα σε αυτή τη σειρά των παραγώγων και λαμβάνονται πληροφορίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω σχεδιασμό παραγώγων ινδολίου ως αναστολείς της αντιγραφής του HCV. Οι ισοΰψεις χάρτες με τα πεδία CoMSIA για την πιο δραστική ένωση **25g** παριστάνονται στο Σχήμα 4.6.

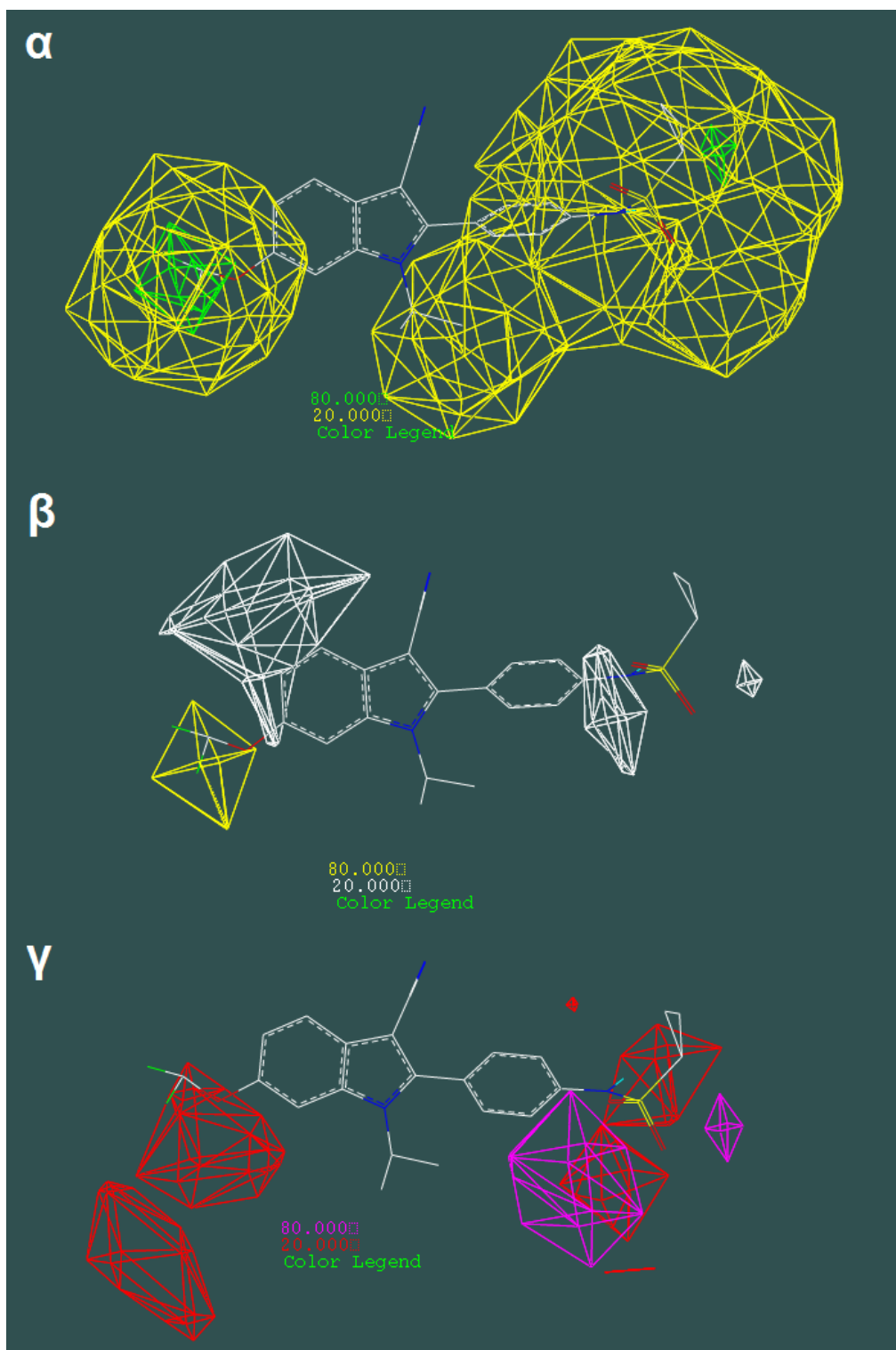
Οι στερικές (στερεοχημικές) αλληλεπιδράσεις παριστάνονται με τις πράσινες και κίτρινες περιοχές ισοΰψών χαρτών (Σχήμα 4.6α), όπου ογκώδεις ομάδες κοντά στις πράσινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση, αλλά προκαλούν το αντίθετο αποτέλεσμα κοντά στις κίτρινες περιοχές. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με κίτρινες και λευκές περιοχές ισοΰψών χαρτών (Σχήμα 4.6β), όπου υδρόφοβες ομάδες κοντά στις κίτρινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση, ενώ τη μειώνουν κοντά στις λευκές περιοχές. Τέλος, οι αλληλεπιδράσεις δέκτη δεσμού υδρογόνου εμφανίζονται με πορφυρές και κόκκινες περιοχές ισοΰψών χαρτών (Σχήμα 4.6γ), όπου ομάδες με άτομα δέκτες δεσμού υδρογόνου κοντά στις πορφυρές

περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση, αλλά τη μειώνουν κοντά στις κόκκινες περιοχές.

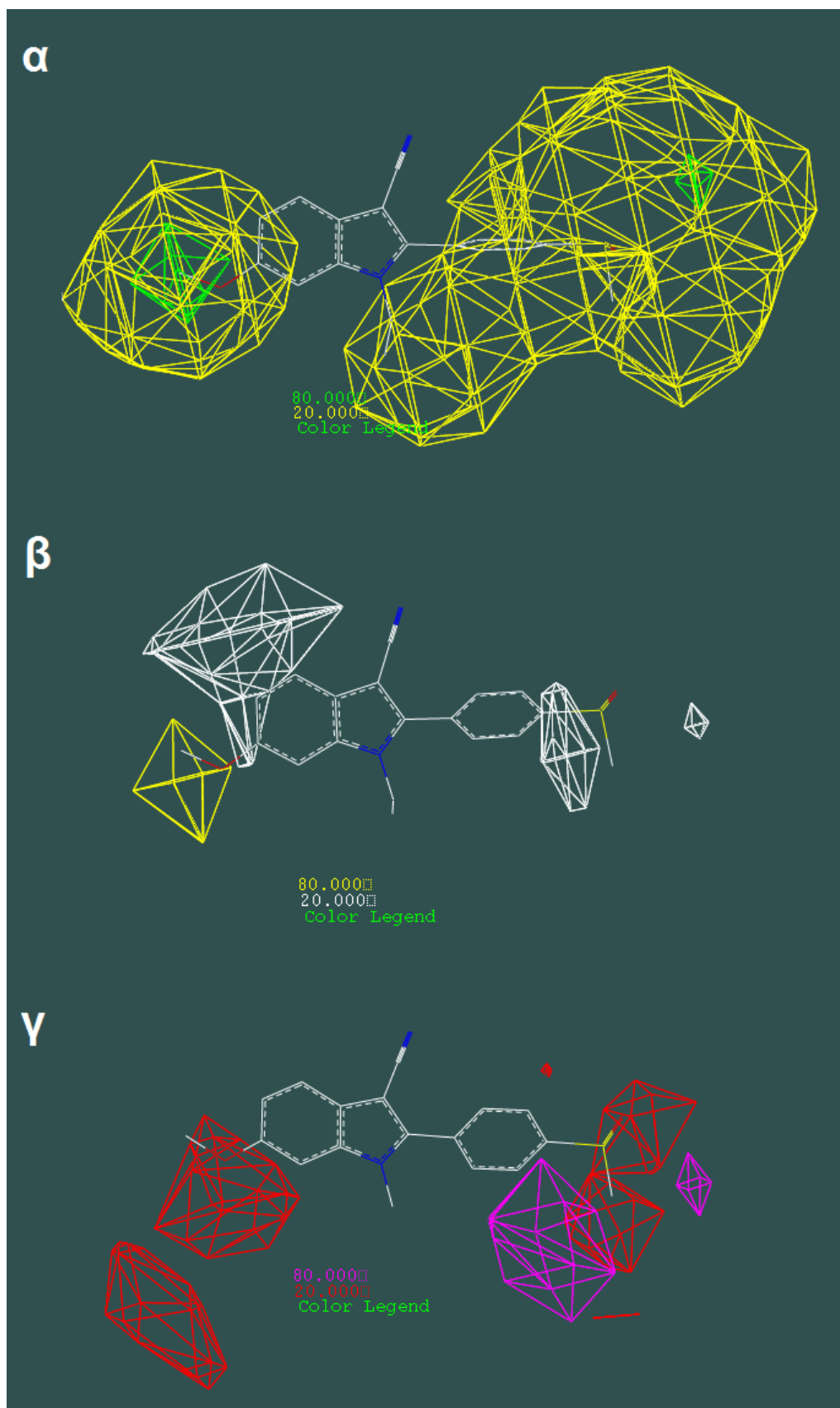
Όπως μπορεί να παρατηρηθεί από το παρακάτω σχήμα, οι κίτρινες περιοχές είναι μεγαλύτερες από τις πράσινες στον ισοϋψή χάρτη του μοντέλου CoMSIA για το στερικό πεδίο (Σχήμα 4.6α). Σε συμφωνία με αυτό, οι ενώσεις που φέρουν ογκώδεις ομάδες σε θέση κοντά στις κίτρινες περιοχές, όπως για παράδειγμα η ένωση **8c**, έδειξαν χαμηλή δραστικότητα. Ομοίως, στον ισοϋψή χάρτη για το υδρόφοβο πεδίο στο Σχήμα 4.6β, υπάρχουν μόνο λευκές περιοχές, εκτός από μία μικρή κίτρινη περιοχή στον υποκαταστάτη R₃ του 2-φαινυλο ινδολίου, και ως εκ τούτου η εισαγωγή υδρόφιλων ομάδων ως υποκαταστάτες του μορίου γύρω από αυτή τη θέση φαίνεται να αυξάνει την ανασταλτική του δράση.

Στο πεδίο του δέκτη δεσμού υδρογόνου επισημαίνονται οι περιοχές όπου η ένωση και πιθανές ομάδες αμινοξέων στην ενεργό θέση του υποδοχέα θα μπορούσαν να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου που επηρεάζουν σημαντικά τη συγγένεια πρόσδεσης. Όπως φαίνεται στον ισοϋψή χάρτη για το πεδίο του δέκτη δεσμού υδρογόνου στο Σχήμα 4.6γ, η μεγάλη ευνοϊκά πορφυρή περιοχή συνδέεται με δύο άτομα οξυγόνου του σουλφοναμιδίου. Αντίθετα, η χαρακτηριστική κόκκινη περιοχή που βρίσκεται στην αριστερή πλευρά της ένωσης υποδηλώνοντας ότι ένα άτομο-δέκτης δεσμού υδρογόνου σε αυτό το σημείο δεν ευνοεί τη δραστικότητα της ένωσης, αντιστοιχεί τέλεια στη μεθοξυομάδα στις περισσότερες μελετώμενες ενώσεις ή της καρβοξυλικής ομάδας της ένωσης **29**, η οποία έχει και τη χαμηλότερη δραστικότητα σε αυτή τη σειρά ενώσεων. Τέλος, η μικρή κόκκινη περιοχή στον υποκαταστάτη R₁ του 2-φαινυλο ινδολίου, όπου είναι η ομάδα -NH της ένωσης **25g**, αντιστοιχεί στις σουλφονυλο ομάδες των μη δραστικών ενώσεων **7d** και **7e** (βλ. Πίνακα 4.1).

Στο Σχήμα 4.7 εμφανίζονται οι ισοϋψείς χάρτες του εξαχθέντος μοντέλου CoMSIA γύρω από την αδρανή ένωση **7d** αυτή τη φορά.



Σχήμα 4.6: Οι ισοϋψείς χάρτες StDev*Coeff των πεδίων CoMSIA για την πιο δραστική ένωση 25g: (α) για το στεरिकό πεδίο (πράσινο: προτιμούνται οι ογκώδεις ομάδες, κίτρινο: δεν προτιμούνται οι ογκώδεις ομάδες); (β) για το υδρόφοβο πεδίο (κίτρινο: προτιμούνται οι υδρόφοβες ομάδες, λευκό: δεν προτιμούνται οι υδρόφοβες ομάδες); και (γ) για το πεδίο δέκτη δεσμού H (πορφυρό: προτιμούνται οι ομάδες με άτομα-δέκτες δεσμού H, κόκκινο: δεν προτιμούνται οι ομάδες με άτομα-δέκτες δεσμού H).



Σχήμα 4.7: Οι ισοϋψείς χάρτες StDev*Coeff των πεδίων CoMSIA για την αδρανή ένωση 7d: (α) για το στερικό πεδίο (β) για το υδρόφοβο πεδίο και (γ) για το πεδίο δέκτη δεσμού Η.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, δεν υπάρχει καμία ομάδα κοντά στην πράσινη περιοχή στη δεξιά πλευρά του ισοϋψούς χάρτη για το στερικό πεδίο (Σχήμα 4.7α). Αυτή η απουσία οδηγεί σε μείωση της ανασταλτικής δραστηριότητας της ένωσης. Η απουσία υδρόφιλων ομάδων στις λευκές περιοχές του ισοϋψούς χάρτη για το υδρόφοβο πεδίο μπορεί να εξηγήσει τη μειωμένη ανασταλτική δράση της ένωσης (Εικόνα 4.7β). Τέλος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η παρουσία της σουλφονυλο ομάδας κοντά στην κόκκινη περιοχή του ισοϋψούς χάρτη στη δεξιά πλευρά της ένωσης και η απουσία της -NH ομάδας κοντά στην πορφυρή περιοχή μειώνουν την ανασταλτική δράση της ένωσης (Σχήμα 4.7γ).

4.6 Εικονική διαλογή

Μέχρι σήμερα, αρκετές μελέτες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία με στόχο τον προσδιορισμό νέων ισχυρών αναστολέων της πολυμεράσης του ιού, χρησιμοποιώντας διάφορα πρωτόκολλα *in silico* και ροές εργασίας περιλαμβανομένων της εικονικής διαλογής.²³⁸⁻²⁴⁹

Το μοντέλο 3D-QSAR που εξήχθη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο διάφορων βάσεων δεδομένων ή εικονικών βιβλιοθηκών που υπάρχουν, προκειμένου να προσδιοριστούν νέες δραστικές ενώσεις. Μια προσπάθεια προς αυτή την κατεύθυνση διεξήχθη χρησιμοποιώντας μια ροή εργασίας στο πρόγραμμα KNIME, ώστε να δοθεί προτεραιότητα σε ενώσεις από τη βάση δεδομένων της ChEMBL.

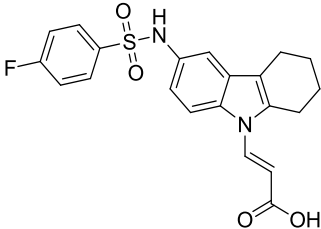
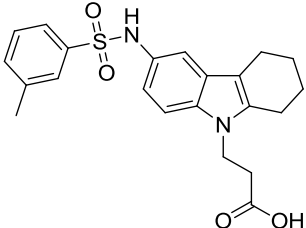
Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων της ChEMBL ως μια δεξαμενή υποψήφιων ενώσεων ώστε να υποστούν εικονική διαλογή και να αξιολογηθεί η δραστηριότητα αναστολής του HCV με *in silico* ροή εργασίας. Η ροή εργασίας KNIME για την αξιολόγηση αυτών των ενώσεων, περιλάμβανε τα εξής βήματα: Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν εργαλεία Χημειοπληροφορικής για την απομόνωση των ενώσεων από τη βάση δεδομένων της ChEMBL, που περιλαμβάνουν το βασικό σκελετό του ινδολίου. Συνολικά απομονώθηκαν 24.000 ενώσεις που είναι ινδολικά παράγωγα. Στη συνέχεια, οι ενώσεις αυτές συγκρίθηκαν με την πιο δραστική ένωση του αρχικού συνόλου δεδομένων, την ένωση **25g**, καθώς προσφέρει την ισχυρότερη αναστολή της πολυμεράσης του HCV. Συλλέχθηκαν 2.250 δομικά παρεμφερείς με τη

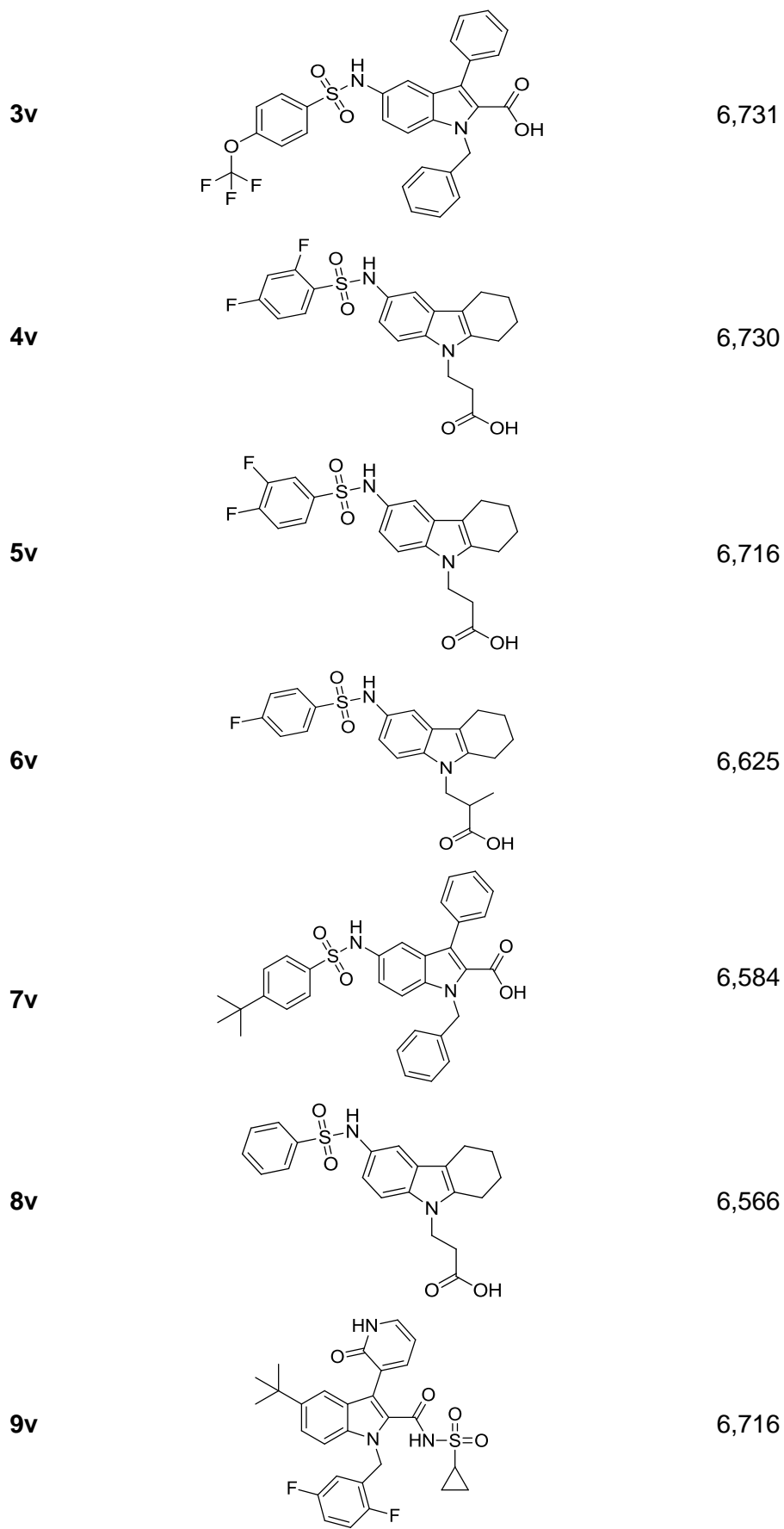
δραστική ένωση ενώσεις χρησιμοποιώντας τον δείκτη ομοιότητας Tanimoto και εκφραζόμενες σε «δακτυλικά αποτυπώματα». Τα δακτυλικά αποτυπώματα είναι αναπαραστάσεις των δομικών χαρακτηριστικών ενός μορίου, που δίδονται ως σειρά δυαδικών ψηφίων (bits) και αντιπροσωπεύουν την παρουσία ή απουσία συγκεκριμένων σκελετών στο μόριο.

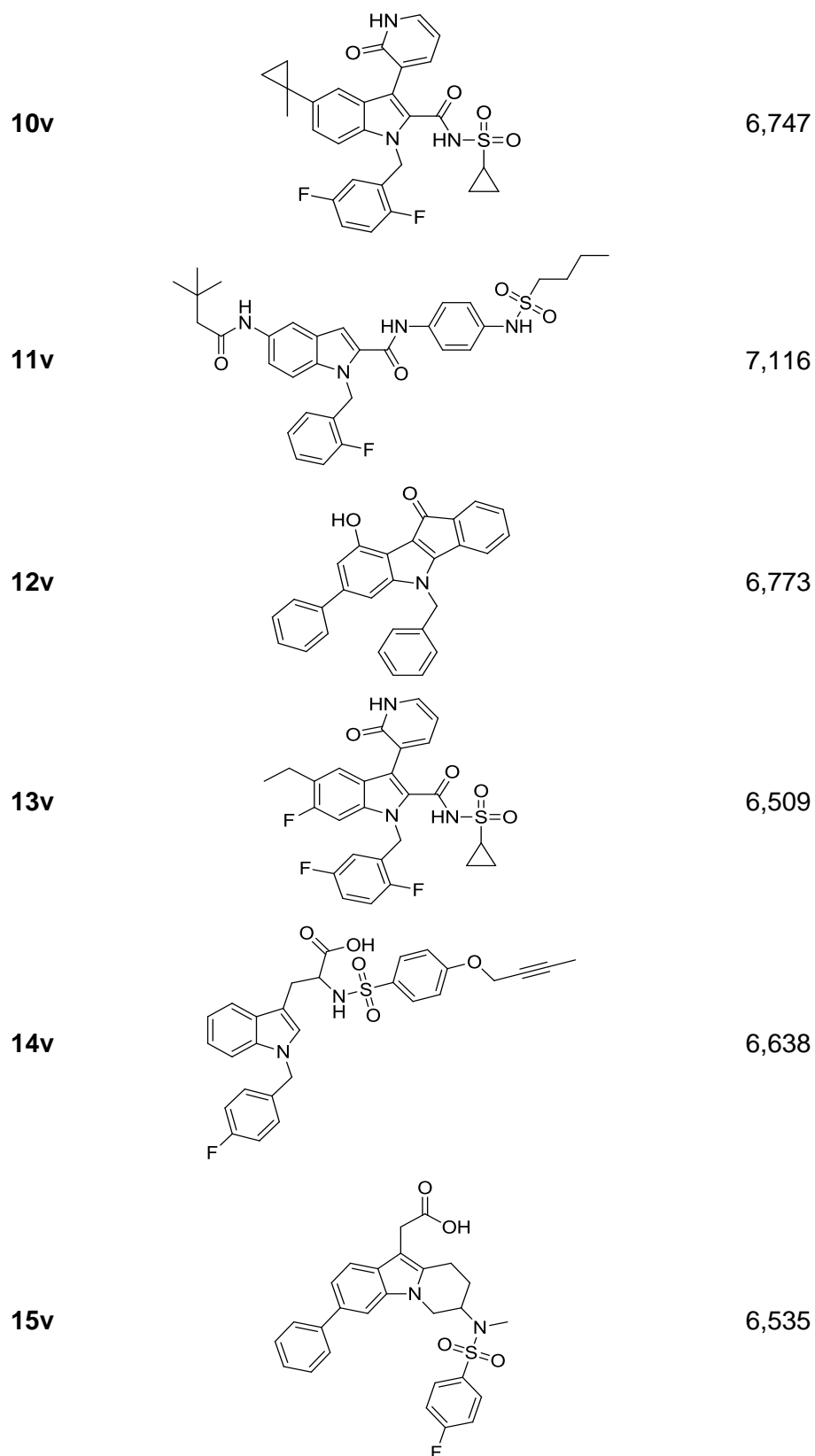
Το προτεινόμενο μοντέλο CoMSIA χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η δραστηριότητα αυτών των ενώσεων. Η αναζήτηση του βασικού σκελετού του ινδολίου και της ομοιότητας των δακτυλικών αποτυπωμάτων που εφαρμόστηκε οδήγησε σε έναν «στενότερο χημικό χώρο» που αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχίας αφού και το μοντέλο 3D-QSAR δομήθηκε με βάση ειδικά αυτόν τον σκελετό.

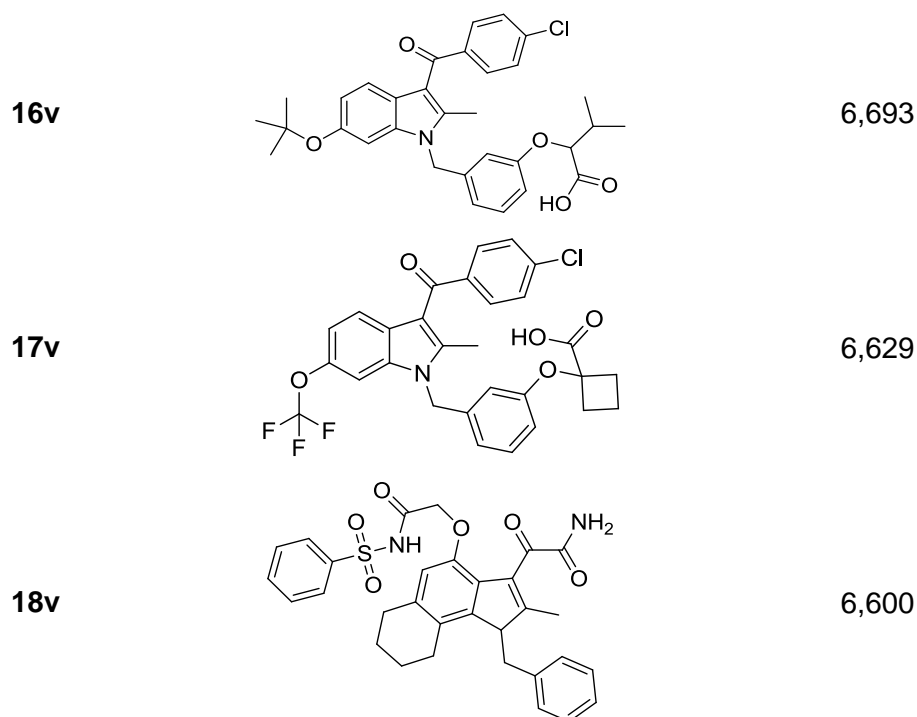
Η διαλογή των 2.250 ενώσεων μέσω του καθιερωμένου μοντέλου CoMSIA κατέληξε σε 18 ενώσεις με υψηλές τιμές pEC_{50} . Οι ενώσεις αυτές (**1v-18v**) που προέβλεψε το εξαχθέν μοντέλο CoMSIA δίνονται στον Πίνακα 4.5. Οι ενώσεις **1v-8v** φέρουν μία λιπόφιλη ομάδα ως υποκαταστάτη στη θέση R₄ του ινδολίου, και για αυτό η δραστηριότητά τους κυμαίνεται σε υψηλές τιμές. Τα ίδια αποτελέσματα έχουν και οι ενώσεις **12v** και **15v**, οι οποίες φέρουν μια ογκώδη υδρόφοβη ομάδα στη θέση υποκατάστασης R₃.

Πίνακας 4.5: Δομές και προβλεπόμενες τιμές pEC_{50} των ενώσεων της εικονικής διαλογής.

Ένωση	Δομή	Προβλεπόμενη pEC_{50}
1v		7,066
2vs		7,016







Στη συνέχεια, οι ενώσεις **1v-18v**, που εξήχθησαν από την εικονική διαλογή, ελέγχθησαν για την φαρμακο-ομοιότητά τους, ικανοποιώντας τους κανόνες του Lipinski (Ro5, Ro3), και τις ιδιότητες ADME (Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός, Απέκκριση). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του QikProp της εταιρίας Schrödinger μέσω του οποίου μπορεί να προβλεφθούν φυσικοί σημαντικοί περιγραφείς και φαρμακευτικά σχετικές ιδιότητες οργανικών μορίων. Εκτός από την πρόβλεψη των μοριακών ιδιοτήτων, μέσω του QikProp παρέχονται διακυμάνσεις για τη σύγκριση των ιδιοτήτων ενός συγκεκριμένου μορίου με εκείνες των 95% γνωστών φαρμάκων.²⁵⁰⁻²⁵⁴ Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζονται οι διακυμάνσεις τιμών των μοριακών ιδιοτήτων των 18 προβλεπόμενων ενώσεων αλλά και των προβλεπόμενων φαρμακευτικών ιδιοτήτων τους.

Τέλος, η δραστηριότητα των 18 προβλεπόμενων ενώσεων από το μοντέλο 3D-QSAR αναζητήθηκε στη βάση δεδομένων της ChEMBL, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.7.²⁵⁵⁻²⁶³ Είναι αξιοσημείωτο ότι οι ενώσεις **9v**, **10v** και **13v** έχουν ήδη δοκιμαστεί για αναστολή της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης NS5B του HCV υπότυπου 1b, όπου εμφάνισαν επίσης μια ισχυρή αντι-ϊική δράση κατά του HCV σε μολυσμένα με τον ιό ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα. Αυτό πιστοποιεί το γεγονός ότι η προτεινόμενη εικονική ροή

εργασίας ελέγχου με βάση τη μοριακή πρόσδεση, το 3D-QSAR CoMSIA και την αναζήτηση ομοιότητας από βάση δεδομένων, κατόρθωσε να αποκαλύψει τα διαρθρωτικά χαρακτηριστικά, σημαντικά για την αναστολή της αντιγραφής του HCV.

Πίνακας 4.6: Διακύμανση τιμών πρόβλεψης για τις κυριότερες ιδιότητες των ενώσεων εικονικής διαλογής, όπως υπολογίστηκαν με την εφαρμογή του QikProp.

Ιδιότητες / Φυσικοί περιγραφείς	Διακύμανση τιμών
Μοριακό βάρος	398,5 – 592,7
Άτομα-δέκτες δεσμού υδρογόνου	2 – 10
Άτομα-δότες δεσμού υδρογόνου	1 – 3
Συντελεστής κατανομής νερού/οκτανόλης	3,4 – 7,5
Διαλυτότητα σε νερό	8,7 – 16,2
Αριθμός ατόμων αζώτου και οξυγόνου	3 – 8
Αριθμός μεταβολικών αντιδράσεων	1 – 8

Πίνακας 4.7: Αναστολή των ενώσεων εικονικής διαλογής βασισμένη σε προηγούμενες δημοσιεύσεις.

Ένωση VS	Αναστολή	Περιγραφή	Αναφορά
1v	Ki=19.000 nM	Ανασταλτική δράση στην πρόσδεση του PGD-2 στην CRTH-2 με τη δοκιμασία πρόσδεσης hCRTH-2 χρησιμοποιώντας κυτταρικές μεμβράνες HEK293	255
2v	Ki=4.200 nM	Ανασταλτική δράση στην πρόσδεση του PGD-2 στην CRTH-2 με τη δοκιμασία πρόσδεσης hCRTH-2 χρησιμοποιώντας κυτταρικές μεμβράνες HEK293	255
3v	IC ₅₀ =8.300 nM	Ανασταλτική συγκέντρωση κατά του αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 με τη δοκιμασία αντισώματος	256

4v	Ki=3.600 nM	Ανασταλτική δράση στην πρόσδεση του PGD-2 στην CRTH-2 με τη δοκιμασία πρόσδεσης hCRTH-2 χρησιμοποιώντας κυτταρικές μεμβράνες HEK293	255
5v	Ki=4.200 nM	Ανασταλτική δράση στην πρόσδεση του PGD-2 στην CRTH-2 με τη δοκιμασία πρόσδεσης hCRTH-2 χρησιμοποιώντας κυτταρικές μεμβράνες HEK293	255
6v	Ki=50.000 nM	Ανασταλτική δράση στην πρόσδεση του PGD-2 στην CRTH-2 με τη δοκιμασία πρόσδεσης hCRTH-2 χρησιμοποιώντας κυτταρικές μεμβράνες HEK293	255
7v	IC ₅₀ =28.700 nM	Ανασταλτική συγκέντρωση κατά του αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 με τη δοκιμασία αντισώματος	256
8v	Ki=1.200 nM	Ανασταλτική δράση στην πρόσδεση του PGD-2 στην CRTH-2 με τη δοκιμασία πρόσδεσης hCRTH-2 χρησιμοποιώντας κυτταρικές μεμβράνες HEK293	255
9v	IC ₅₀ =6 nM	Αναστολή της υπότυπου 1b NS5B Cdelta21 RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης του HCV που εκφράζεται σε Escherichia coli JM109 και αξιολογείται ως αναστολή της ενσωμάτωσης [α 32P]CTP μετά από 1 ώρα με τη δοκιμασία σπινθηρισμού	257
	EC ₅₀ =50 nM	Αντι-ϊική δράση κατά του HCV σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό	
10v	IC ₅₀ =6 nM	Αναστολή της υπότυπου 1b NS5B Cdelta21 RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης του HCV που εκφράζεται σε Escherichia coli JM109 και αξιολογείται ως αναστολή της ενσωμάτωσης [α 32P]CTP μετά από 1 ώρα με τη δοκιμασία σπινθηρισμού	257
	EC ₅₀ =600 nM	Αντι-ϊική δράση κατά του HCV σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό	
11v	IC ₅₀ =200 nM	Ανασταλτική συγκέντρωση έναντι ενζύμου 1 μετατροπής ενδοθηλίνης χρησιμοποιώντας υπόστρωμα προερχόμενο από βραδυκίνη	258

12v	Αναστολή=31 nM	Αναστολή της ανθρώπινης CSNK2A1/2B που εκφράζεται σε Escherichia coli BL21 (DE3) με τη χρήση RRRDDDSDDD ως υπόστρωμα μετά από 15 λεπτά με τη μέθοδο μέτρησης σπινθηρισμού	259
13v	IC ₅₀ =5 nM	Αναστολή της υπότυπου 1b NS5B Cdelta21 RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης του HCV που εκφράζεται σε Escherichia coli JM109 και αξιολογείται ως αναστολή της ενσωμάτωσης [α 32P]CTP μετά από 1 ώρα με τη δοκιμασία σπινθηρισμού	257
	EC ₅₀ =60 nM	Αντι-ϊική δράση κατά του HCV σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό	
14v	IC ₅₀ =1.900 nM	Αναστολή του TACE με τη μέθοδο Μεταφοράς Ενέργειας Συντονισμού Φθορισμού (FRET)	260
15v	IC ₅₀ =4,5 nM	Ανταγωνιστική δράση σε ανθρώπινο ανασυνδυασμένο υποδοχέα CRTH2 που εκφράζεται σε κύτταρα HEK293 και αξιολογείται ως αναστολή της DK-PGD2 επαγόμενη από τον σχηματισμό ενδοκυτταρικού cAMP	261
16v	IC ₅₀ =10 nM	Αναστολή του ανθρώπινου υποδοχέα PPAR γ με τη δοκιμασία εγγύτητας σπινθηρισμού	262
17v	IC ₅₀ =16 nM	Αναστολή του ανθρώπινου υποδοχέα PPAR γ με τη δοκιμασία εγγύτητας σπινθηρισμού	262
18v	IC ₅₀ =3 nM	Ανασταλτική συγκέντρωση κατά της ανθρώπινης μη παγκρεατικής εκκρινικής φωσφολιπάσης A2 (sPLA2)	263

4.7 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο, εφαρμόστηκε μία υπολογιστική ροή εργασίας εικονικής διαλογής που συνδυάζει τη μοριακή πρόσδεση, το 3D-QSAR CoMSIA και την αναζήτηση ομοιότητας στη βάση δεδομένων ChEMBL, με σκοπό τον εντοπισμό των *N*-υποκατεστημένων ινδολικών παραγώγων που δρουν ως αναστολείς της αντιγραφής του HCV. Λόγω της υψηλής δυνατότητας πρόβλεψης,^{264, 265} η ροή μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη διαλογή

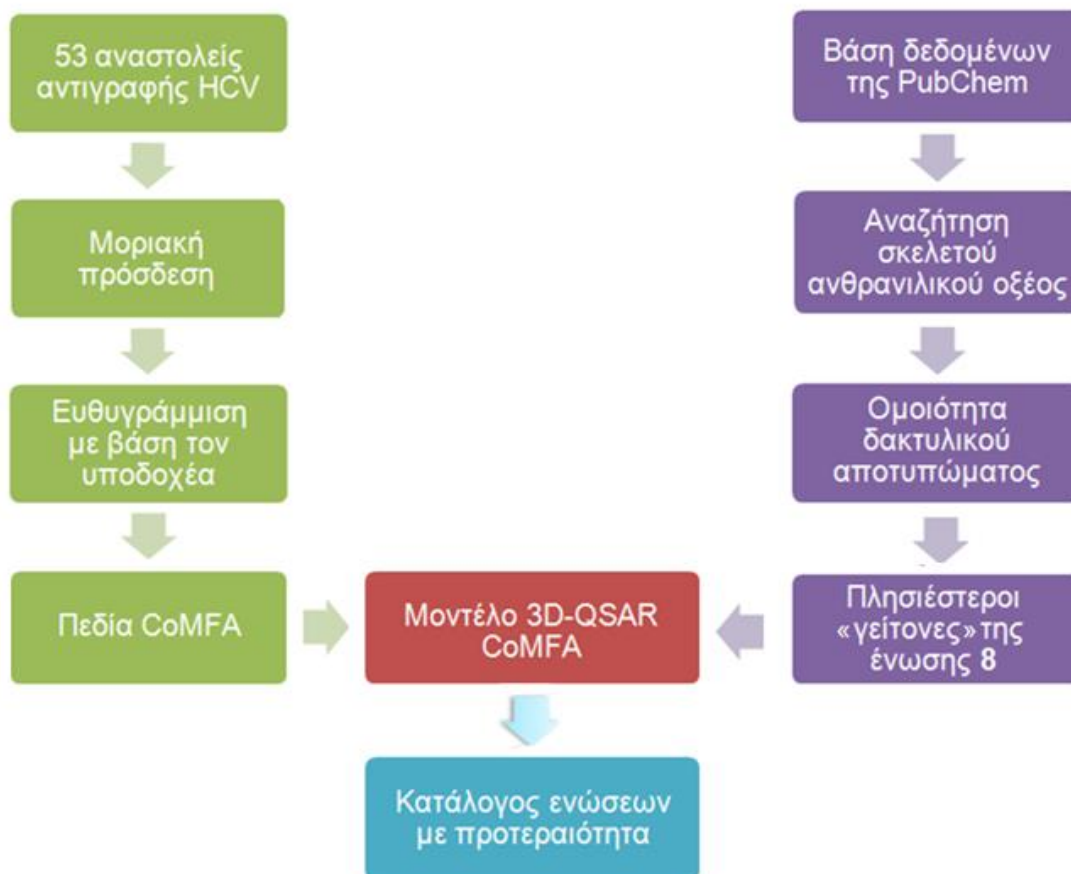
άλλων βάσεων δεδομένων (PubChem, Zinc, κ.α.) ή εικονικών συνδυασμών για τον προσδιορισμό παραγώγων με την επιθυμητή δραστικότητα. Με την εφαρμογή του μοντέλου κατορθώθηκε να εντοπιστούν οι πλέον υποσχόμενες ενώσεις από μια ομάδα νέων παραγώγων και να δοθεί προτεραιότητα σε ένα κατάλογο ενώσεων για διαλογή. Η προσέγγιση αποκάλυψε πολλά υποσχόμενες χημικές ενώσεις με υψηλό δυναμικό δραστικότητας.²⁶⁶ Από αυτές, οι **9n**, **10n** και **13n** έχουν ήδη δοκιμαστεί και έχει βρεθεί ότι έχουν ισχυρή αντι-ιική δράση κατά του HCV σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό σε νανομοριακή κλίμακα. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί να γενικευθεί ως ένα ορθολογικό εργαλείο ανακάλυψης φαρμάκων για την ταυτοποίηση νέων ενώσεων-οδηγών για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΤΟΥ HCV ΣΥΝΔΥΑΖΟΝΤΑΣ ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ, 3D-QSAR ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΙΚΗ ΔΙΑΛΟΓΗ

5.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο συνδυασμός των υπολογιστικών μεθόδων της μοριακής πρόσδεσης, της ανάλυσης 3D-QSAR CoMFA, της αναζήτησης ομοιότητας και της εικονικής διαλογής που χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό νέων αναστολέων της αντιγραφής του HCV. Προσπάθειες διεξήχθησαν ώστε να γίνουν κατανοητά εκείνα τα δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την πρόσδεση 53 αναλόγων ανθρανιλικού οξέος στην RNA πολυμεράση NS5B GT1b του ιού της ηπατίτιδας C.^{267, 268} Αυτές οι ενώσεις έχουν συντεθεί και δοκιμαστεί ως αναστολείς της αντιγραφής του HCV από τον Stammers *et al.*, και μάλιστα αρκετές από αυτές έχουν συγκρυσταλλωθεί με την πολυμεράση του HCV. Στην παρούσα μελέτη, όλες οι ενώσεις προσδέθηκαν στην κοιλότητα του «αντίχειρα» II (TP-2) του ενζύμου και η προσδεμένη διαμόρφωση που αποκτά κάθε ένωση χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια σε μια ευθυγράμμιση που βασίζεται στον υποδοχέα για την παραγωγή των πεδίων CoMFA. Η υπολογιστική ροή εργασίας που ακολουθήθηκε, όπως παρουσιάστηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, προκειμένου να οικοδομηθεί ένα μοντέλο 3D-QSAR CoMFA, απεικονίζεται γραφικά στο Σχήμα 5.1.



Σχήμα 5.1: Η υπολογιστική ροή εργασίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τον εντοπισμό νέων ενώσεων ως αναστολείς του HCV. Αρχικά, το σύνολο δεδομένων των 53 αναλόγων ανθρανιλικού οξέος προσδένονται στην κοιλότητα (TP-2) της πολυμεράσης του HCV για τον υπολογισμό της βαθμολογίας πρόσδεσης. Η πρόζα πρόσδεσης του κάθε αναστολέα χρησιμοποιείται σε μία ευθυγράμμιση με βάση τον υποδοχέα για τη δημιουργία των πεδίων CoMFA. Εξάγεται το μοντέλο 3D-QSAR CoMFA, στη συνέχεια, ώστε να υπολογιστεί με ακρίβεια η δραστηκότητα τους και, τέλος, ανάλογα ανθρανιλικού οξέος που περιλαμβάνονται στη βάση δεδομένων της PubChem λαμβάνουν προτεραιότητα για την εικονική διαλογή.

5.2 Επιλογή και προετοιμασία της κρυσταλλογραφικής δομής της RNA πολυμεράσης του HCV

Στην Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων RCSB (PDB) είναι διαθέσιμες πέντε κρυσταλλογραφικές δομές ακτίνων Χ της πολυμεράσης NS5B GT1b του HCV με συγκρυσταλλωμένο αναστολέα, ένα παράγωγο ανθρανιλικού οξέος. Οι δομές αυτές μπορούν να αναζητηθούν στη βάση δεδομένων με τους κωδικούς 4J08, 4JU3, 4JU4, 4JU7 και 4JJS. Δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη διαμόρφωση και των πέντε

κρυσταλλογραφικών δομών, επιλέχθηκε για επεξεργασία και για τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης η κρυσταλλογραφική δομή με την υψηλότερη ανάλυση ακτίνων Χ (PDB ID: 4JU3, 2.00 Å). Η προετοιμασία της έγινε με τη χρήση της εφαρμογής «Protein Preparation Wizard» της Schrödinger.¹⁴² Κατά τη διαδικασία αυτή, ελέγχθηκε η σειρά των δεσμών και οι δισουλφιδικοί δεσμοί, προστέθηκαν όλα τα άτομα υδρογόνου, ενώ όλα τα μόρια του νερού που απέχουν μια απόσταση μεγαλύτερη των 5 Å από την αλλοστερική θέση TP-2 διεγράφησαν. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή Eprk 2.3 για την πρόβλεψη του ιοντισμού και της ταυτομέρειας των αμινοξέων του ενζύμου.^{142,}²¹⁵ Το δίκτυο δεσμών υδρογόνου βελτιστοποιήθηκε προσανατολίζοντας ορθά τις ομάδες υδροξυλίου και των ομάδων αμιδίου στα αμινοξέα Asn και Gln, καθώς και του δακτυλίου του ιμιδαζολίου για το αμινοξύ His. Τέλος, χρησιμοποιώντας την εφαρμογή «Impref» και το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005,^{123, 138} βελτιστοποιήθηκαν οι θέσεις των ατόμων του υδρογόνου με τη διατήρηση όλων των υπόλοιπων ατόμων στη θέση τους.

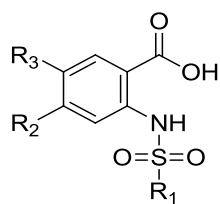
Η περιοχή πρόσδεσης του «αντίχειρα» II (TP-2) είναι μία στενή υδρόφοβη κοιλότητα κοντά στη βάση του τμήματος του αντίχειρα της πολυμεράσης, και απέχει περίπου 35 Å από το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η ανάλυση της αλληλουχίας έχει δείξει ότι η πρωτοταγής δομή αυτής της θέσης πρόσδεσης είναι σχετικά καλά διατηρημένη μεταξύ των γνωστών γονότυπων του HCV.²⁶⁹ Η θέση πρόσδεσης διασχίζει τον αντίχειρα από εμπρός προς τα πίσω του «χεριού» της RdRp, αλλά είναι σχετικά ρηχή και στενή (30 Å × 10 Å × 10 Å). Ο μηχανισμός δράσης για τους αναστολείς της περιοχής TP-2 είναι άγνωστος. Έχει προταθεί ότι η αναστολή οφείλεται στην παρεμπόδιση της σύνδεσης με άλλες πρωτεΐνες που είναι σημαντικές για την αντιγραφή.²⁶⁹ Η κοιλότητα του «αντίχειρα» II αποτελείται από τα αμινοξέα Leu419, Arg422, Met423, His475, Ser476, Tyr477, Ile482, Val485, Leu497, Leu489, Arg501, Trp528, και Lys533, ενώ ευνοούνται οι δεσμοί υδρογόνου με τα πολικά κατάλοιπα. Η παρατηρούμενη αλληλεπίδραση-κλειδί μεταξύ ενός αναστολέα ανθρανιλικού οξέος και του ενζύμου είναι οι δύο δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των δύο ατόμων οξυγόνου της καρβοξυλικής ομάδας και των ατόμων αζώτου του αμιδικού σκελετού των αμινοξέων Ser476 και Tyr477.

5.3 Σχεδιασμός και προετοιμασία των αναστολέων

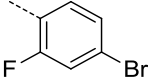
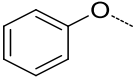
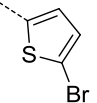
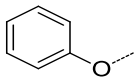
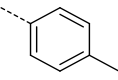
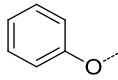
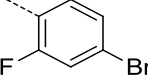
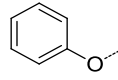
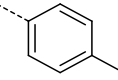
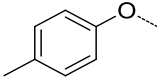
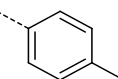
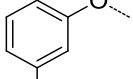
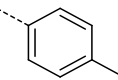
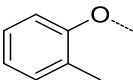
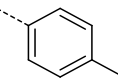
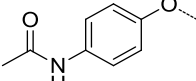
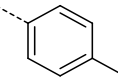
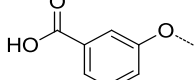
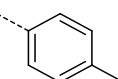
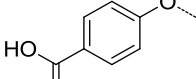
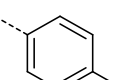
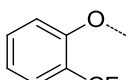
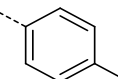
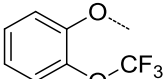
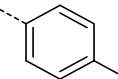
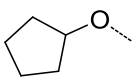
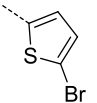
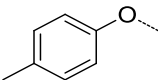
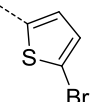
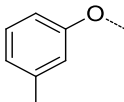
Οι μοριακές δομές που πρόκειται να προσδεθούν (προσδέτες, ligands) πρέπει να είναι σε τριδιάστατη μορφή. Αφού σχεδιαστούν σε δομή δύο διαστάσεων και μετατραπούν σε τριδιάστατη δομή βελτιστοποιείται η δομή τους με μεθόδους ελαχιστοποίησης της ενέργειας. Είναι απαραίτητο οι δεσμοί μεταξύ των ατόμων να έχουν το κατάλληλο μήκος και οι γωνίες των δεσμών να είναι επίσης οι κατάλληλες. Πρέπει να φέρουν όλα τα άτομα υδρογόνου και να είναι κατάλληλα πρωτονιομένες στο pH που εκτελούνται οι *in vitro* δοκιμές στο ένζυμο. Αφού γίνει η προετοιμασία των μοριακών δομών αποθηκεύονται στην κατάλληλη μορφή που απαιτεί το υπολογιστικό πρόγραμμα για να χρησιμοποιηθούν ως αρχεία εισόδου.

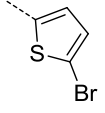
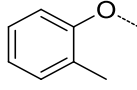
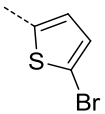
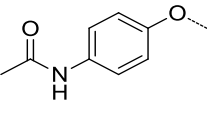
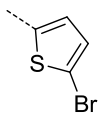
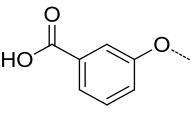
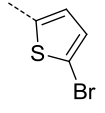
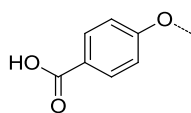
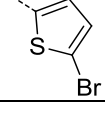
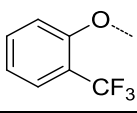
Για την ανάπτυξη του μοντέλου 3D-QSAR, δημιουργήθηκε μία βάση δεδομένων που περιείχε 53 παράγωγα ανθρανιλικού οξέος (Πίνακας 5.1).²⁶⁷ Τα παράγωγα αυτά έχουν ελεγχθεί πειραματικά για την αναστολή της αντιγραφής του HCV σε μία βιοχημική δοκιμασία με κοινό πρωτόκολλο, χρησιμοποιώντας μια πρωτεΐνη Δ21NS5B γονότυπου 1b.^{267, 268} Οι 3D δομές των παραγώγων ανθρανιλικού οξέος σχεδιάστηκαν στο πακέτο μοριακής μοντελοποίησης Maestro 9.3 της Schrödinger. Όλα τα άτομα υδρογόνου προστέθηκαν και τα μόρια υποβλήθηκαν σε πλήρη βελτιστοποίηση δομής, χρησιμοποιώντας τη διαδικασία ελαχιστοποίησης του MacroModel 9.9.¹²³ Για την ελαχιστοποίηση, επιλέχθηκε το νερό ως διαλύτης και χρησιμοποιήθηκαν το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005¹³⁸ και ο αλγόριθμος συζευγμένης κλίσης Polak-Ribiere (500 επαναλήψεις με βαθμίδα ελαχιστοποίησης 0,01 kcal/mol·Å). Οι δομές στη συνέχεια ελέγχθηκαν ώστε να είναι σωστός ο ιοντισμός τους και η ταυτομέρειά τους στο pH που εκτελούνται οι *in vitro* δοκιμές στο ένζυμο (pH 7,5) με την εφαρμογή του LigPrep 2.5.¹⁴³ Τέλος, υπολογίστηκαν τα φορτία Gasteiger-Hückel για όλες τις ενώσεις στο πρόγραμμα του SYBYL 8.0.^{201, 202}

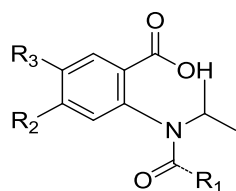
Πίνακας 5.1: Οι μοριακές δομές των 53 παραγώγων ανθρανιλικού οξέος και οι πειραματικές τιμές IC₅₀.

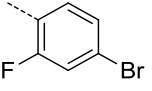
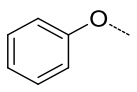
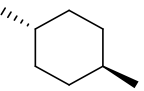
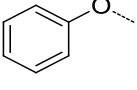
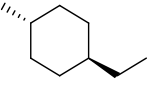
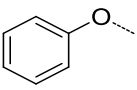
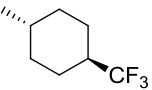
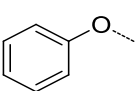
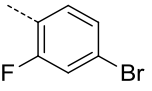
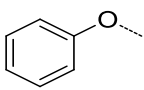
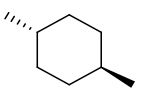
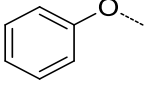
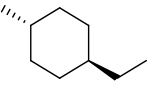
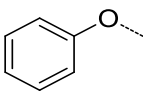


ID	Ένωση*	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM)**
1	5a		H	H	26
2	5b		H	Br	9
3	5c		Cl	H	11
4	6a		H	Br	43
5	6b		H	Br	8,4
6	6c		H	Br	4,5
7	6d		H	Br	6,1
8	7c		Cl	H	6,8
9	7d		Cl	H	4,6
10	9a		H	Ph	3,7
11	10a		Ph	H	6,7
12	11a		H		0,55
13	11b		H		0,22

14	11c		H		0,34
15	12a			H	0,61
16	12b			H	0,16
17	12c			H	0,31
18	3		H		0,78
19	4		H		0,47
20	5		H		0,53
21	6		H		0,29
22	7		H		0,33
23	8		H		0,085
24	9		H		0,27
25	10		H		0,37
26	11		H		0,21
27	13			H	1,9
28	14			H	1,1

29	15			H	1,5
30	16			H	2,9
31	17			H	1,4
32	18			H	2,2
33	19			H	3



34	23		H		1,64
35	24		H		0,67
36	25		H		1,3
37	26		H		2
38	28			H	1,4
39	29			H	0,74
40	30			H	4,3

41	31			H	1,3
42	36		H		0,46
43	37			H	> 40
44	38		H		0,19
45	39			H	1,3
46	40		H		0,47
47	41		H		0,74
48	42		H		0,45
49	43		H		0,33
50	44		H		0,3
51	45		H		0,2
52	46		H		0,08
53	47		H		0,19

*Η αρίθμηση των ενώσεων της δεύτερης στήλης του πίνακα έχει αντληθεί από τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές 267 και 268.

**Οι τιμές IC₅₀ μετρήθηκαν με τη χρήση μιας πρωτεΐνης Δ21NS5B γονότυπου 1b. Η βιοχημική δοκιμασία διεξήχθη σε πλάκες 96 φρεατίων με χρήση 2±10 nM ενζύμου, 0,5 μCi [³H]UTP, 1 μM UTP, 250 nM 5'-βιοτινυλιωμένο ολιγο(rU₁₂), 10 μg/ml πολυ(rA) σε 20 mM Tris-HCl pH

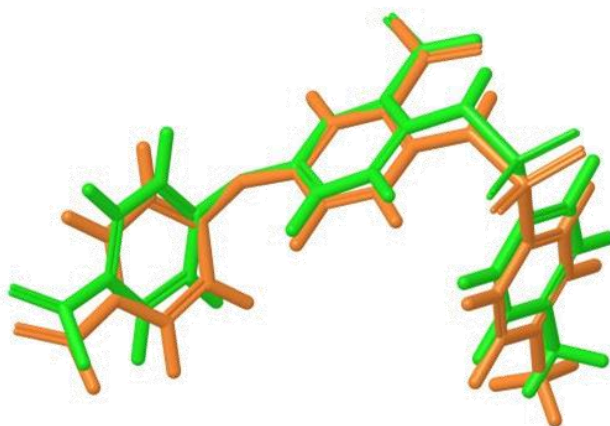
7,5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 U/μl του RNasin, 5% DMSO, 3% γλυκερόλη, 30 mM NaCl, 0.33% δωδεκυλ-β-D-μαλτοζίνη, 0,01% IGEPAL. Η αντίδραση των 60 μl τερματίστηκε μετά από 90 λεπτά στους 22 °C με την προσθήκη 20 μl διαλύματος διακοπής (150 μg/ml του tRNA σε 0,5 M EDTA) και 30 μl σφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη [8 mg/ml σε 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 0.025% (w/v) αζίδιο του νατρίου], για Δοκιμασία Εγγύτητας Σπινθηρισμού (Perkin Elmer-Amersham). Μετά από 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, 75 μl των 5 M χλωριούχου καισίου προστέθηκαν στα φρεάτια και η πλάκα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα πριν την ποσοτικοποίηση της ραδιενέργειας UMP που ενσωματώνεται πάνω στο βιοτινυλιωμένο εκκινητή μετρώντας για 60 s σε μία TopCount (Packard).

5.4 Μοριακή πρόσδεση με χρήση του αλγόριθμου GLIDE

Ο αλγόριθμος GLIDE της Schrödinger χρησιμοποιήθηκε για τη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης.¹⁶² Η χρήση του GLIDE έδειξε ικανοποιητική αναπαραγωγικότητα της διαμόρφωσης του συγκρυσταλλωμένου προσδέτη στο ένζυμο της κρυσταλλογραφικής μελέτης που χρησιμοποιήθηκε, με RMSD μικρότερο από 0,2. Ο αλγόριθμος του GLIDE έχει προταθεί στη βιβλιογραφία για την ακρίβεια που παρέχει στη μοριακή πρόσδεση αλλά και τη βαθμολόγηση.²⁷⁰ Η περιοχή πρόσδεσης ορίστηκε από ένα κύβο διαστάσεων 12 Å × 12 Å × 12 Å του οποίου το κέντρο να συμπίπτει με αυτό του προσδέτη και επιλέχθηκε η πρόσδεση προσδετών παρόμοιων σε μέγεθος με τον συγκρυσταλλωμένο προσδέτη. Οι άλλες παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι προεπιλεγμένες από το πρόγραμμα. Το επίπεδο ακρίβειας XP (Extra Precision) και το XP GScore χρησιμοποιήθηκαν για την πρόσδεση και τη βαθμολόγηση, αντίστοιχα. Επιλέχθηκε η πόζα του κάθε προσδέτη με βάση την ευνοϊκότερη βαθμονόμηση και τις επιθυμητές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ πρωτεΐνης και προσδέτη.

Αρχικά, εφαρμόστηκε μοριακή πρόσδεση στον πιο δραστικό αναστολέα της σειράς, την ένωση **8** (ID = 23, Πίνακας 5.1), η οποία έχει ήδη συγκρυσταλλωθεί με την πολυμεράση NS5B του HCV και περιγράφεται από τους Stammers *et al.*²⁶⁷ Στο Σχήμα 5.2 απεικονίζεται η υπέρθεση της συγκρυσταλλωμένης και προσδεμένης με εφαρμογή του αλγόριθμου GLIDE ένωσης **8** στην κοιλότητα του αντίχειρα II. Από το μικρό RMSD της υπέρθεσης, είναι προφανές ότι η χρήση του αλγόριθμου GLIDE που

χρησιμοποιείται για τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης αναπαράγει τα κρυσταλλογραφικά πειραματικά δεδομένα για δομικά παρόμοιες ενώσεις.



Σχήμα 5.2: Το αποτέλεσμα της υπέρθεσης των δύο δομών: με πράσινο χρώμα αναπαριστάται η κρυσταλλογραφημένη δομή και με πορτοκαλί η προσδεμένη ένωση **8** (RMSD < 0.2).

Στη συνέχεια, με τον ίδιο τρόπο και τα υπόλοιπα παράγωγα του ανθρανιλικού οξέος προσδέθηκαν στην αλλοστερική θέση του αντίχειρα II της πολυμεράσης του HCV. Τα αποτελέσματα πρόσδεσης που εκφράζονται σε XP GScore καταγράφονται στον Πίνακα 5.2. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του XP GScore, τόσο ισχυρότερη αναμένεται να είναι η πρόσδεση της ένωσης και πιθανά και η αναστολή που θα προκαλέσει. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα, δεν προκύπτει μία πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ βαθμολογίας πρόσδεσης και δραστηριότητας των ενώσεων, και επομένως, δεν μπορούν να αιτιολογηθούν όλα τα βιολογικά αποτελέσματα των ενώσεων της σειράς (Σχήμα Π1, Παράρτημα III).

Πίνακας 5.2: Οι πειραματικές τιμές IC_{50} , οι βαθμολογίες μοριακής πρόσδεσης, οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές IC_{50} και η διαφορά τους από τις πειραματικές για τα 53 παράγωγα ανθρανιλικού οξέος.

ID	XP GScore	Πειραματική IC_{50}	Προβλεπόμενη IC_{50}	Διαφορά
1	-7,220	4,585	4,621	-0,036
2*	-7,949	5,046	4,698	0,348
3	-6,724	4,959	5,037	-0,078
4	-7,462	4,367	4,683	-0,316

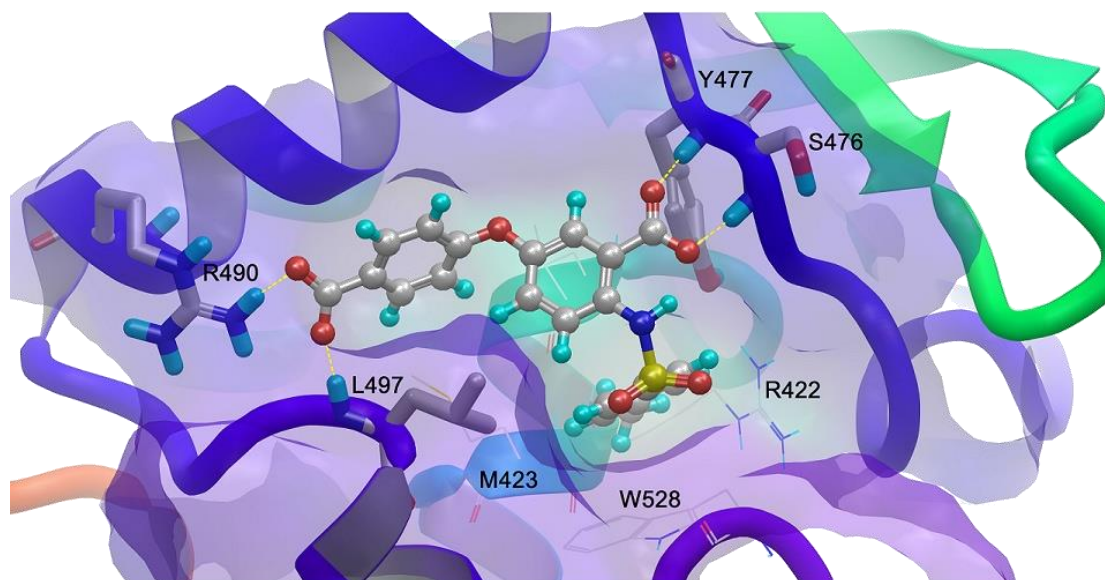
5	-6,395	5,076	5,014	0,062
6*	-7,772	5,347	4,913	0,434
7	-6,357	5,215	5,121	0,094
8	-7,349	5,167	5,025	0,142
9	-6,139	5,337	5,081	0,256
10	-6,739	5,432	5,523	-0,091
11	-6,525	5,174	5,210	-0,036
12	-6,138	6,260	6,303	-0,043
13	-7,369	6,658	6,489	0,169
14*	-7,618	6,469	6,066	0,403
15	-8,087	6,215	6,317	-0,102
16*	-8,860	6,796	6,276	0,520
17	-7,845	6,509	6,419	0,090
18	-8,237	6,108	6,101	0,007
19	-7,535	6,328	6,535	-0,207
20*	-7,632	6,276	6,511	-0,235
21	-9,146	6,538	6,513	0,025
22	-6,961	6,481	6,500	-0,019
23	-12,606	7,071	7,072	-0,001
24	-8,971	6,569	6,580	-0,011
25*	-7,468	6,432	6,339	0,093
26	-7,996	6,678	6,730	-0,052
27	-6,217	5,721	5,633	0,088
28	-7,410	5,959	5,980	-0,021
29*	-7,650	5,824	5,881	-0,057
30	-6,969	5,538	5,601	-0,063
31	-7,559	5,854	5,805	0,049
32	-6,790	5,658	5,657	0,001

33	-8,554	5,523	5,521	0,002
34*	-7,936	5,785	6,102	-0,317
35	-8,279	6,174	6,093	0,081
36	-8,036	5,886	6,060	-0,174
37	-7,841	5,699	5,622	0,077
38	-8,148	5,854	5,938	-0,084
39*	-9,008	6,131	6,257	-0,126
40	-6,555	5,367	5,553	-0,186
41	-8,811	5,886	5,776	0,110
42	-9,069	6,337	6,343	-0,006
43*	-8,420	~4,4	5,607	-
44	-8,898	6,721	7,005	-0,284
45	-7,732	5,886	5,882	0,004
46	-7,496	6,328	6,224	0,104
47	-8,489	6,131	6,137	-0,006
48*	-8,602	6,347	6,476	-0,129
49	-8,219	6,481	6,297	0,184
50	-9,087	6,523	6,580	-0,057
51	-8,464	6,699	6,485	0,214
52	-9,211	7,097	6,994	0,103
53	-9,026	6,721	6,710	0,011

*Ενώσεις της ομάδας ελέγχου

Το αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης της ένωσης **8** της σειράς αυτής παριστάνεται τριδιάστατα στο Σχήμα 5.3. Όπως προαναφέρθηκε, η πόζα που υιοθετείται είναι η ίδια με αυτή του συγκρυσταλλωμένου αναστολέα. Η δεξιά πλευρά (RHS) του σκελετού του ανθρανιλικού οξέος (4-μεθυλο-φαινυλο σουλφοναμιδική ομάδα) τοποθετείται μέσα στη βαθιά λιπόφιλη κοιλότητα του ενζύμου και μία νέα αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου μεταξύ της αριστερής πλευράς (LHS) του ανθρανιλικού σκελετού και της πλευρικής αλυσίδας του

αμινοξέος R490 (αργινίνη) προστίθεται στους τρεις δεσμούς υδρογόνου του μορίου με τα αμινοξέα S476 (σερίνη), Y477 (τυροσίνη) και L497 (λευκίνη), όπως εμφανίστηκαν στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ.



Σχήμα 5.3: Τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα πρόσδεσης της ενεργής ένωσης **8** με την υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης $-12.606 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Οι αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου απεικονίζονται με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές (R: Arg, L: Leu, M: Met, W: Trp, R: Arg, S: Ser, Y: Tyr).

5.5 Εξαγωγή του μοντέλου 3D-QSAR CoMFA

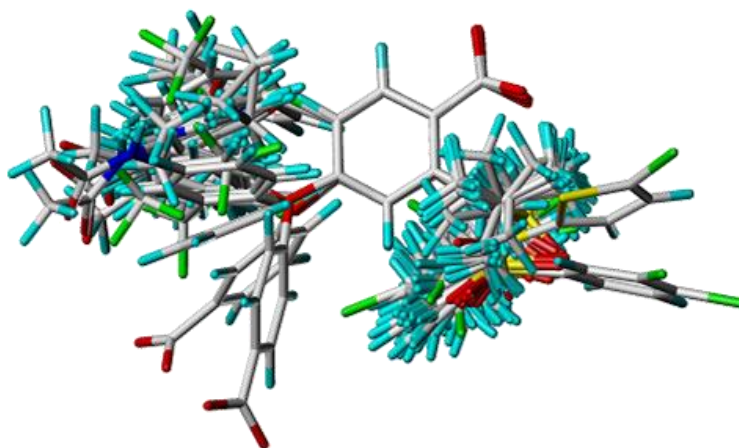
5.5.1 Ομάδα δεδομένων (Ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου)

Αρχικά, οι συγκεντρώσεις της ανασταλτικής δράσης (IC_{50}) των 53 αναλόγων του ανθρανιλικού οξέος μετατράπηκαν στις αντίστοιχες τιμές pIC_{50} , που ισούνται με τον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο των αρχικών τιμών ($-\log IC_{50}$), και χρησιμοποιούνται ως εξαρτημένες μεταβλητές στην ανάλυση CoMFA.²⁷¹ Στη συνέχεια, το σύνολο των δεδομένων ταξινομήθηκε σε ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου. Η ομάδα εκμάθησης περιλαμβάνει αντιπροσωπευτικό δείγμα από άποψη μοριακής δομής και βιοδραστικότητας.^{227-230, 264, 272-282} Η κατανομή των τιμών δραστηριότητας για την ομάδα ελέγχου ακολουθεί την κατανομή των τιμών δραστηριότητας για την ομάδα εκμάθησης. Σύμφωνα με τους Golbraikh και Tropsha,²³¹ η προσέγγιση αυτή είναι ορθή, δεδομένου ότι αντιπροσωπευτικά σημεία της ομάδας ελέγχου πρέπει να είναι παρόμοια με εκείνα της ομάδας εκμάθησης, και το αντίθετο. Ο διαχωρισμός του συνόλου δεδομένων σε ομάδα εκμάθησης και ομάδα ελέγχου έγινε σε μια ευρέως

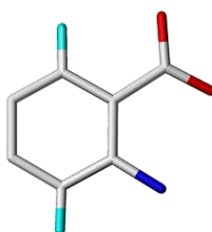
χρησιμοποιούμενη αναλογία 4:1. Συνεπώς, η ομάδα εκμάθησης αποτελείται από 42 μόρια, και η ομάδα ελέγχου από έντεκα μόρια (Πίνακας 5.2). Η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή της σχέσης μεταξύ των πεδίων CoMFA και της ανασταλτικής δράσης (τιμές IC₅₀).^{204, 283} Το μοντέλο 3D-QSAR CoMFA παρήχθη χρησιμοποιώντας την πρότυπη εφαρμογή του πακέτου μοριακής μοντελοποίησης SYBYL 8.0.

5.5.2 Ευθυγράμμιση της ομάδας δεδομένων (Dataset alignment)

Το παρόν μοντέλο CoMFA παρήχθη χρησιμοποιώντας το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης, με βάση την πρωτεΐνη (“protein-based” alignment), της ομάδας εκμάθησης. Το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης απεικονίζεται στο Σχήμα 5.4. Η δραστική ένωση **8** χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο μόριο για την ευθυγράμμιση με τη χρήση δώδεκα ατόμων (Σχήμα 5.5), που είναι κοινά σε όλα τα ανάλογα της σειράς που μελετάται.



Σχήμα 5.4: Το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης των ενώσεων της ομάδας εκμάθησης που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του μοντέλου CoMFA, βασισμένο στην προσδεμένη δομή της δραστικής ένωσης **8**.



Σχήμα 5.5: Το κοινό υπόστρωμα με τα δώδεκα άτομα όλων των αναλόγων της σειράς που μελετάται.

Η υπέρθεση, κατά την οποία το κάθε κοινό άτομο κάθε αναλόγου τοποθετείται άκαμπτα πάνω στο αντίστοιχο άτομο της πρότυπης ένωσης διεξήχθη χρησιμοποιώντας το βοηθητικό πρόγραμμα «Ευθυγράμμιση βάσης δεδομένων» (Align database) που διατίθεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα SYBYL 8.0 (Tripos).

5.5.3 Ανάλυση CoMFA

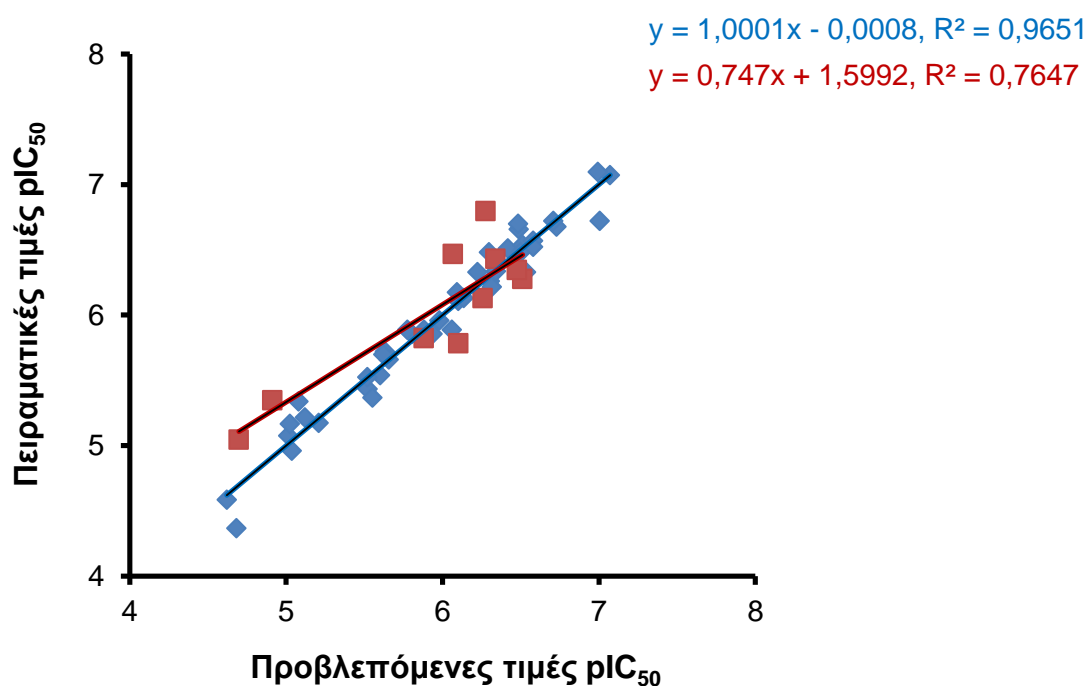
Γενικότερα, τα μοντέλα CoMFA δημιουργούνται χρησιμοποιώντας το συνδυασμό των στερικού και του ηλεκτροστατικά πεδίου. Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών πέντε αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή Q^2 στα 0,708 και στο χαμηλότερο SEP στα 0,376. Ο συντελεστής συσχέτισης της μη-διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης R^2_{train} στα 0,965, το SEE στα 0,130, και η τιμή F στα 199,276 δείχνουν μία ικανοποιητική στατιστικά συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών riC_{50} για τη μη-διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου CoMFA (Πίνακας 5.3). Στο Σχήμα 5.6 παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των προβλεπόμενων και των παρατηρούμενων τιμών riC_{50} . Η ανάλυση CoMFA δείχνει ότι η σχετική συνεισφορά των πεδίων είναι 70,4 και 29,6% για το στερικό και το ηλεκτροστατικό πεδίο, αντίστοιχα.

Πίνακας 5.3: Τα στατιστικά αποτελέσματα του μοντέλου CoMFA.

Μοντέλο CoMFA	
ONC	5
Q^2	0,708
SEP	0,376
R^2_{train}	0,965
SEE	0,130
F	199,276
Στερικό / Ηλεκτροστατικό	0,704 / 0,296
R^2_{test}	0,651
$\overline{r_m^2}$	0,598
Δr_m^2	0,197

Όπου,

Στερικό / Ηλεκτροστατικό: Η συνεισφορά του στερικού και ηλεκτροστατικού πεδίου στην PLS ανάλυση



Σχήμα 5.6: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των προβλεπόμενων τιμών pIC₅₀ και των πειραματικών για το μοντέλο CoMFA, τόσο για την ομάδα εκμάθησης όσο και για την ομάδα ελέγχου.

5.5.4 Επικύρωση του μοντέλου 3D-QSAR CoMFA

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 4.5.4 του αντίστοιχου κεφαλαίου, για να εκτιμηθεί περαιτέρω η σταθερότητα και η δυνατότητα πρόβλεψης του μοντέλου CoMFA πραγματοποιήθηκε η εξωτερική επικύρωση. Η επικύρωση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα υπόλοιπα έντεκα μόρια του συνόλου δεδομένων που δεν έλαβαν μέρος στη δημιουργία του μοντέλου, αυτά της ομάδας ελέγχου. Στο Σχήμα 5.6 μπορεί να γίνει αντιληπτό ότι οι προβλεπόμενες τιμές pIC₅₀ των ενώσεων της ομάδας ελέγχου είναι σε αντιστοιχία με τις πειραματικές αυτών εντός των ορίων ανοχής σφάλματος (κόκκινη γραμμή). Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης για τις ενώσεις της ομάδας ελέγχου R^2_{test} υπολογίστηκε στα 0,651, αποδεικνύοντας την καλή συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pIC₅₀.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ομοίως την ομάδα ελέγχου υπολογίστηκε η εξωτερική ισχύ πρόβλεψης του ανεπτυγμένου μοντέλου 3D-QSAR, με τις τιμές των $\overline{r_m^2}$ και Δr_m^2 να υπολογίζονται στα 0,598 και 0,197, αντίστοιχα. Το μοντέλο επικυρώθηκε και με την εφαρμογή του κόμβου ENALOS KNIME αφού πέρασε επιτυχώς τις προτεινόμενες δοκιμές του Δρ. Tropsha για τη δυνατότητα πρόβλεψης ενός μοντέλου (Πίνακας 5.4).

Πίνακας 5.4: Κριτήρια αποδοχής μοντέλου με χρήση του κόμβου Enalos KNIME.

Κριτήριο	Εκτίμηση	Αποτέλεσμα
$R^2 > 0,6$	ΘΕΤΙΚΗ	$R^2 = 0,765$
$R_{ext}^2 > 0,5$	ΘΕΤΙΚΗ	$R_{ext}^2 = 0,651$
$(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R_0^2) / R^2 = 0,001$
ή $(R^2 - R'_{0^2}) / R^2 < 0,1$	ΑΡΝΗΤΙΚΗ	$(R^2 - R'_{0^2}) / R^2 = 0,128$
$ (R_0^2 - R'_{0^2}) < 0,3$	ΘΕΤΙΚΗ	$ (R_0^2 - R'_{0^2}) = 0,097$
$0,85 < k < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 1,013$
ή $0,85 < k' < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k' = 0,985$

ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κατά την ευθυγράμμιση λαμβάνονται αποτελεσματικά υπόψη οι αλληλεπιδράσεις προσδέτη-υποδοχέα, και συνεπώς το μοντέλο CoMFA είναι αξιόπιστο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον σχεδιασμό νέων αναστολέων αντιγραφής του HCV με αυτό το δομικό μοτίβο μορίων.

5.5.5 Ισοΰψεις χάρτες CoMFA

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης CoMFA, όπως και αυτά μιας ανάλυσης CoMSIA που περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 4, μπορούν να παρουσιαστούν γραφικώς με τους ισοΰψεις χάρτες πεδίων. Στην παρούσα περίπτωση μπορούν να αναλυθούν μόνο οι στερικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της ένωσης με τον υποδοχέα.

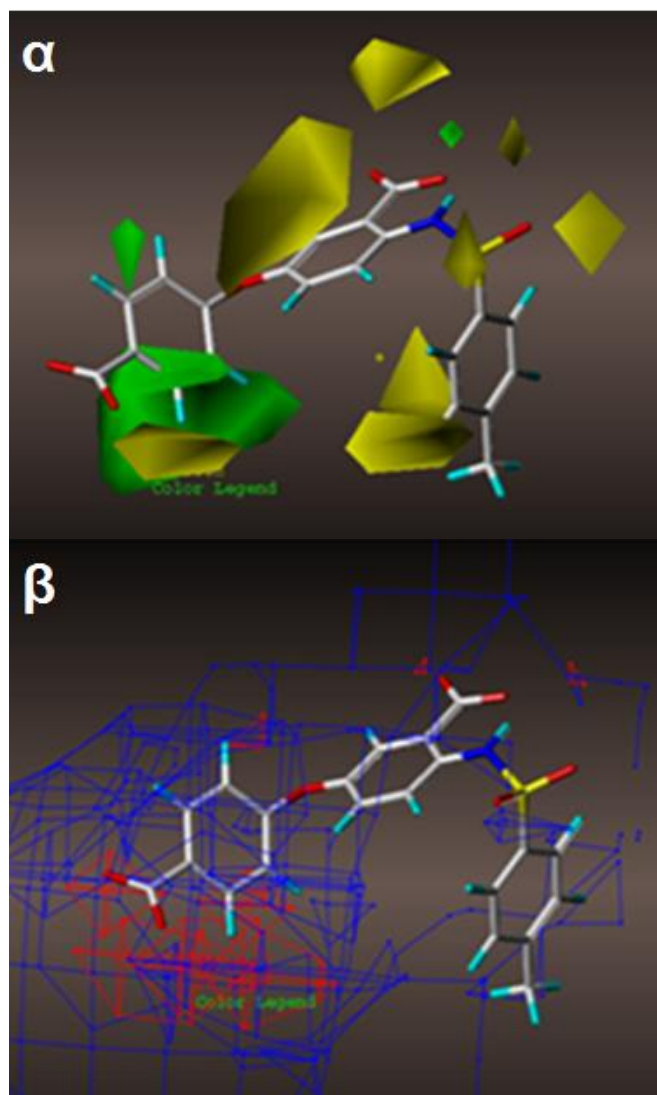
Τα πεδία CoMFA γύρω από τη δραστική ένωση **8** εμφανίζονται στο Σχήμα 5.7. Οι στερικές (στερεοχημικές) αλληλεπιδράσεις αναπαρίστανται με πράσινα και κίτρινα περιγράμματα (Σχήμα 5.7α), όπου ογκώδεις ομάδες κοντά στις

πράσινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση, ενώ προκαλούν το αντίθετο αποτέλεσμα όταν βρεθούν κοντά στις κίτρινες περιοχές.

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με περιγράμματα κόκκινου και μπλε χρώματος (Σχήμα 5.7β), όπου ομάδες αρνητικά φορτισμένες κοντά στις κόκκινες περιοχές αυξάνουν την ανασταλτική δράση και τη μειώνουν κοντά στα μπλε περιοχές, όπου αντίθετα ευνοείται η παρουσία των ηλεκτροθετικών ομάδων.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, οι κίτρινες περιοχές είναι περισσότερες από τις πράσινες στους ισοϋψείς χάρτες για το στερικό πεδίο του μοντέλου CoMFA (Σχήμα 5.7α). Το μεγάλο πράσινο πολυέδρο και το μικρό γύρω από την αριστερή πλευρά (LHS) του ανθρανιλικού σκελετού δείχνουν ότι ογκώδεις ομάδες στις θέσεις αυτές αυξάνουν τη δραστηριότητα.

Για παράδειγμα, οι ενώσεις **4**, **5**, **9**, **10** και **40-47** που φέρουν ογκώδεις ομάδες, όπως είναι η $-CF_3$ στην ορθο- ή μετα-θέση της φαινυλομάδας έδειξαν υψηλές βιοδραστικότητες. Ομοίως, το μικρό πράσινο περίγραμμα στον χάρτη πάνω από το άτομο αζώτου δικαιολογεί τις υψηλές βιοδραστικότητες των ενώσεων **24**, **36**, **38** και **40-47**, καθώς η ομάδα *N*-*i*Pr αντικαθίσταται από την ομάδα *N*-H. Αντιθέτως, υπάρχει ένα κίτρινο περίγραμμα στον χάρτη γύρω από τη δεξιά πλευρά (RHS) του ανθρανιλικού σκελετού που υποδεικνύει τη χαμηλή βιοδραστικότητα των ενώσεων που φέρουν ογκώδεις ομάδες στη μετα-θέση του βενζολικού δακτυλίου, όπως παρατηρείται και για τις ενώσεις **5a-c**. Το δεύτερο μεγάλο κίτρινο περίγραμμα στον χάρτη δείχνει ότι η παρουσία ενός συνδετήρα, όπως το οξυγόνο, μεταξύ των δύο δακτυλίων αυξάνει τη βιοδραστικότητα που δεν συμβαίνει με τις ενώσεις **9a** και **10a** που δεν παρουσιάζουν βιοδραστικότητα. Τέλος, οι άλλες τρεις κίτρινες περιοχές γύρω από τη δεξιά πλευρά RHS του ανθρανιλικού σκελετού δείχνουν ότι ογκώδεις ομάδες μεταξύ του ατόμου του αζώτου και του δακτυλίου δεν προτιμώνται, ενώ σουλφοναμιδικές ή καρβοξαμιδικές ομάδες είναι κατάλληλες για αυτή τη θέση.



Σχήμα 5.7: Οι ισοϋψείς χάρτες StDev*Coeff των πεδίων CoMFA για την πιο δραστική ένωση 8: (α) συμπαιγείς για το στερικό πεδίο (πράσινο: προτιμούνται οι ογκώδεις ομάδες, κίτρινο: δεν προτιμούνται οι ογκώδεις ομάδες), (β) σε πλέγμα για το ηλεκτροστατικό πεδίο (μπλε: προτιμούνται οι ηλεκτροθετικές ομάδες, κόκκινο: προτιμούνται οι ηλεκτραρνητικές ομάδες).

Στον ισοϋψή χάρτη για το ηλεκτροστατικό πεδίο (Σχήμα 5.7β), υπάρχει μία πολύ μεγάλη μπλε περιοχή γύρω από το σημείο πρόσδεσης. Η παρουσία της υποδεικνύει ότι η εισαγωγή ηλεκτροθετικής ομάδας γύρω από αυτή τη θέση αυξάνει την ανασταλτική δράση της ένωσης. Παρόλα αυτά, το μεγάλο κόκκινο περιγράμμα στον ίδιο χάρτη όπως και η μικρή κόκκινη περιοχή γύρω από την αριστερή πλευρά LHS του ανθρανιλικού σκελετού δείχνουν ότι οι ενώσεις με ηλεκτραρνητικές ομάδες σε αυτές τις θέσεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη βιοδραστικότητα. Λαμβάνοντας υπόψη το θετικό δυναμικό της Arg490 που τοποθετείται σε χωρική εγγύτητα με την αριστερή πλευρά του ανθρανιλικού

σκελετού (LHS), θα ήταν κατάλληλες αρνητικά φορτισμένες ομάδες, όπως καρβοξυλομάδες, να τοποθετηθούν σε αυτή τη θέση της ένωσης (ενώσεις **7** και **8**).

5.6 Εικονική διαλογή

Το παραγόμενο μοντέλο QSAR, στη συνέχεια, χρησιμεύει ως εργαλείο για τη διαλογή βάσεων δεδομένων ή εικονικών βιβλιοθηκών χημικών ενώσεων, με σκοπό να δοθεί προτεραιότητα για πειραματική αξιολόγηση στις πιο δραστικές ενώσεις που έχουν εξαχθεί από το μοντέλο. Σε αυτό το πλαίσιο, πραγματοποιήθηκε εικονική διαλογή αναλόγων ανθρανιλικού οξέος από τη βάση δεδομένων της PubChem χρησιμοποιώντας τη ροή εργασίας του λογισμικού KNIME.

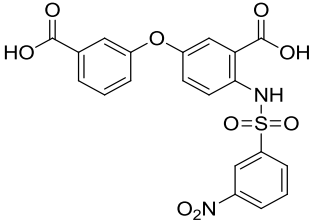
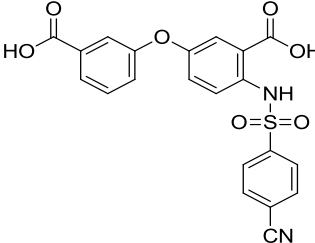
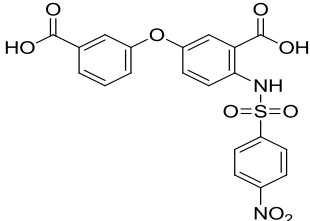
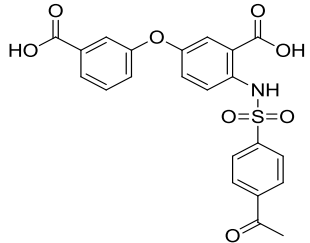
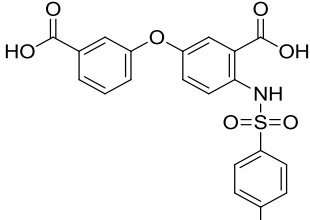
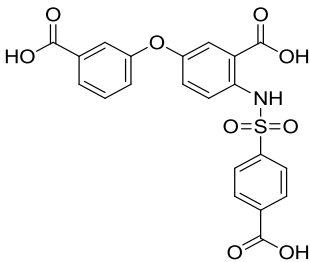
Αρχικά, 160.112 ενώσεις που περιέχουν τον σκελετό (ικρίωμα) του ανθρανιλικού οξέος αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων της PubChem. Οι ενώσεις αυτές συγκρίθηκαν με την πιο δραστική ένωση του αρχικού συνόλου δεδομένων της παρούσας μελέτης, την ένωση **8** (ID = 23, IC₅₀ = 0,085 μM), χρησιμοποιώντας τον δείκτη ομοιότητας Tanimoto και εκφραζόμενες σε «δακτυλικά αποτυπώματα» (η διαδικασία περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4). Επιλέχθηκαν 1.279 ενώσεις για την ιεράρχηση, των οποίων η μέτρηση της ομοιότητας Tanimoto ήταν μεγαλύτερη από 0,80, με βάση την πρόβλεψη του προτεινόμενου μοντέλου CoMFA που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της δραστικότητας των ενώσεων.

Η προσέγγιση αυτή που βασίζεται στον σκελετό και την αναζήτηση ομοιότητας δακτυλικών αποτυπωμάτων ενώσεων από τη βάση δεδομένων της PubChem, περιόρισε τον αριθμό των υποψήφιων χημικών ενώσεων, και συνεπώς, αυξάνει τις πιθανότητες επιτυχίας, δεδομένου ότι το παραγόμενο μοντέλο 3D-QSAR αναπτύχθηκε με βάση το ειδικό αυτό μοτίβο σκελετού.

Οι τιμές pIC₅₀ των 18 πιο ισχυρών ενώσεων (**1vs-18vs**) που προβλέφθηκαν από το καθιερωμένο μοντέλο CoMFA παρατίθενται στον Πίνακα 5.5. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος των ADME ιδιοτήτων και φυσικών παραμέτρων για τις εξαχθείσες ενώσεις, ώστε να διαπιστωθεί αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα. Όλες οι ενώσεις πέρασαν επιτυχώς τη διαδικασία αυτή (Πίνακας 5.6).

Πίνακας 5.5: Δομές και προβλεπόμενες τιμές pIC_{50} των ενώσεων της εικονικής διαλογής.

Ένωση	Δομή	Προβλεπόμενη pIC_{50}
1vs		7,094
2vs		6,968
3vs		6,903
4vs		6,827
5vs		6,581
6vs		6,804

7vs		6,503
8vs		7,213
9vs		7,383
10vs		6,899
11vs		6,638
12vs		7,103

13vs		6,752
14vs		6,678
15vs		6,573
16vs		6,547
17vs		6,643
18vs		6,639

Τέλος, έγινε αναζήτηση της βιοδραστικότητας αυτών των προβλεπόμενων ενώσεων χρησιμοποιώντας τις βάσεις δεδομένων της PubChem και της ChEMBL, αλλά δεν βρέθηκαν βιολογικά δεδομένα. Η αναζήτηση συνεχίστηκε στη βάση δεδομένων της SureChem, η οποία περιέχει από το 1976 μια συλλογή μεγαλύτερη από 15 εκατομμύρια χημικές δομές από διπλώματα ευρεσιτεχνιών (πατέντες) των Ηνωμένων Πολιτειών (US), των Ευρωπαϊκών

Διπλωμάτων Ευρεσιτεχνίας (EP) και της Παγκόσμιου Οργανισμού Πνευματικής Ιδιοκτησίας (WIPO) διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας πλήρους κειμένου. Οι πληροφορίες που αντλήθηκαν συνοψίζονται στον Πίνακα 5.7. Για τις ενώσεις **15vs-18vs** δεν βρέθηκαν δεδομένα. Είναι αξιοσημείωτο όμως ότι οι ενώσεις **2vs-14vs** έχουν οριστεί ως μικρά μόρια αναστολείς εισόδου του ιού του HIV. Στο δίπλωμα ευρεσιτεχνίας με αριθμό US7429677B2,²⁸⁴ έχει αναφερθεί ότι αυτές οι ενώσεις αποτελούν αναστολείς της διαδικασίας εισόδου του HIV εντός του κυττάρου ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για φαρμακευτικές ενώσεις που έχουν σχεδιαστεί για να παρεμποδίζουν τον ιό HIV από την είσοδο του στο ανθρώπινο κύτταρο παρεμβαίνοντας σε διάφορες φάσεις της προσκόλλησης και σύντηξης μεταξύ του HIV και του κυττάρου. Δεδομένου ότι η ταυτόχρονη μόλυνση από τον ιό HCV και τον ιό του HIV έχει γίνει μια παγκόσμια πρόκληση για τη δημόσια υγεία, αποτελεί σημαντικό το γεγονός ότι η προτεινόμενη μεθοδολογία μας κατάφερε να αντλήσει και να καταλήξει σε αυτά τα μικρά μόρια που έχουν ήδη αποδειχθεί ότι δρουν ως αναστολείς του HIV, καθώς και ότι αυτά τα μικρά μόρια θα μπορούσε να είναι δυνάμει υποψήφια φάρμακα ως διπλοί αναστολείς της λοίμωξης από τους ιούς του HIV και της HCV.

Πίνακας 5.6: Διακύμανση τιμών πρόβλεψης για τις κυριότερες ιδιότητες των ενώσεων εικονικής διαλογής, όπως υπολογίστηκαν με την εφαρμογή του QikProp.

Ιδιότητες / Φυσικοί περιγραφείς	Διακύμανση τιμών
Μοριακό βάρος	418,5 – 495,6
Άτομα-δέκτες δεσμού υδρογόνου	7 – 12
Άτομα-δότες δεσμού υδρογόνου	1 – 3
Συντελεστής κατανομής νερού/οκτανόλης	-0,3 – 4,3
Διαλυτότητα σε νερό	11,8 – 18,8
Αριθμός ατόμων αζώτου και οξυγόνου	7 – 11
Αριθμός μεταβολικών αντιδράσεων	0 – 3

Πίνακας 5.7: Δεδομένα για τις ενώσεις εικονικής διαλογής βασισμένα στη χημική βάση δεδομένων με διπλώματα ευρεσιτεχνίας SureChem.

Ένωση VS	Ημερομηνία Δημοσίευσης	Εκδοχέας/Αιτών	Περιγραφή
1vs	2008-12-24	Tibotec Pharmaceuticals Ltd	Σύστημα δοκιμής με βάση το ομογενές φθορισμό χρονικής ανάλυσης
	2007-10-11		
2vs-14vs	2008-09-30	Tibotec Pharmaceuticals Ltd	Μικρά μόρια-αναστολείς εισόδου
15vs-18vs	Δεν βρέθηκαν δεδομένα		

5.7 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο, αναπτύχθηκε με επιτυχία υπολογιστική ροή εργασίας εικονικής διαλογής συνδυάζοντας τη μοριακή πρόσδεση, τη μέθοδο 3D-QSAR CoMFA και αυτή της αναζήτησης ομοιότητας, διαλογή που εφαρμόστηκε στη βάση δεδομένων της PubChem. Η υπολογιστική αυτή ροή εργασίας στόχευε στον εντοπισμό αναλόγων με βάση το ανθρανιλικό οξύ που θα μπορούσαν να δρουν ως αναστολείς της αντιγραφής του HCV. Στην προτεινόμενη προσέγγιση, αναπτύχθηκε πρώτα ένα ισχυρό, επικυρωμένο τρεις φορές προγνωστικό μοντέλο 3D-QSAR CoMFA που στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την εικονική διαλογή ενώσεων από τη βάση δεδομένων της PubChem. Ο χημικός χώρος αναζήτησης των ενώσεων περιορίστηκε, εστιάζοντας μόνο στις ενώσεις που περιέχουν τον σκελετό του ανθρανιλικού οξέος. Η αναζήτηση ομοιότητας στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την άντληση των ενώσεων που είναι παρόμοιες με τον γνωστό και δραστικό αναστολέα από το αρχικό σύνολο δεδομένων της μελέτης. Με αυτόν τον τρόπο, κατορθώθηκε να εντοπιστούν οι περισσότερες υποσχόμενες ενώσεις από μια ομάδα νέων αναλόγων και να δοθεί προτεραιότητα για πειραματική αξιολόγηση σε έναν κατάλογο ενώσεων. Η προσέγγιση αποκάλυψε πολλά υποσχόμενες χημικές ενώσεις με πιθανή ισχυρή ανασταλτική δράση.²⁸⁵ Αυτή η ροή εργασίας μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη διαλογή άλλων βάσεων δεδομένων ή εικονικών συνδυασμών ώστε να εξαχθούν και άλλα παράγωγα με επιθυμητή δραστηριότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΟΥ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ 3D-QSAR ΠΡΟΣ ΕΞΕΥΡΕΣΗ ΝΕΩΝ ΙΣΧΥΡΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ BCR-ABL

6.1 Εισαγωγή

Το 2010, ο Reddy και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν την κυτταρική σειρά K562, με σκοπό να αξιολογηθεί η *in vitro* κυτταροτοξικότητα 33 νέων (E)-α-βενζυλο-θειο χαλκονών, που έχουν συνθέσει. Οι ενώσεις αυτές είναι ειδικοί αναστολείς της κινάσης τυροσίνης BCR-ABL, και η δομή τους δεν μοιάζει με αυτή του ATP ή άλλων νουκλεοζιτών πουρίνης και πυριμιδίνης.¹¹³ Οι συγγραφείς πρότειναν ότι αυτές οι χαλκόνες αναμένεται να δεσμευτούν σε περιοχές διαφορετικές από τη θέση πρόσδεσης του ATP στην κινάση BCR-ABL, και ως εκ τούτου τα κύτταρα της CML σε επεξεργασία με τους παράγοντες αυτούς μπορεί να μην αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στο φάρμακο λόγω των μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης.

Μερικές από τις ενώσεις βρέθηκαν πολύ ισχυρές κατά των κυττάρων της σειράς K562, με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονταν μεταξύ 0,3-0,9 μΜ.¹¹³ Η κυτταρική σειρά K562,⁸⁷ για την οποία έγινε αναφορά στο Κεφάλαιο 2, είναι μια θετική κυτταρική σειρά της CML BCR-ABL και χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό ισχυρών αναστολέων της κινάσης BCR-ABL. Αποτελεί επίσης ένα χρήσιμο σύστημα μοντέλου για την αναγνώριση αντικαρκινικών παραγόντων που προάγουν τη διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται κατά μήκος της ερυθροειδούς και μεγακαρυοκυτταρικής γράμμωσης.^{286, 287} Η θεραπεία της διαφοροποίησης είναι η προσέγγιση *state-of-the-art* για τη θεραπεία νεοπλασματικών νόσων. Κι αυτό γιατί είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται μόρια που επάγουν τη διαφοροποίηση, παρά να εμφανίζουν απλά κυτταροτοξικότητα.²⁸⁸

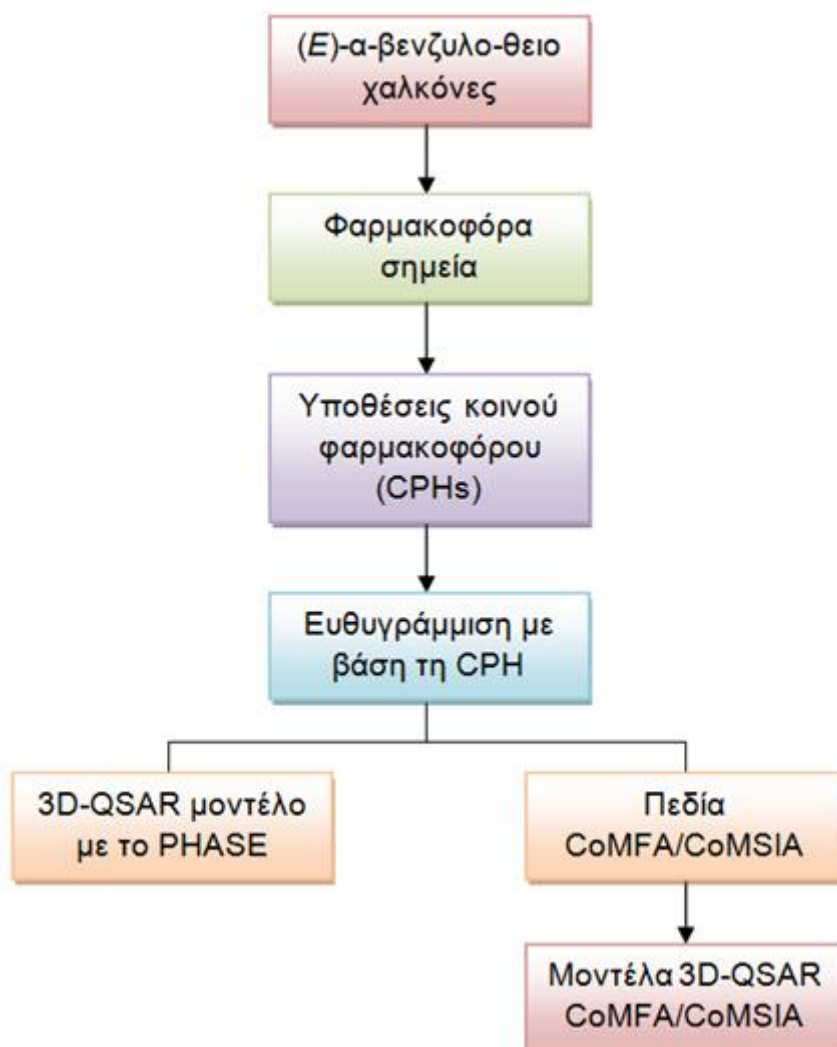
Φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αναστολής της κινάσης τυροσίνης από χημικές ουσίες, όπως το imatinib, και της επαγωγής της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων και ενεργοποίησης της γ-σφαιρίνης στα κύτταρα K562 (κυτταρική σειρά της CML BCR-ABL) και στις πρωτογενείς ερυθροειδείς

καλλιέργειες. Αυτή η συσχέτιση φαίνεται να είναι μέσω των από κάτω ή από πάνω ρυθμιστικών οδών σηματοδότησης που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση που επάγεται από την ερυθροποιητίνη (EPO). Επιπλέον, η αναστολή της κινάσης τυροσίνης φαίνεται επίσης να είναι αποτελεσματική στην ανακούφιση του πόνου και της φλεγμονής από SCD με αναστολή της ενεργοποίησης των μαστοκυττάρων. Ως εκ τούτου, η έρευνα για την εύρεση ισχυρών αναστολέων της κινάσης τυροσίνης που δεν δρουν μέσω της θέσης πρόσδεσης του ATP θα μπορούσε να έχει δύο ευεργετικά αποτελέσματα: την παροχή θεραπείας σε ασθενείς με CML μέσω της διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων, αλλά και την υποβοήθηση των ασθενών με β-θαλασσαιμία και SCD μέσω της επαγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης που επιτυγχάνεται μέσω της διαφοροποίησης.

Σε αυτό το κεφάλαιο, περιγράφεται μία ροή εργασίας πολλαπλών σταδίων, η οποία συνδυάζει τη μοντελοποίηση φαρμακοφόρου και μελέτες 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA, προκειμένου να γίνουν αντιληπτά τα δομικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την κυτταροτοξικότητα των 33 προαναφερθέντων χαλκονών στην κυτταρική σειρά K562.

Σε μια ορθολογική προσέγγιση του σχεδιασμού φαρμάκων, η δημιουργία τριδιάστατων φαρμακοφόρων είναι πολύ χρήσιμη για τον εντοπισμό των φαρμακοφόρων χαρακτηριστικών που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων ισχυρών μορίων. Οι δομές των (E)-α-βενζυλο-θειο χαλκονών και οι τιμές της *in vitro* κυτταροτοξικότητάς τους αξιοποιήθηκαν προκειμένου να οικοδομηθεί ένα ισχυρό 3D φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση τα άτομα (atom-based) με τη χρήση του λογισμικού PHASE που παρέχεται από την εταιρία Schrödinger.²⁸⁹ Το φαρμακοφόρο μοντέλο που αναπτύχθηκε παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά και τη γεωμετρία ενώσεων με ισχυρή κυτταροτοξικότητα κατά της κυτταρικής σειράς K562. Η ευθυγράμμιση των διαμορφώσεων των ενώσεων που ελήφθη με βάση τα φαρμακοφόρα σημεία χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τον υπολογισμό των CoMFA και CoMSIA πεδίων και την ανάπτυξη των αντίστοιχων μοντέλων 3D-QSAR. Ομοίως, οι ισοϋψείς χάρτες που παρήχθησαν από την μελέτη 3D-QSAR μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των δομικών χαρακτηριστικών που αφορούν την

κυτταροτοξικότητα σε αυτή τη σειρά των ενώσεων και οι πληροφορίες που λαμβάνονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω σχεδιασμό βιοδραστικών μορίων. Η υπολογιστική ροή εργασίας που ακολουθήθηκε απεικονίζεται γραφικά στο Σχήμα 6.1.



Σχήμα 6.1: Η υπολογιστική ροή εργασίας που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη.

Μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία, αναφέρονται μόνο λίγες μελέτες QSAR των αναστολέων της BCR-ABL. Μοριακή μοντελοποίηση με χρήση των αναλύσεων 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA εφαρμόστηκε σε μια σειρά από 63 φαινυλαμινοπυριμιδίνες (PAP), ως αναστολείς της κινάσης BCR-ABL από τον San Juan.²⁹⁰ Στη μελέτη του αυτή, γίνονται γνωστές οι δομικές απαιτήσεις του προσδέτη, οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στον σχεδιασμό νέων και πιο ισχυρών ενώσεων αναστολέων της BCR-ABL.

Λίγα χρόνια αργότερα, μια άλλη ερευνητική ομάδα μελέτησε μια διαφορετική σειρά των παραγώγων PAP, περιλαμβανομένου του imatinib, ως αναστολείς της κινάσης BCR-ABL, πραγματοποιώντας μελέτες χαρτογράφησης φαρμακοφόρου.²⁹¹ Αναπτύχθηκε ένα φαρμακοφόρο επτά τοποθεσιών, αποτελούμενο από μία υδρόφοβη ομάδα (H), δύο δότες δεσμού υδρογόνου (D) και τέσσερις αρωματικούς δακτυλίους (R) χρησιμοποιώντας το λογισμικό του PHASE. Κατασκευάστηκε ένα στατιστικά σημαντικό μοντέλο 3D-QSAR με μια εξαιρετική ισχύ πρόβλεψης, και ως εκ τούτου, το ληφθέν μοντέλο προτάθηκε από τους συγγραφείς ως ένα χρήσιμο εργαλείο για τον σχεδιασμό νέων μορίων-οδηγών με ισχυρή δράση ενάντια της δράσης της κινάσης BCR-ABL.

Το 2014, ο R. Baskaran και οι συνεργάτες του κατέληξαν σε επτά ενώσεις, που προέρχονται από διάφορες βάσεις δεδομένων μικρών μορίων, χρησιμοποιώντας υψηλής απόδοσης εικονική διαλογή.²⁹² Πραγματοποιήθηκαν μελέτες μοριακής πρόσδεσης και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (MD), οι οποίες έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές έχουν βαθμολογίες πρόσδεσης στη κινάση BCR-ABL υψηλότερες από αυτή του imatinib. Ο Zhang και οι συνεργάτες του στις μελέτες τους (2013, 2014), συνέθεσαν μία νέα κατηγορία παραγώγων του αναστολέα nilotinib, καθώς και μια σειρά από πυριδιν-3-υλο πυριμιδίνες και αξιολογήθηκαν πειραματικά για τη δραστηριότητα τους στην κινάση BCR-ABL.^{293, 294} Μελέτες μοριακής πρόσδεσης διεξήχθησαν επίσης, προκειμένου να διερευνηθεί η ο τρόπος πρόσδεσης αυτών των ενώσεων στο ένζυμο.

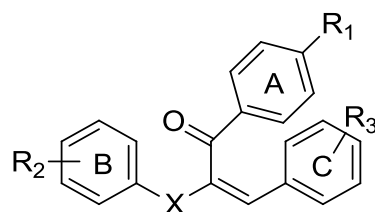
Ακόμη, σε μια άλλη μελέτη, διεξήχθησαν αφενός μοντελοποίηση 3D φαρμακοφόρου και αφετέρου μελέτες QSAR σε μια σειρά 25 παραγώγων του nilotinib, προκειμένου να προσδιοριστούν τα χημικά χαρακτηριστικά που συνεισφέρουν στην ανασταλτική δράση του nilotinib έναντι της δράσης της κινάσης BCR-ABL.²⁹⁵ Έτσι, με το PHASE, δημιουργήθηκε ένα φαρμακοφόρο επτά τοποθεσιών, που περιλάμβανε δύο δέκτες δεσμού υδρογόνου (A), δύο δότες δεσμού υδρογόνου (D), και τρεις αρωματικούς δακτυλίους (R). Το παραγόμενο μοντέλο έδειξε υψηλή ισχύ πρόβλεψης για την ομάδα ελέγχου των αναστολέων της BCR-ABL. Πρόσφατα, ο Ma και οι συνεργάτες του μελέτησαν *N*(9)-αρενθένυλο-πουρίνες, ως αναστολείς της κινάσης BCR-ABL,

χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό μεθόδων, του 3D-QSAR, της μοριακής πρόσδεσης και των προσομοιώσεων MD, προκειμένου να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί των αλληλεπιδράσεων μεταξύ προσδέτη και υποδοχέα, και να δοθεί μία εικόνα για τα δομικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται στον σχεδιασμό νέων βιοδραστικών αναστολέων.²⁹⁶

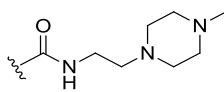
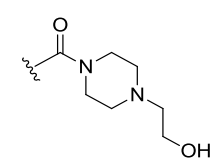
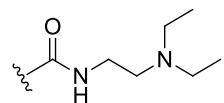
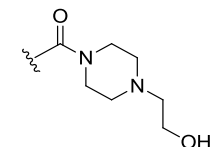
6.2 Σχεδιασμός και προετοιμασία των αναστολέων

Οι 33 ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία και είχαν καθορισμένη στερεοχημεία και τιμές κυτταροτοξικότητας (Πίνακες 6.1 και 6.2). Σύμφωνα με τη μελέτη των συγγραφέων, η κυτταροτοξικότητα των 33 ενώσεων εξαρτάται από τη θέση της θειο-ομάδας στο μόριο, την κατάσταση οξειδωσης του θείου και τη φύση και θέση των υποκαταστατών στους αρωματικούς δακτυλίους. Οι δομές των ενώσεων σχεδιάστηκαν με τη χρήση του ChemBioDraw Ultra 12.0,²⁹⁷ και εισήχθησαν στον πίνακα εργασίας του Maestro 10.2²⁹⁸ με τη μορφή των SMILES τους. Οι διδιάστατες χημικές δομές μετατράπηκαν σε 3D χρησιμοποιώντας την εφαρμογή LigPrep 3.4²⁹⁹ και προστέθηκαν όλα τα άτομα υδρογόνου, δημιουργήθηκαν τυχόν στερεοϊσομερή και διάφορες καταστάσεις ιοντισμού (σε εύρος pH 7,0 ± 2,0) και τα μόρια βελτιστοποιήθηκαν γεωμετρικά. Τέλος, οι δομές υποβλήθηκαν σε πλήρη διαμορφωτική ανάλυση με χρήση του MacroModel 10.8,³⁰⁰ ώστε να παραχθούν όλες οι πιθανές διαμορφώσεις του κάθε μορίου. Οι διαμορφώσεις δημιουργήθηκαν με τη συνδυασμένη μέθοδο δειγματοληψίας στρέψης (torsional) και χαμηλού επιπέδου (Low mode) χρησιμοποιώντας ως μέγιστο τα 1.000 βήματα και το πεδίο δυνάμεων OPLS_2005.¹³⁸ Όλες οι διαμορφώσεις των ενώσεων στη συνέχεια ελαχιστοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Polak-Ribiere Conjugated Gradient (PRCG, 500 επαναλήψεις με βαθμίδα ελαχιστοποίησης 0,01 kcal/mol·Å) με το νερό να ορίζεται ως διαλύτης. Μετά από αυτή την προετοιμασία, οι ενώσεις ήταν έτοιμες για χρήση. Οι τιμές της *in vitro* κυτταροτοξικότητας των 33 ενώσεων, εκφρασμένες σε IC₅₀, κυμαίνονται από 0,2-75 μM, μετατράπηκαν στον αρνητικό λογάριθμο της τιμής IC₅₀ (pIC₅₀) και ορίζονται στον Πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.1: Οι χημικές δομές των (*E*)-α-βενζυλο-θειο χαλκονών.



ID	Ένωση*	R ₂	X	R ₁	R ₃
1	6a	4-Br	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Cl
2	6b	4-Br	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Br
3	6c	4-Br	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-F
4	6d	4-Cl	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-F
5	6e	4-Cl	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Cl
6	6f	4-Cl	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Br
7	6g	4-F	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Cl
8	6h	4-F	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-F
9	6i	4-F	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Br
10	6j	4-F	CH ₂ S	F	3-NO ₂ , 4-F
11	6k	2-F	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Cl
12	6l	2-Cl	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-F
13	6m	2,4-Cl ₂	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Cl
14	6n	2,4-Cl ₂	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-F
15	6o	2,4-Cl ₂	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-Br
16	6p	4-CH ₃	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-F
17	6q	4-CF ₃	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-F
18	6r	4-Br	CH ₂ S	COOCH ₃	3-NO ₂ , 4-F
19	6s	H	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-F
20	8a	4-Br	CH ₂ SO ₂	COOH	3-NO ₂ , 4-F
21	8b	4-Br	CH ₂ SO ₂	COOH	3-NO ₂ , 4-Cl
22	11	4-Br	S	COOH	3-NO ₂ , 4-F

23	6aa	4-Br	CH ₂ S	COOH	3-OCH ₃ , 4-F
24	6ab	4-Br	CH ₂ S	COOH	3-Br, 4-OH
25	6ac	4-Br	CH ₂ S	COOH	3-NO ₂ , 4-OH
26	6ad	4-Br	CH ₂ S	COOH	2-F, 5-NO ₂
27	6ae	4-Br	CH ₂ S	COOH	3-F, 4-NO ₂
28	6af	4-Br	CH ₂ S	COOH	2-NO ₂ , 4-F
29	6ag	4-Br	CH ₂ S	COOH	2-F, 4-NO ₂
30	12a	4-Br	CH ₂ S		3-NO ₂ , 4-F
31	12b	4-Br	CH ₂ S		3-NO ₂ , 4-F
32	12c	4-Br	CH ₂ S		3-NO ₂ , 4-F
33	12d	4-F	CH ₂ S		3-NO ₂ , 4-F

*Η αρίθμηση των ενώσεων της δεύτερης στήλης του πίνακα έχει αντληθεί από την αντίστοιχη βιβλιογραφία 113.

Πίνακας 6.2: Οι τιμές IC₅₀, οι pIC₅₀, και οι προβλεπόμενες pIC₅₀ των (E)-α-βενζυλο-θειο χαλκονών με βάση τα μοντέλα 3D-QSAR PHASE, CoMFA και CoMSIA.

ID	IC ₅₀ (μM)**	pIC ₅₀	Προβλεπόμενη pIC ₅₀ PHASE	Προβλεπόμενη pIC ₅₀ CoMFA	Προβλεπόμενη pIC ₅₀ CoMSIA
1	0,7	6,155	6,16	6,213	6,188
2	0,9	6,046	6,11	6,195	6,203
3*	0,3	6,523	6,33	6,423	6,371
4*	0,5	6,301	6,35	6,426	6,402
5	0,5	6,301	6,22	6,214	6,222
6	0,6	6,222	6,31	6,203	6,243

7	0,5	6,301	6,29	6,292	6,252
8*	0,4	6,398	6,32	6,504	6,438
9	0,4	6,398	6,37	6,278	6,274
10*	0,6	6,222	6,36	6,339	6,481
11*	0,8	6,097	6,39	6,259	6,444
12	0,5	6,301	6,38	6,492	6,466
13	0,6	6,222	6,17	6,202	6,189
14	0,4	6,398	6,43	6,405	6,430
15	0,6	6,222	6,23	6,178	6,202
16	0,3	6,523	6,37	6,407	6,477
17	0,4	6,398	6,42	6,427	6,453
18	0,3	6,523	6,48	6,566	6,517
19	0,3	6,523	6,44	6,486	6,448
20	5	5,301	5,16	5,115	5,083
21	25	4,602	4,78	4,796	4,991
22	1,5	5,824	5,88	5,782	5,820
23	20	4,699	4,72	4,670	4,709
24	35	4,456	4,41	4,474	4,425
25*	75	4,125	4,50	4,573	4,390
26*	7,5	5,125	5,06	4,918	4,704
27	5,0	5,301	5,30	5,330	5,284
28	20	4,699	4,62	4,700	4,640
29	7,5	5,125	5,17	5,123	5,081
30	0,6	6,222	6,25	6,179	6,180
31	0,2	6,699	6,74	6,750	6,707
32	0,75	6,125	6,18	6,109	6,101
33*	0,3	6,523	6,55	6,365	6,628

*Ενώσεις της ομάδας δοκιμής

**Τα κύτταρα K562 απλώθηκαν σε 1×10^5 κύτταρα/ml και επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις της κάθε ένωσης. Το DMSO χρησιμοποιήθηκε για τον αρνητικό έλεγχο. Μετά από 96 ώρες της θεραπείας προσδιορίστηκε η κυτταρική βιωσιμότητα.

6.3 Δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου

Το λογισμικό του PHASE (έκδοση 3.4), που παρέχεται από την εταιρία Schrödinger, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αναπτυχθεί μια υπόθεση κοινού φαρμακοφόρου (CPH) για μοντέλο, καθώς και η επακόλουθη ευθυγράμμιση που βασίζεται σε αυτή την υπόθεση. Στην παρούσα μελέτη, όλες οι δομές μετά την προετοιμασία τους εισήχθησαν στον πίνακα της ροής εργασίας του PHASE, και η κυτταροτοξικότητα (τιμές IC_{50}) επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως μεταβλητή της πειραματικής δραστηριότητας. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν τα όρια για τη δραστηριότητα των ενώσεων του συνόλου δεδομένων, με τα οποία τα μόρια που έχουν τιμή $IC_{50} \geq 6,50$ θεωρήθηκαν ως δραστικά, και τα μόρια που έχουν τιμή $IC_{50} \leq 5,00$ θεωρήθηκαν ως ανενεργά. Τα υπόλοιπα μόρια θεωρήθηκαν μέτριας δραστηριότητας. Ως εκ τούτου, στο σύνολο δεδομένων υπήρχαν έξι δραστικές ενώσεις και πέντε ανενεργές.

Σε επόμενο βήμα, ορίστηκαν τα χαρακτηριστικά ενός φαρμακοφόρου. Το PHASE παρέχει ένα ενσωματωμένο σύνολο έξι χαρακτηριστικών φαρμακοφόρου: δέκτης δεσμού υδρογόνου (A), δότης δεσμού υδρογόνου (D), υδρόφοβη ομάδα (H), αρνητικά φορτισμένη ομάδα (N), θετικά φορτισμένη ομάδα (P), και αρωματικός δακτύλιος (R). Κάθε χαρακτηριστικό φαρμακοφόρου ορίζεται από ένα σύνολο προτύπων χημικής δομής. Όλα τα πρότυπα ορίζονται ως αναζητήσεις SMARTS και αποδίδεται μία από τις τρεις πιθανές γεωμετρίες, που καθορίζει τα φυσικά χαρακτηριστικά της τοποθεσίας:

(α) σημείο (point): η τοποθεσία βρίσκεται σε ένα μόνο άτομο στην αναζήτηση SMARTS

(β) διάνυσμα (vector): η τοποθεσία βρίσκεται σε ένα μόνο άτομο στην αναζήτηση SMARTS, και η κατεύθυνση θα εκχωρηθεί σύμφωνα με ένα ή περισσότερα διανύσματα που προέρχονται από το άτομο, και

(γ) ομάδα (group): η τοποθεσία βρίσκεται στο κέντρο μιας ομάδας ατόμων στην αναζήτηση SMARTS. Για τους αρωματικούς δακτυλίους, η κατεύθυνση

της τοποθεσίας ορίζεται από ένα διάνυσμα που είναι κάθετο προς το επίπεδο του δακτυλίου.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν τα κοινά φαρμακοφόρα χρησιμοποιώντας μία δενδρική τεχνική διαχωρισμού, η οποία συγκεντρώνει παρόμοια φαρμακοφόρα ανάλογα με τις αποστάσεις μεταξύ των τοποθεσιών τους (δηλαδή την απόσταση ανάμεσα σε ένα ζεύγος τοποθεσιών του φαρμακοφόρου). Μετά την εφαρμογή των προκαθορισμένων χαρακτηριστικών για κάθε μόριο, δημιουργήθηκαν τα κοινά φαρμακοφόρα που περιέχουν πέντε τοποθεσίες με τη χρήση ενός «κύβου», με τελικό μέγεθος το 1 Å, και με την προϋπόθεση ότι όλες οι δραστικές ενώσεις θα πρέπει να ταιριάζουν με αυτό. Τα φαρμακοφόρα των τριών και τεσσάρων τοποθεσιών δεν συμπεριλήφθησαν σε αυτή την αναζήτηση, δεδομένου ότι τέτοιες υποθέσεις δεν μπορεί να περιέχουν όλα τα απαιτούμενα χαρακτηριστικά, και ως εκ τούτου δεν θα είναι δυνατή η πολύ καλή διάκριση μεταξύ δραστικών και αδρανών ενώσεων. Επιπλέον, για τον λόγο ότι οι ενώσεις του συνόλου δεδομένων είναι αρκετά παρόμοιες σε δομή, δεν επελέγησαν οι έξι τοποθεσίες στα κοινά φαρμακοφόρα, προκειμένου οι δομές που πιθανόν να υποβληθούν στη συνέχεια σε μία περαιτέρω εικονική διαλογή από βάση δεδομένων να μην περιορίζονται.

Συγκεντρώθηκαν 3.450 υποθέσεις κοινού φαρμακοφόρου (CPH₅) των πέντε τοποθετήσεων που ανήκουν σε πέντε διαφορετικούς συνδυασμούς των χαρακτηριστικών (AAHRR = 272, HHRRR = 887, AHRRR = 909, AHHRR = 1.275, AARRR = 107). Σε επόμενο βήμα, οι υποθέσεις, που ήταν αρκετές λόγω των πολλών «κουτιών», υποβλήθηκαν σε μία διαδικασία αυστηρής βαθμολόγησης, ώστε να αποδοθεί η καλύτερη ευθυγράμμιση των επιλεγμένων δραστικών ενώσεων (σκορ επιβίωσης). Η διαδικασία βαθμολόγησης παρέχει μια ιεράρχηση των διαφόρων υποθέσεων, όπου επιτρέπονται να γίνουν ορθολογικές επιλογές σχετικά με το ποιες υποθέσεις είναι πιο κατάλληλες για περαιτέρω διερεύνηση. Στη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι προεπιλεγμένες παράμετροι για τους όρους διάνυσμα, όγκο και τοποθεσία, και με μέγιστο συνολικό RMSD ίσο με 1,2 Å. Οι παράμετροι στον τύπο του σκορ επιβίωσης διατηρήθηκαν ως προεπιλογή, εκτός από τα βάρη του σκορ επιλεκτικότητας και τον αριθμό των

ταιριασμάτων που ορίστηκαν 0 και 1, αντίστοιχα. Οι υποθέσεις που προέκυψαν από αυτή τη διαδικασία στη συνέχεια βαθμολογήθηκαν σε σχέση με τις πέντε αδρανείς ενώσεις, χρησιμοποιώντας ένα βάρος ίσο με 1.

Οι υποθέσεις που πέτυχαν στη διαδικασία βαθμολόγησης, και πιο συγκεκριμένα αυτές με τα μεγαλύτερα σκορ επιβίωσης χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την κατασκευή μοντέλων 3D-QSAR με βάση τα άτομα με το PHASE. Το σύνολο δεδομένων των ενώσεων χωρίστηκε τυχαία σε ομάδα εκπαίδευσης και ομάδα δοκιμής σε μία αναλογία 75:25. Ως εκ τούτου, η ομάδα εκπαίδευσης αποτελείται από 25 ενώσεις και η ομάδα δοκιμής από οκτώ (Πίνακας 6.2).

Οι ενώσεις και των δύο ομάδων ευθυγραμμίστηκαν με βάση τις υποθέσεις κοινού φαρμακοφόρου που πέτυχαν στο προηγούμενο στάδιο, και κάθε αποτέλεσμα ευθυγράμμισης αναλύθηκε με τη μέθοδο PLS, όπως περιγράφεται από το PHASE.^{207, 208} Σε αυτή τη μέθοδο, οι περιγραφικές παράμετροι του PHASE αποτελούν τις ανεξάρτητες μεταβλητές και οι τιμές pIC_{50} θεωρούνται ως η μεταβλητή απόκρισης. Επιλέγησαν τέσσερις συνιστώσες PLS για την ανάλυση, και ως εκ τούτου, κατασκευάστηκαν γραμμικά μοντέλα παλινδρόμησης βασισμένα στα άτομα των ενώσεων της ομάδας εκπαίδευσης, που περιείχαν μία, δύο, τρεις και τέσσερις συνιστώσες της ανάλυσης PLS. Η ισχύ πρόβλεψης για κάθε ανάλυση προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τα μόρια της ομάδας δοκιμής που δεν συμπεριλήφθησαν στην κατασκευή του μοντέλου.

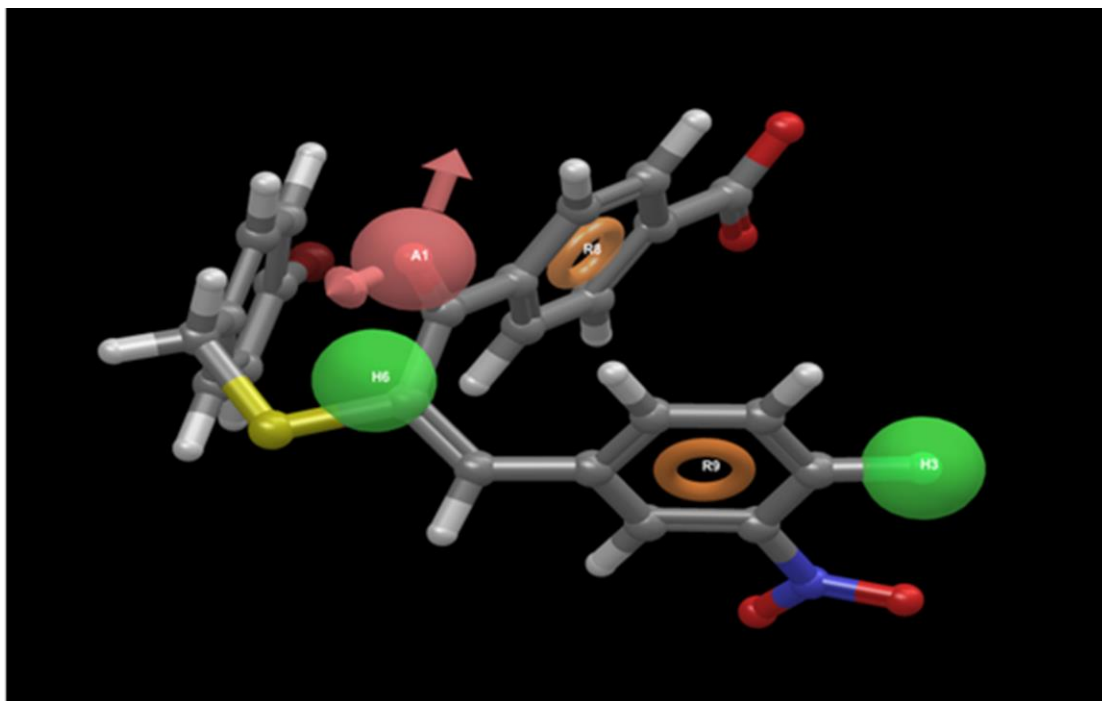
Περισσότερο αξιόπιστα στατιστικά αποτελέσματα έδωσαν οι αναλύσεις με τέσσερις συνιστώσες PLS, ενώ τα μοντέλα 3D-QSAR με τις ευνοϊκότερες παραμέτρους (συντελεστής συσχέτισης, τυπικό σφάλμα κ.α.) ανήκουν στις υποθέσεις κοινού φαρμακοφόρου με ID AHRR.423 και AAHR.76. Τα στατιστικά αποτελέσματα των δύο μοντέλων περιγράφονται στον Πίνακα 6.3, και στον Πίνακα 6.2 έχουν συμπεριληφθεί οι προβλεπόμενες τιμές pIC_{50} των ενώσεων του συνόλου δεδομένων, όπως εξήχθησαν με βάση το μοντέλο της υπόθεσης κοινού φαρμακοφόρου με ID AHRR.423, που θεωρήθηκε και το τελικό φαρμακοφόρο μοντέλο της μελέτης. Το φαρμακοφόρο εμφανίζεται στο Σχήμα 6.2 και περιέχει μία κόκκινη σφαίρα που υποδεικνύει τη θέση ενός δέκτη δεσμού υδρογόνου (A), δύο πράσινες σφαίρες που δείχνουν τις

υδρόφοβες περιοχές (H), και δύο πορτοκαλί δακτυλίδια υποδεικνύοντας τους αρωματικούς δακτυλίους (R). Οι αποστάσεις και οι γωνίες μεταξύ των χαρακτηριστικών του φαρμακοφόρου παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.3 και στους Πίνακες Π1, Π2 του Παραρτήματος IV.

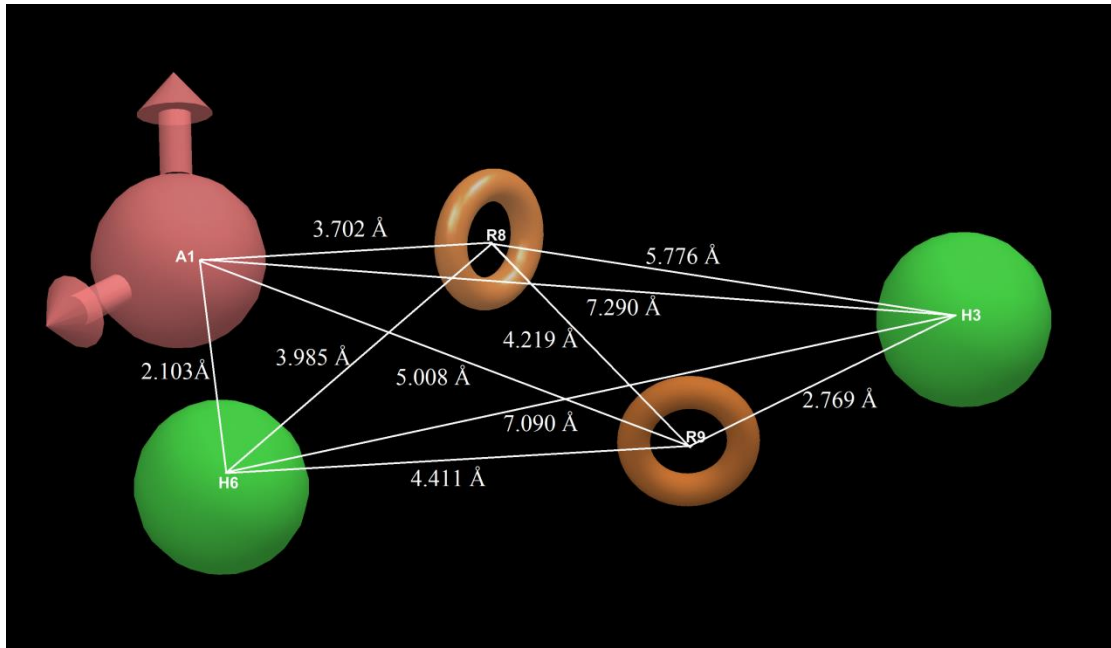
Πίνακας 6.3: Στατιστικές παράμετροι των μοντέλων 3D-QSAR με το PHASE.

ID	# Συν. PLS	SD	R ²	F	P	Σταθερότητα	RMSE	Q ²	Pearson-R
AHHRR.423	4	0,0819	0,9884	425,6	4,854 10 ⁻¹⁹	0,7288	0,1922	0,9418	0,9776
AAHRR.76	4	0,0779	0,9895	471,4	1,769 10 ⁻¹⁹	0,7124	0,3774	0,7756	0,9525

Οι παράμετροι και οι έννοιες τους αναλύθηκαν λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 3.

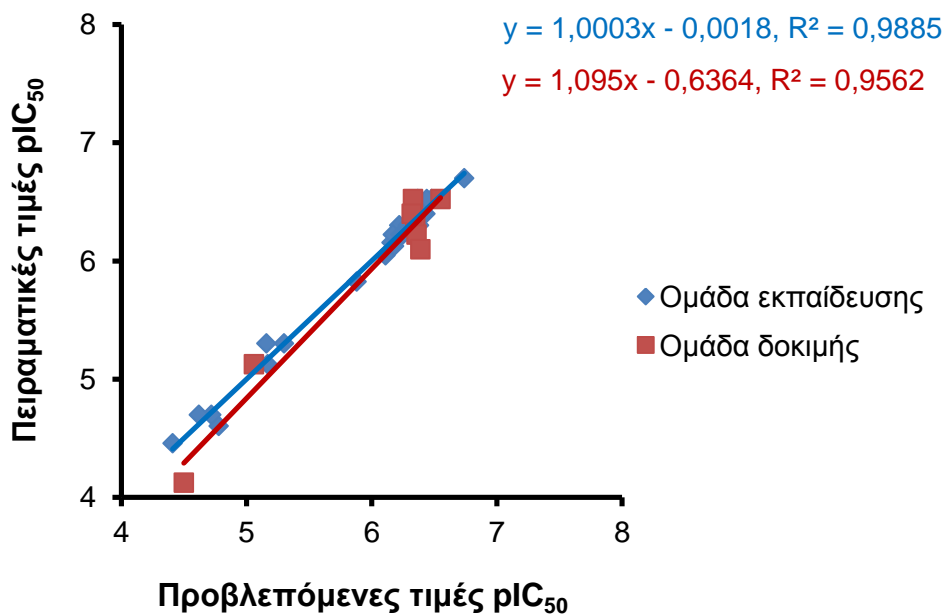


Σχήμα 6.2: Η υπόθεση κοινού φαρμακοφόρου για την ένωση 6c (ID AHHRR.423). Τα χαρακτηριστικά του φαρμακοφόρου παρουσιάζονται με κόκκινες (ανοιχτό) σφαίρες για τον δέκτη δεσμού υδρογόνου (A) με τα βέλη να δείχνουν προς την κατεύθυνση των μονήρων ηλεκτρονίων, με πράσινες σφαίρες για τις υδρόφοβες ομάδες (H), και πορτοκαλί δακτυλίους για τους αρωματικούς δακτυλίους (R).



Σχήμα 6.3: Οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων του φαρμακοφόρου με ID AHHRR.423.

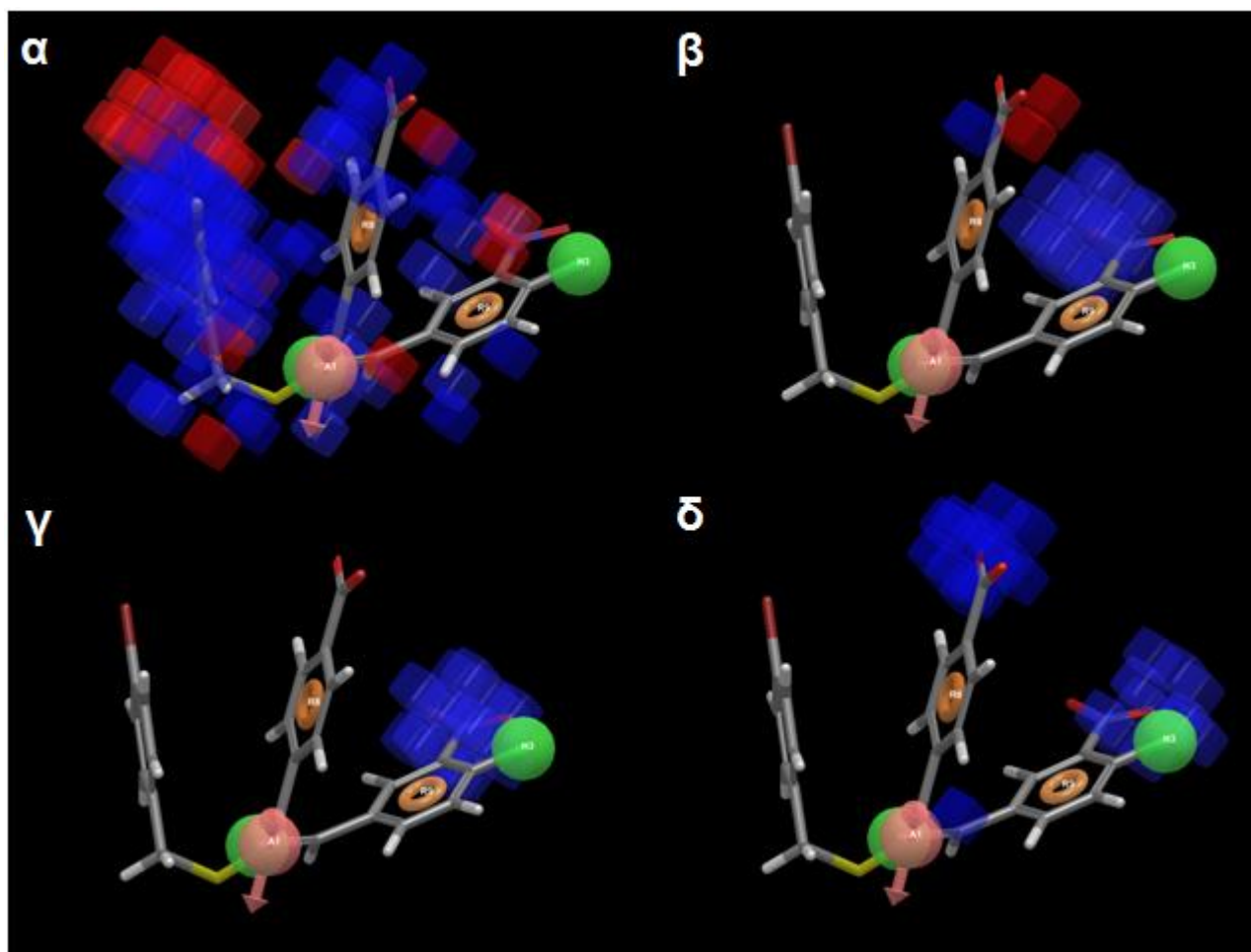
Τα στατιστικά αποτελέσματα του τελικού μοντέλου 3D-QSAR εμφανίζονται να είναι εξαιρετικά, με $R^2 = 0.9884$, $Q^2 = 0.9418$, και Pearson-R = 0.9776, και η πολύ υψηλή συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων τιμών IC_{50} των ενώσεων γίνεται πιο εμφανής με το διάγραμμα των τιμών αυτών για την ομάδα εκπαίδευσης και την ομάδα δοκιμής, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.4.



Σχήμα 6.4: Το διάγραμμα των πειραματικών έναντι των προβλεπόμενων τιμών IC_{50} για την ομάδα εκπαίδευσης και την ομάδα δοκιμής με το λογισμικό του PHASE.

Τα αποτελέσματα της μοντελοποίησης 3D-QSAR μπορούν επίσης να παρουσιαστούν χρησιμοποιώντας τα 3D εικονικά διαγράμματα του φαρμακοφόρου (Σχήμα 6.5). Σε αυτά τα διαγράμματα, το μοντέλο 3D-QSAR που εξάγεται από το PHASE αναπαριστάται από χρωματιστές περιοχές (μπλε και κόκκινους κύβους) σύμφωνα με το πρόσημο των τιμών των συντελεστών τους. Οι μπλε κύβοι αναφέρονται σε θετικούς συντελεστές, όπου το εκάστοτε χαρακτηριστικό είναι ζωτικής σημασίας για την αύξηση της δραστηριότητας, ενώ οι κόκκινοι κύβοι αναφέρονται σε αρνητικούς συντελεστές υποδεικνύοντας ότι η υποκατάσταση του χαρακτηριστικού είναι υπεύθυνη για τη μείωση της δραστηριότητας. Στο παρόν μοντέλο 3D-QSAR από το PHASE, οι παράμετροι (α) υδρόφοβο/μη-πολικό, (β) αρνητικά και (γ) θετικά φορτισμένο, και (δ) δέκτης ηλεκτρονίων, είναι που συμβάλλουν στην δραστηριότητα και θα συζητηθούν στη συνέχεια ξεχωριστά.

Στο Σχήμα 6.5α παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του υδρόφοβου μοντέλου. Ο χάρτης δείχνει μία μεγάλη μπλε περιοχή γύρω από τον φαινολικό δακτύλιο B, που δείχνει ότι οι υδρόφοβες ομάδες προτιμώνται για την αύξηση της δραστηριότητας. Παρομοίως, οι υδρόφοβες ομάδες ευνοούνται γύρω από το φαινολικό δακτύλιο C, εκτός από τη θέση R³, όπου υπάρχουν οι κόκκινοι κύβοι. Στον ίδιο χάρτη, η μεγάλη κόκκινη περιοχή πάνω από τον δακτύλιο B υποδεικνύει ότι υδρόφιλες ομάδες σε αυτήν την περιοχή επηρεάζουν θετικά τη δραστηριότητα, αυξάνοντάς τη. Οι υποκαταστάσεις του φαινολικού δακτυλίου A των ενώσεων **12a-12d** είναι επίσης σε αυτήν την κόκκινη περιοχή, το οποίο δικαιολογεί γιατί τα μόρια είναι αρκετά δραστικά. Οι περισσότερες πληροφορίες παρέχονται για τον υποκαταστάτη της μετα-θέσης στον φαινολικό δακτύλιο C, όπου δείχνουν ότι σε αυτή την περιοχή μια υδρόφιλη, φορτισμένη (θετικά ή/και αρνητικά), καθώς και μία ομάδα απομάκρυνσης ηλεκτρονίων αυξάνει τη δραστηριότητα. Ως εκ τούτου, η ομάδα -NO₂ στη μετα-θέση του φαινολικού δακτυλίου C είναι η καλύτερη επιλογή, καθώς και μια ομάδα -CN. Επιπλέον, γύρω από την καρβοξυλομάδα της ένωσης **6c** στο Σχήμα 6.5β υπάρχουν και μπλε και κόκκινοι κύβοι. Αυτό σημαίνει ότι αρνητικά φορτισμένες ομάδες προτιμώνται στις περιοχές όπου βρίσκονται οι μπλε κύβοι και αποφεύγονται στις περιοχές που είναι κοντά στους κόκκινους. Επιπλέον, σε αυτή τη θέση, μία ομάδα δέκτης ηλεκτρονίων ευνοείται.



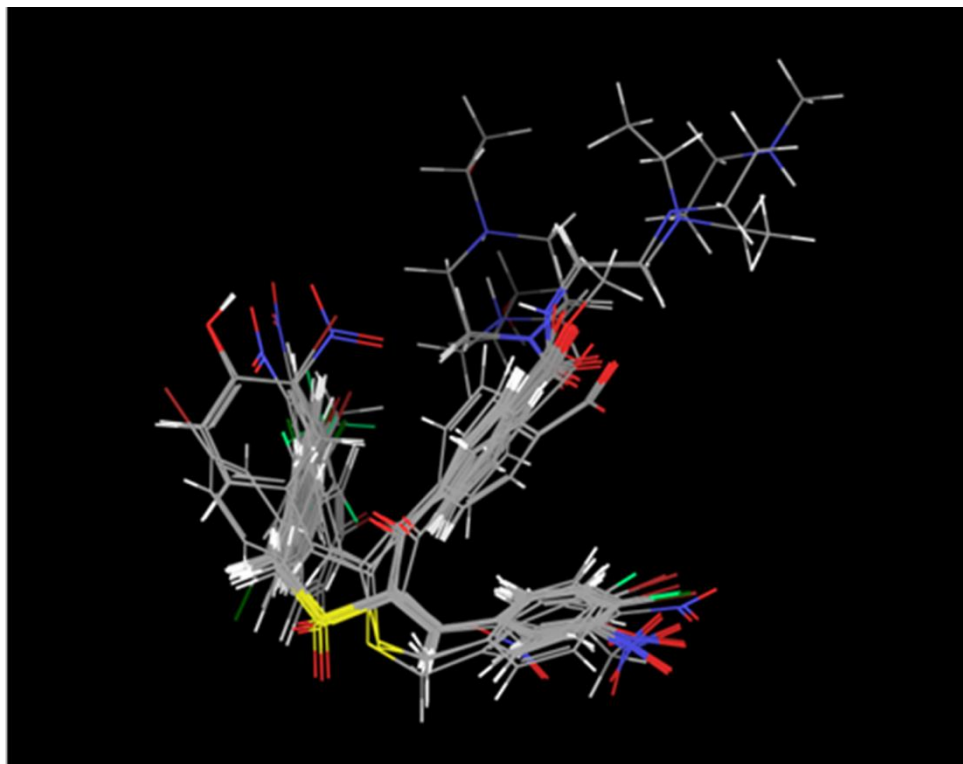
Σχήμα 6.5: Τα εικονικά διαγράμματα PHASE 3D-QSAR που εμφανίζονται για την ένωση **6c**: (α) υδρόφοβο, (β) αρνητικά ιοντικό, (γ) θετικά ιοντικό, και (δ) δέκτη ηλεκτρονίων μοντέλο, όπου οι μπλε κύβοι δείχνουν θετικό συντελεστή (αύξηση δραστηκότητας), ενώ οι κόκκινοι κύβοι δείχνουν αρνητικό συντελεστή (μείωση δραστηκότητας).

6.4 Δημιουργία των μοντέλων CoMFA και CoMSIA

Η αρχική μας ιδέα ήταν να κατασκευαστεί μοντέλο CoMFA/CoMSIA που να βασίζεται στην ευθυγράμμιση των ατόμων της ένωσης, χρησιμοποιώντας την χαμηλότερη ενεργειακά διαμόρφωση της κάθε ένωσης. Παρόλη την προσπάθεια δεν ελήφθησαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για αυτόν τον λόγο, προτάθηκε ένας συνδυασμός υπόθεσης κοινού φαρμακοφόρου και μελέτης CoMFA/CoMSIA, χρησιμοποιώντας την ευθυγράμμιση που βασίζεται στην CPH για μελέτη 3D-QSAR.

Για την παραγωγή του μοντέλου QSAR στο PHASE, ευθυγραμμίστηκαν όλες οι δραστικές, οι ανενεργές και οι μετρίως δραστικές ενώσεις με βάση όλα τα

χαρακτηριστικά του φαρμακοφόρου. Το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης του συνόλου δεδομένων απεικονίζεται στο Σχήμα 6.6.



Σχήμα 6.6: Η ευθυγράμμιση όλων των (*E*)-α-βενζυλο-θειο χαλκονών με βάση την κοινή υπόθεση φαρμακοφόρου που χρησιμοποιήθηκε για τους υπολογισμούς των πεδίων CoMFA και CoMSIA.

Όπως παρατηρείται από την υπόθεση του κοινού φαρμακοφόρου που χρησιμοποιήθηκε, απαιτείται μία υδρόφοβη ομάδα στη δεξιά πλευρά του σκελετού της χαλκόνης, και πιο συγκεκριμένα, στην παρα-θέση του φαινολικού δακτυλίου C (βλέπε δομή στον Πίνακα 6.1). Παρ'όλα αυτά, η ένωση **6ad** δεν φέρει καμία ομάδα σε αυτή τη θέση, ενώ αντίθετα οι ενώσεις **6ab**, **6ac** και **6ag** φέρουν υδρόφιλες ομάδες, όπως -OH και -NO₂. Αυτό το γεγονός δικαιολογεί και την ασθενή δραστηριότητα αυτών των μορίων. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι οι προαναφερθείσες ενώσεις έχουν μία υδρόφοβη ομάδα στην παρα-θέση του φαινολικού δακτυλίου B. Για τον λόγο αυτόν, οι ενώσεις αυτές έχουν αναποδογυριστεί οριζοντίως («flip»), ώστε να ευθυγραμμιστεί η υδρόφοβη υποκατάσταση στην παρα-θέση του δακτυλίου στο φαρμακοφόρο.

Η τελική αυτή ευθυγράμμιση της υπόθεσης κοινού φαρμακοφόρου με ID AHHRR.423 χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω ώστε να πραγματοποιηθούν οι

CoMFA και CoMSIA μελέτες. Τα στατιστικά αποτελέσματα του μοντέλου CoMFA δημιουργούνται χρησιμοποιώντας τον συνδυασμό των στερικών και ηλεκτροστατικών πεδίων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.4. Για την κατασκευή των μοντέλων CoMFA και CoMSIA προηγήθηκε ο ίδιος διαχωρισμός των ενώσεων. Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών έξι αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή διασταυρούμενης επικύρωσης Q^2 στα 0,633 και στο χαμηλότερο SEP στα 0,485. Ο συντελεστής συσχέτισης της μη-διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης R^2_{train} στα 0,984, το SEE στα 0,101, και η τιμή F στα 184,2 δείχνουν μία ικανοποιητική στατιστικά συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pIC_{50} για τη μη-διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου CoMFA.

Πίνακας 6.4: Στατιστικές παράμετροι των μοντέλων 3D-QSAR CoMFA και CoMSIA.

Παράμετροι	Μοντέλο CoMFA	Μοντέλο CoMSIA
ONC	6	5
Q^2	0,633	0,703
SEP	0,485	0,425
R^2_{train}	0,984	0,974
SEE	0,101	0,126
F	184,212	142,948
Στερικό / Ηλεκτροστατικό / Υδρόφοβο / Δέκτης δεσμού H	0,563 / 0,437	0,125 / 0,301 / 0,209 / 0,366
R^2_{test}	0,932	0,905

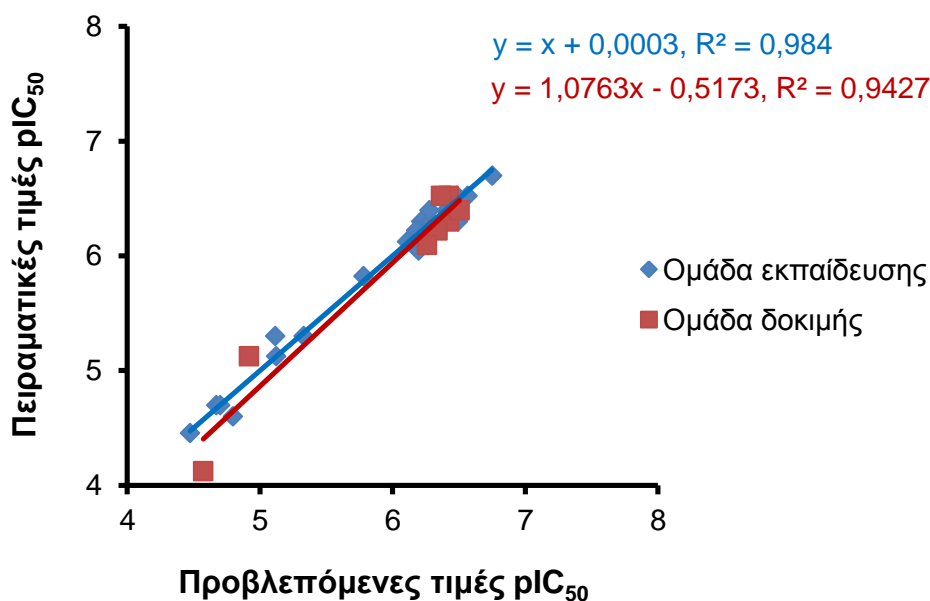
Όπου,

Στερικό / Ηλεκτροστατικό / Υδρόφοβο / Δέκτης δεσμού H: Η συνεισφορά του στερικού, ηλεκτροστατικού, υδρόφοβου και δέκτη δεσμών υδρογόνου πεδίου στην PLS ανάλυση

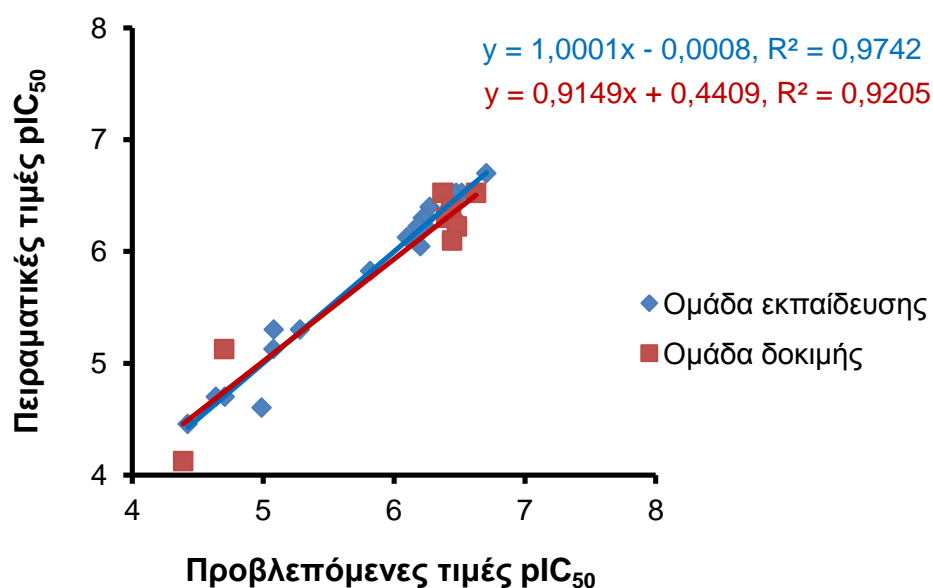
Στο Σχήμα 6.7 (πάνω), παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pIC_{50} . Η ανάλυση CoMFA δείχνει ότι η σχετική συνεισφορά των πεδίων είναι 56,3% και 43,7% για το στερικό και το ηλεκτροστατικό πεδίο, αντίστοιχα. Η εξωτερική επικύρωση για την ομάδα δοκιμής R^2_{test} υπολογίστηκε να είναι ίση με την τιμή 0,932 ακολουθώντας την εξαιρετική συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και πειραματικών τιμών

ρIC₅₀. Τέλος, το μοντέλο επικυρώθηκε και με την εφαρμογή του κόμβου ENALOS KNIME (Enalos Model Acceptability Criteria KNIME node), καθώς πέρασε επιτυχώς τις προτεινόμενες δοκιμές (κριτήρια) από τον Δρ. Τροψα για τη δυνατότητα πρόβλεψης ενός μοντέλου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5.

Μοντέλο CoMFA



Μοντέλο CoMSIA



Σχήμα 6.7: Τα διαγράμματα των πειραματικών έναντι των προβλεπόμενων τιμών ρIC₅₀ για το μοντέλο CoMFA (πάνω) και το μοντέλο CoMSIA (κάτω).

Πίνακας 6.5: Κριτήρια αποδοχής των τριών μοντέλων με χρήση του κόμβου Enalos ΚΝΙΜΕ.

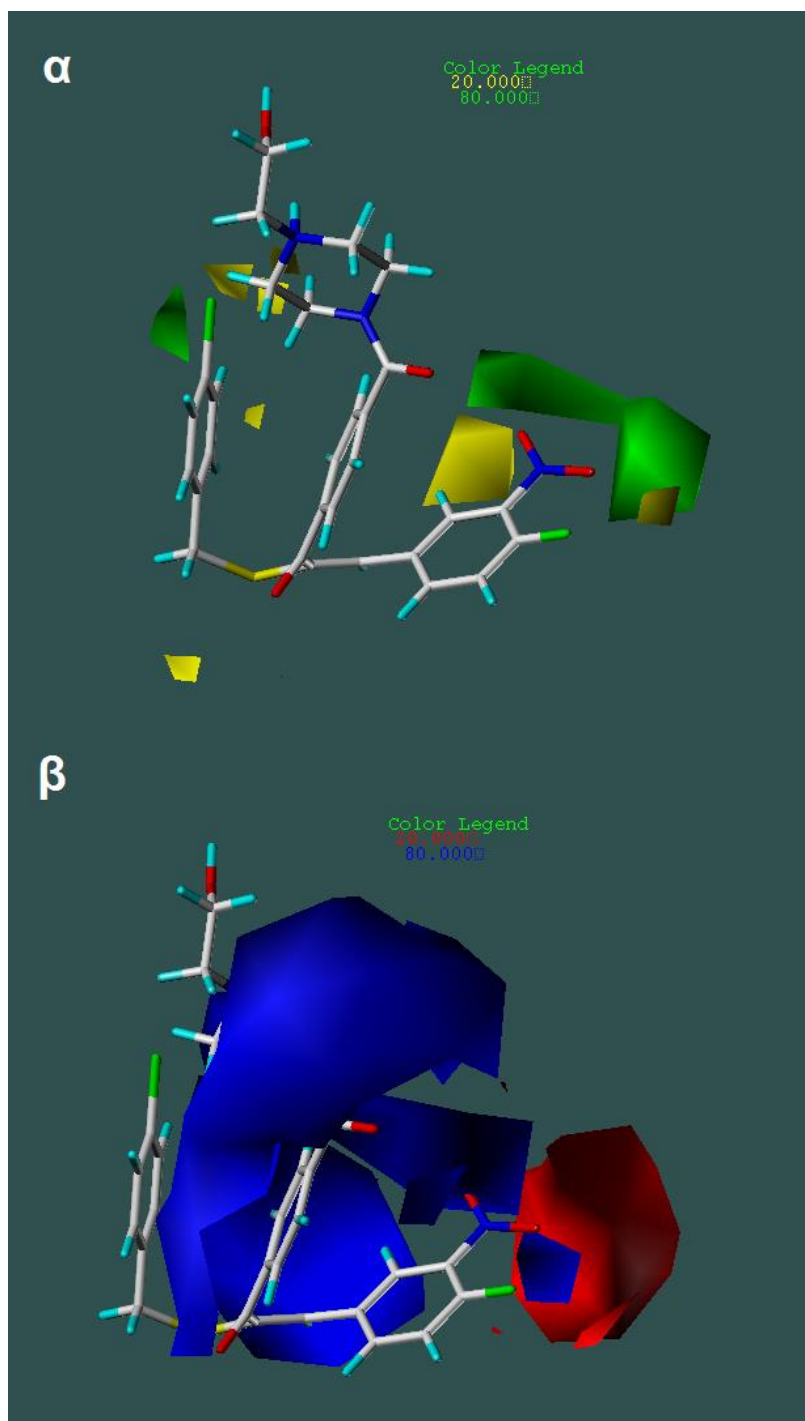
Κριτήριο	Εκτίμηση	Αποτέλεσμα
Μοντέλο 3D-QSAR με το PHASE		
$R^2 > 0,6$	ΘΕΤΙΚΗ	$R^2 = 0,956$
$R_{ext}^2 > 0,5$	ΘΕΤΙΚΗ	$R_{ext}^2 = 0,942$
$(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R_0^2) / R^2 = 0,025$
ή $(R^2 - R'_{0^2}) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R'_{0^2}) / R^2 = 0,009$
$ (R_0^2 - R'_{0^2}) < 0,3$	ΘΕΤΙΚΗ	$ (R_0^2 - R'_{0^2}) = 0,015$
$0,85 < k < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 0,990$
ή $0,85 < k' < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k' = 1,009$
ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ		
Μοντέλο 3D-QSAR CoMFA		
$R^2 > 0,6$	ΘΕΤΙΚΗ	$R^2 = 0,943$
$R_{ext}^2 > 0,5$	ΘΕΤΙΚΗ	$R_{ext}^2 = 0,932$
$(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R_0^2) / R^2 = 0,023$
ή $(R^2 - R'_{0^2}) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R'_{0^2}) / R^2 = 0,006$
$ (R_0^2 - R'_{0^2}) < 0,3$	ΘΕΤΙΚΗ	$ (R_0^2 - R'_{0^2}) = 0,016$
$0,85 < k < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 0,991$
ή $0,85 < k' < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k' = 1,008$
ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ		
Μοντέλο 3D-QSAR CoMSIA		
$R^2 > 0,6$	ΘΕΤΙΚΗ	$R^2 = 0,921$
$R_{ext}^2 > 0,5$	ΘΕΤΙΚΗ	$R_{ext}^2 = 0,905$
$(R^2 - R_0^2) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R_0^2) / R^2 = 0,0$
ή $(R^2 - R'_{0^2}) / R^2 < 0,1$	ΘΕΤΙΚΗ	$(R^2 - R'_{0^2}) / R^2 = 0,006$
$ (R_0^2 - R'_{0^2}) < 0,3$	ΘΕΤΙΚΗ	$ (R_0^2 - R'_{0^2}) = 0,006$
$0,85 < k < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k = 0,987$
ή $0,85 < k' < 1,15$	ΘΕΤΙΚΗ	$k' = 1,011$
ΜΟΝΤΕΛΟ ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ		

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης CoMFA παριστάνονται γραφικά με ισοϋψείς χάρτες. Σε αυτούς τους χάρτες, όπως έχει γίνει γνωστό, παρουσιάζονται οι περιοχές γύρω από την ένωση που είναι ευνοϊκές ή δυσμενείς για τη δραστικότητα της. Πιο συγκεκριμένα, οι ισοϋψείς χάρτες χρησιμοποιούνται για να προσδιοριστούν τα δομικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη βιολογική δραστικότητα σε μια σειρά ενώσεων και οι ληφθείσες πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω σχεδιασμό πιο ισχυρών χημικών δομών έναντι της κυτταρικής σειράς της μελέτης.

Τα πεδία CoMFA γύρω από την πιο δραστική ένωση, **12b**, εμφανίζονται στο Σχήμα 6.8. Οι στερικές αλληλεπιδράσεις αντιπροσωπεύονται από πράσινους και κίτρινους ισοϋψείς χάρτες (Σχήμα 6.8α), όπου ογκώδεις ομάδες κοντά στις πράσινες περιοχές αυξάνουν τη δραστικότητα και η παρουσία των ογκωδών ομάδων κοντά τις κίτρινες περιοχές μειώνει τη δραστικότητα. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με κόκκινους και μπλε ισοϋψείς χάρτες (Σχήμα 6.8β), όπου οι φορτισμένες αρνητικά ομάδες κοντά στις κόκκινες περιοχές αυξάνουν τη δραστικότητα, ενώ το αντίθετο αποτέλεσμα προκαλούν κοντά στις μπλε περιοχές. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι ισοϋψείς χάρτες για το στερικό και ηλεκτροστατικό πεδίο δεν είναι όμοιοι με εκείνους του μοντέλου CoMSIA, και ως εκ τούτου θα συζητηθούν ξεχωριστά.

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, υπάρχουν δύο μεγάλα χρωματιστά πολυέδρα αλλά και αρκετά μικρότερα που αντιπροσωπεύουν το στερικό πεδίο στον χάρτη του μοντέλου CoMFA (Σχήμα 6.8α). Το πράσινο περίγραμμα γύρω από τις ομάδες σε μετα- ή παρα-θέση του φαινολικού δακτυλίου C δείχνει ότι ογκώδεις ομάδες σε αυτές τις θέσεις μπορούν να αυξήσουν την κυτταροτοξικότητα. Για παράδειγμα, η υποκατάσταση με την ομάδα $-NO_2$ ή/και αλογόνα μπορεί να οδηγήσει σε υψηλές δραστικότητες. Η ομάδα στην παρα-θέση δεν πρέπει να είναι πιο ογκώδης από την ομάδα στη μετα-θέση του φαινολικού δακτυλίου C, λόγω της ύπαρξης ενός μικρού κίτρινου περιγράμματος πάνω από αυτή τη θέση και κοντά στην πράσινη περιοχή. Ως εκ τούτου, ο συνδυασμός μιας νιτρο-ομάδας και αλογόνου για τις δύο αυτές θέσεις, μετα- και παρα- αντίστοιχα, είναι ο πλέον κατάλληλος. Αντίθετα, το κίτρινο περίγραμμα κοντά στις ομάδες στην ορθο-θέση του φαινολικού

δακτυλίου C δικαιολογεί τις χαμηλές δραστηκότητες των ενώσεων **6ad**, **6af** και **6ag**, καθώς ογκώδεις ομάδες στην θέση αυτή επηρεάζουν δυσμενώς την κυτταροτοξικότητα.



Σχήμα 6.8: Οι ισοϋψείς χάρτες $StDev * Coeff$ των πεδίων CoMFA για την πιο δραστική ένωση **12b**: (α) για το στερικό πεδίο όπου με πράσινο: προτιμούνται οι ογκώδεις ομάδες, και κίτρινο: δεν προτιμούνται οι ογκώδεις ομάδες, (β) για το ηλεκτροστατικό πεδίο, όπου με κόκκινο: προτιμούνται οι ηλεκτραρνητικές ομάδες και μπλε: προτιμούνται οι ηλεκτροθετικές ομάδες.

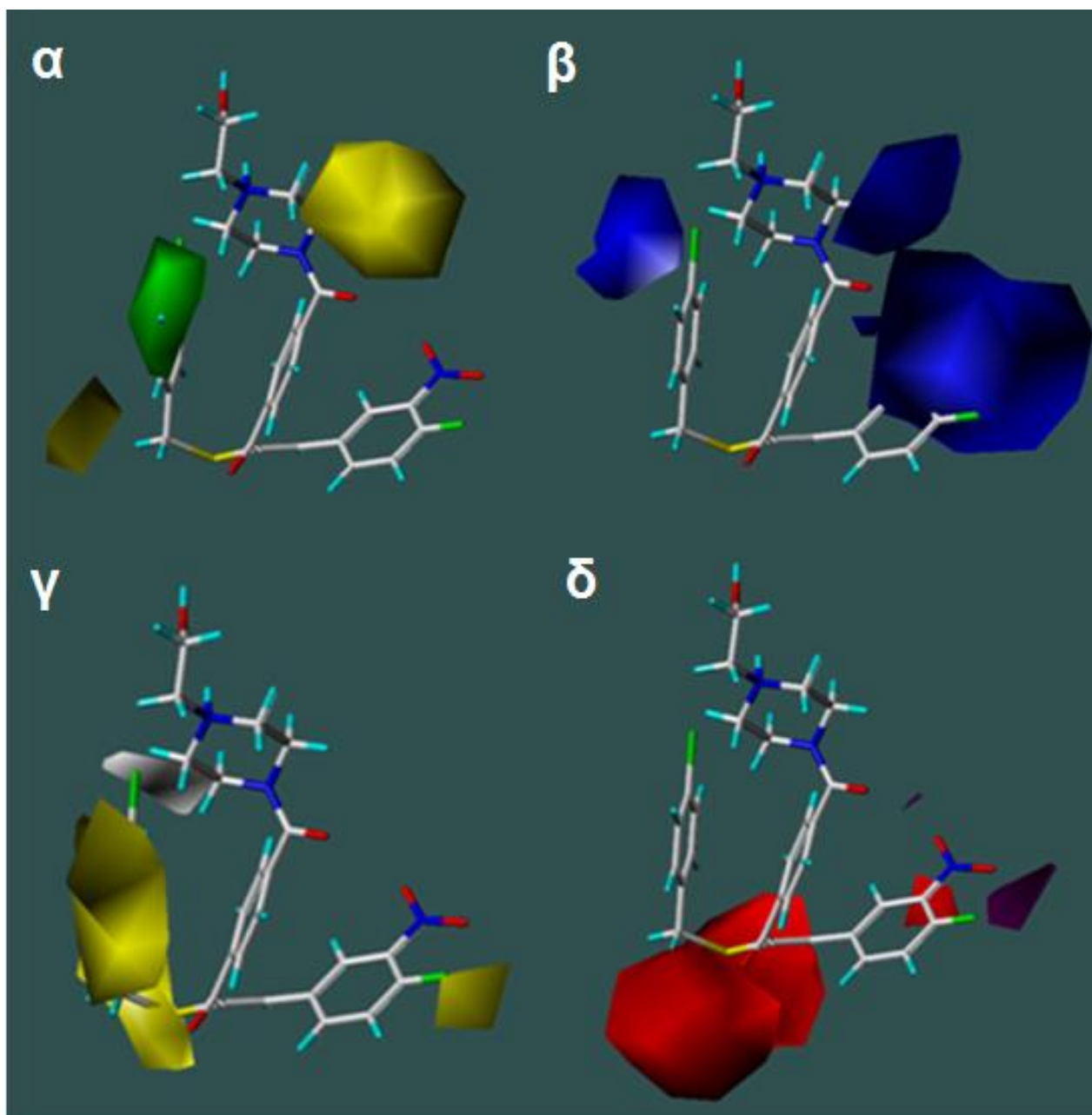
Στον ισοϋψή χάρτη για το ηλεκτροστατικό πεδίο στο Σχήμα 6.8β, υπάρχει μια σημαντική μπλε περιοχή γύρω από τον κεντρικό σκελετό υποδεικνύοντας ότι η εισαγωγή των ομάδων με θετικό φορτίο γύρω από τον σκελετό αυξάνει την κυτταροτοξικότητα. Παρόλα αυτά, το μεγάλο κόκκινο περίγραμμα κοντά στη μετα-θέση του φαινολικού δακτυλίου C υποδεικνύει ότι ενώσεις με ηλεκτραρνητικές ομάδες στη θέση αυτή, όπως είναι η νίτρο-ομάδα, κατέχουν υψηλότερη δραστικότητα.

Ομοίως, τα στατιστικά αποτελέσματα του παραχθέντος μοντέλου CoMSIA παρουσιάζονται επίσης στον Πίνακα 6.4. Ο συνδυασμός από τα ακόλουθα πεδία ομοιότητας: στερικό, ηλεκτροστατικό, υδρόφοβο, και δέκτης δεσμού υδρογόνου δίνει τη μεγαλύτερη τιμή του συντελεστή συσχέτισης της διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης Q^2 , το μικρότερο σφάλμα, και τη μεγαλύτερη τιμή F . Ο βέλτιστος αριθμός συνιστωσών πέντε αντιστοιχεί στην υψηλότερη τιμή Q^2 στα 0,703 και στο χαμηλότερο SEP στα 0,425. Ο συντελεστής συσχέτισης της μη-διασταυρούμενης μεθόδου επικύρωσης R^2_{train} στα 0,974, το SEE στα 0,120 και η τιμή F στα 142,9 δείχνουν μία ικανοποιητική στατιστικά συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pIC_{50} για τη μη-διασταυρούμενη επικύρωση του μοντέλου CoMSIA. Στο Σχήμα 6.7 (κάτω) παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pIC_{50} , τόσο για την ομάδα εκπαίδευσης όσο και την ομάδα δοκιμής. Η ανάλυση CoMSIA δείχνει ότι η σχετική συνεισφορά των πεδίων είναι 12,5%, 30,1%, 20,9% και 36,6% για το στερικό, το ηλεκτροστατικό, το υδρόφοβο, και το δέκτη δεσμού υδρογόνου πεδίο, αντίστοιχα. Η εξωτερική επικύρωση για την ομάδα δοκιμής έχει τιμή $R^2_{\text{test}} = 0,905$, επικυρώνοντας την ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των προβλεπόμενων και των πειραματικών τιμών pIC_{50} . Το μοντέλο CoMSIA πέρασε επίσης τις προτεινόμενες δοκιμές του Δρ. Tropsha για δυνατότητα πρόβλεψης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5.

Οι ισοϋψείς χάρτες για τα πεδία του μοντέλου CoMSIA γύρω από την πιο δραστική ένωση, **12b**, εμφανίζονται στο Σχήμα 6.9. Οι στερικές αλληλεπιδράσεις αντιπροσωπεύονται από πράσινα και κίτρινα περιγράμματα (Σχήμα 6.9α), όπου ογκώδεις ομάδες κοντά στα πράσινες περιοχές αυξάνουν τη δραστικότητα, αλλά προκαλούν το αντίθετο αποτέλεσμα κοντά στις κίτρινες

περιοχές. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με κόκκινα και μπλε περιγράμματα (Σχήμα 6.9β), όπου ηλεκτροθετικές ομάδες κοντά στις μπλε περιοχές και ηλεκτροαρνητικές ομάδες κοντά στις κόκκινες περιοχές αυξάνουν τη δραστικότητα. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις εμφανίζονται με κίτρινα και λευκά περιγράμματα (Σχήμα 6.9γ), όπου υδρόφοβες ομάδες κοντά στις κίτρινες περιοχές αυξάνουν τη δραστικότητα ενώ τη μειώνουν κοντά στις λευκές περιοχές. Οι αλληλεπιδράσεις δέκτη δεσμού υδρογόνου εμφανίζονται με περιγράμματα πορφυρού και κόκκινου χρώματος (Σχήμα 6.9δ), όπου ομάδες με άτομα που δρουν ως δέκτες δεσμού υδρογόνου κοντά στις πορφυρές περιοχές αυξάνουν τη δραστικότητα, αλλά να τη μειώνουν κοντά στις κόκκινες περιοχές.

Συγκεκριμένα, στον ισοϋψή χάρτη για το στερικό πεδίο (Σχήμα 6.9α), παρατηρούνται τρία πολυέδρα, ένα πράσινου και δύο κίτρινου χρώματος. Το πράσινο περίγραμμα στον φαινολικό δακτύλιο B υποδεικνύει ότι ογκώδεις ομάδες στις 3- και 4-θέσεις του δακτυλίου αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα. Για αυτές τις θέσεις θα μπορούσε να είναι κατάλληλα τα ογκωδέστερα αλογόνα. Σε αντίθεση, με τη 2-θέση του ίδιου δακτυλίου όπου μια ογκώδης ομάδα κρίνεται δυσμενής για τη δραστικότητα. Ομοίως, ογκώδεις ομάδες δεν είναι ευνοϊκές στην παρα-θέση του φαινολικού δακτυλίου A και προσανατολισμένες προς τον φαινολικό δακτύλιο C, σε αντίθεση με τις ομάδες που είναι προσανατολισμένες προς τον φαινολικό δακτύλιο A, όπως οι ενώσεις **12a-12d**. Στον ισοϋψή χάρτη για το ηλεκτροστατικό πεδίο (Σχήμα 6.9β), τρία μεγάλα μπλε πολυέδρα δείχνουν ότι θετικά φορτισμένες ομάδες είναι πιο ευνοϊκές από ό,τι οι αρνητικά φορτισμένες κοντά σε αυτές τις περιοχές. Στον ισοϋψή χάρτη για το υδρόφοβο πεδίο (Σχήμα 6.9γ), ένα μεγάλο κίτρινο περίγραμμα γύρω από το φαινολικό δακτύλιο B δείχνει ότι υδρόφοβες ομάδες είναι ευνοϊκές για τη δραστικότητα, εκτός από μια μικρή περιοχή κοντά στην παρα-θέση του ίδιου δακτυλίου, όπου και ευνοούνται οι υδρόφιλες ομάδες. Υδρόφοβες ομάδες ευνοούνται επίσης και στην παρα-θέση του φαινολικού δακτυλίου C.



Σχήμα 6.9: Οι ισούψείς χάρτες $StDev \cdot Coeff$ των πεδίων CoMSIA για την πιο δραστική ένωση **12b**: (α) για το στερικό πεδίο όπου με πράσινο: προτιμούνται οι ογκώδεις ομάδες (βαθμός συνεισφοράς 80%), και κίτρινο: δεν προτιμούνται οι ογκώδεις ομάδες (βαθμός συνεισφοράς 20%); (β) για το ηλεκτροστατικό πεδίο, όπου με κόκκινο: προτιμούνται οι ηλεκτραρνητικές ομάδες (βαθμός συνεισφοράς 80%) και μπλε: προτιμούνται οι ηλεκτροθετικές ομάδες (βαθμός συνεισφοράς 20%); (γ) για το υδρόφοβο πεδίο όπου με κίτρινο: προτιμούνται οι υδρόφοβες ομάδες (βαθμός συνεισφοράς 80%) και λευκό: δεν προτιμούνται οι υδρόφοβες ομάδες (βαθμός συνεισφοράς 20%), και (δ) για το πεδίο δέκτη δεσμού υδρογόνου όπου με πορφυρό: προτιμούνται τα άτομα δέκτες δεσμού υδρογόνου (βαθμός συνεισφοράς 80%) και κόκκινο δεν προτιμούνται τα άτομα δέκτες δεσμού υδρογόνου (βαθμός συνεισφοράς 20%).

Τέλος, στον ισοϋπή χάρτη του πεδίου για δέκτη δεσμού υδρογόνου (Σχήμα 6.9δ), τα μόνα άτομα που προτιμώνται για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου ως δότες ηλεκτρονίων είναι τα δύο άτομα του οξυγόνου της νιτρο-ομάδας στη θέση R³ του φαινολικού δακτυλίου C (πορφυρά πολυέδρα). Αντίθετα, ένα μικρό κόκκινο περίγραμμα πίσω από αυτόν τον δακτύλιο και ένα μεγάλο κόκκινο γύρω από το κεντρικό υδρόφοβο μέρος του σκελετού της ένωσης δείχνουν ότι περισσότερα άτομα υδρογόνου κοντά σε αυτές τις περιοχές μπορεί να βελτιώσουν την κυτταροτοξικότητα με τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, οι μελέτες CoMFA/CoMSIA χρησιμοποιώντας την απλή ευθυγράμμιση βασισμένη στα άτομα των ενώσεων του συνόλου δεδομένων δεν ήταν επιτυχείς, ενώ η παραγωγή μιας υπόθεσης κοινού φαρμακοφόρου και η περαιτέρω χρήση του στις μελέτες QSAR κατέληξαν σε ένα εξαιρετικό μοντέλο. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα του συνδυασμού των δύο αυτών μεθόδων μπορούν να αξιοποιηθούν για περαιτέρω ανάλυση με σκοπό τον εντοπισμό νέων ισχυρών αναστολέων ενάντια της κυτταρικής σειράς K562.

Η κινάση BCR-ABL, μία μονίμως δραστική κινάση τυροσίνης, εμφανίζεται να είναι υπεύθυνη για την κακοήγη μετάλλαξη στις περισσότερες περιπτώσεις CML, και ως εκ τούτου αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό στόχο. Παρά το γεγονός ότι το imatinib, ένας γνωστός αναστολέας της κινάσης BCR-ABL, αποτελεί τη θεραπεία πρώτης γραμμής για την πλειοψηφία των περιπτώσεων CML, λόγω της υψηλής απόδοσής του και δευτερεύουσων παρενεργειών, πολλοί ασθενείς γίνονται ανθεκτικοί στο imatinib. Η υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων στο τμήμα της κινάσης BCR-ABL είναι υπεύθυνη για αυτό το γεγονός. Ως εκ τούτου, ο προσδιορισμός νέων αναστολέων της κινάσης BCR-ABL που δεν στοχεύουν την περιοχή πρόσδεσης του ATP αποτελεί επιτακτική ανάγκη.

Για τον σκοπό αυτόν, διεξήχθησαν μελέτες μοριακής πρόσδεσης στη δομή της κινάσης BCR-ABL. Χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο «SiteMap» της εταιρίας Schrödinger,³⁰¹ και την κρυσταλλική δομή της κινάσης με κωδικό PDB ID = 4K5V από την Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων, εντοπίστηκαν οι πέντε πιο

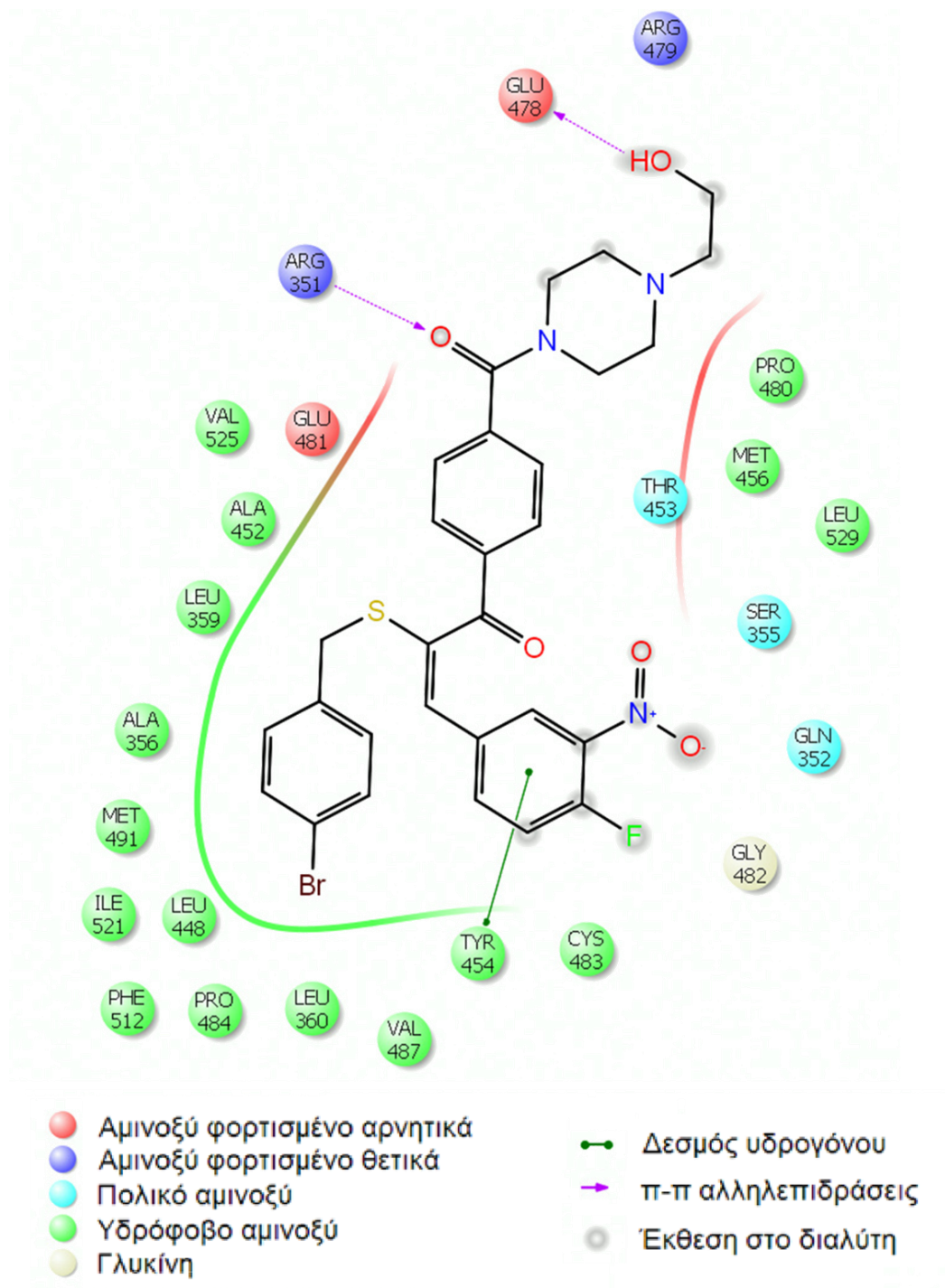
πιθανές θέσεις πρόσδεσης του υποδοχέα. Μεταξύ αυτών των θέσεων ήταν και η περιοχή πρόσδεσης του ATP, όπου είναι προσδεμένο και το imatinib.

Στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκαν επιπρόσθετα πειράματα μοριακής πρόσδεσης της πιο δραστηκής ένωσης της σειράς των χαλκονών, **12b**, στις πέντε πιθανές θέσεις πρόσδεσης. Για τα πειράματα αυτά, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο μοριακής πρόσδεσης του GLIDE της Schrödinger,³⁰² και το αποτέλεσμα των πειραμάτων έδειξε ότι η ένωση προσδέεται με πολύ υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης σε μια εναλλακτική θέση πρόσδεσης της κινάσης και όχι στη θέση πρόσδεσης του ATP. Η νέα θέση πρόσδεσης φαίνεται να αποτελείται τόσο από υδρόφοβα όσο και πολικά αμινοξέα χωρίς ειδικές απαιτήσεις (Σχήμα 6.10). Αυτό επιτρέπει την αναζήτηση μιας πληθώρας πιθανών υποψηφίων, καθώς συνηθίζεται τα φάρμακα να είναι δομικά αμφίφιλα μόρια, και να ασκούν μία ευνοϊκή πρόσδεση. Η διαπίστωση αυτή, ως εκ τούτου, ανοίγει ένα νέο δρόμο για νέα ειδικά υποψήφια μόρια ως αναστολείς της κινάσης BCR-ABL. Στο Σχήμα 6.11, αναπαρίσταται τριδιάστατα ο τρόπος πρόσδεσης της πιο δραστηκής ένωσης της σειράς, **12b**, στην εναλλακτική θέση πρόσδεσης της κινάσης BCR-ABL.

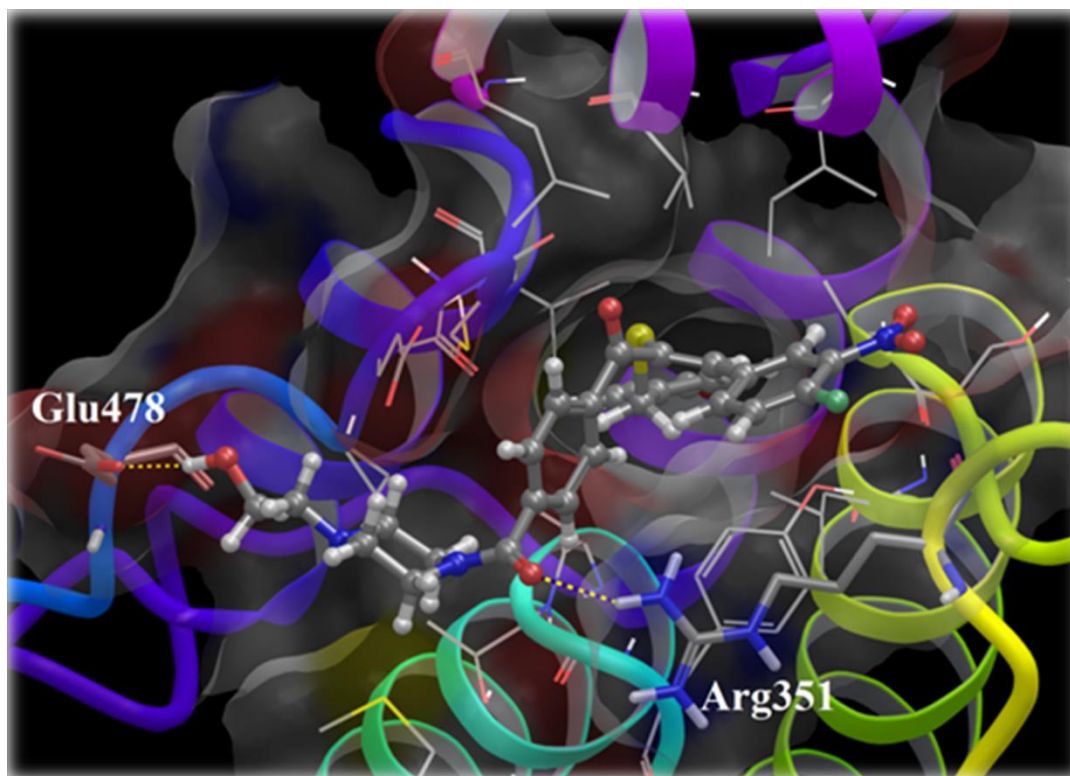
6.5 Συμπεράσματα

Οι 33 (*E*)-α-βενζυλο-θειο χαλκόνες που συντέθηκαν από τον Reddy και τους συνεργάτες του, αξιολογήθηκαν ως νέοι μη ATP-ανταγωνιστικοί αναστολείς της κινάσης BCR-ABL.¹¹³ Σε αυτή τη μελέτη, παρήχθησαν μοντέλα πρόβλεψης 3D-QSAR με βάση την κυτταροτοξικότητα των 33 (*E*)-α-βενζυλο-θειο χαλκονών κατά της κυτταρικής σειράς K562, ενώσεις αναστολείς της κινάσης BCR-ABL.³⁰³ Έγινε χρήση του PHASE για την ανάπτυξη υποθέσεων κοινού φαρμακοφόρου (CPHs) και μοντέλων πρόβλεψης που στη συνέχεια επικυρώθηκαν. Η ευθυγράμμιση των ενώσεων που λήφθηκε χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη μοντέλων CoMFA και CoMSIA. Τέλος, οι τριδιάστατοι ισοϋψείς χάρτες των τριών μοντέλων, με συμβατά δομικά αποτελέσματα, θα μπορούσαν να συνδυαστούν, με τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχουν δομική εικόνα των ενώσεων και πώς αυτά τα μόρια προωθούν την τοξικότητά τους. Ακόμη, θα μπορούσε να εκτιμηθεί η ικανότητα να περιορίζουν την ανάπτυξη λευχαιμικών κυττάρων ενώσεων από οποιαδήποτε

εμπορική/«in house» βάση δεδομένων μέσω μιας διαδικασίας εικονικής διαλογής.



Σχήμα 6.10: Το διάγραμμα αλληλεπιδράσεων για τη δραστική ένωση 12b στο εναλλακτικό σημείο πρόσδεσης της κινάσης BCR-ABL.



Σχήμα 6.11: Τα αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα πρόσδεσης της δραστικής ένωσης **12b** στο εναλλακτικό σημείο πρόσδεσης της κινάσης BCR-ABL με βαθμολογία πρόσδεσης $-9,172 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Η πιο δραστική ένωση **12b** παρουσιάζεται με σφαίρες και ράβδους, ενώ οι δεσμοί υδρογόνου με τα αμινοξέα Arg351 και Glu478 εμφανίζονται με διακεκομμένες κίτρινες γραμμές.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η έρευνα μέσω του Ορθολογικού Σχεδιασμού αποτελεί μία συνεχή κυκλική πορεία: ξεκινάει από τη σύνθεση και τον βιολογικό έλεγχο ενώσεων και καταλήγει πάλι σε σύνθεση και βιολογικό έλεγχο νέων ενώσεων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Ο Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων, και γενικότερα, οι υπολογιστικές *in silico* μέθοδοι διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμακευτικών ενώσεων με λιγότερο χρόνο και κόστος.
2. Παρόλο που τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης πολλές φορές δεν μπορούν να εξηγήσουν τέλεια τη βιολογική δραστικότητα ενώσεων, οι ποσοτικές σχέσης δομής-δράσης (QSAR) εξυπηρετούν τον στόχο αυτόν.
3. Οι τριδιάστατοι ισοϋψείς χάρτες επικυρωμένων μοντέλων 3D-QSAR παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων που είναι υπεύθυνα για την αυξημένη βιολογική δράση.
4. Ο συνδυασμός υπολογιστικών μεθόδων, όπως της μοριακής πρόσδεσης, του 3D-QSAR CoMFA/CoMSIA, της αναζήτησης ομοιότητας και της εικονικής διαλογής βάσεων δεδομένων κατέληξε σε σημαντικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα:
 - ✓ Ξεκινώντας από ένα σύνολο δεδομένων 41 παραγώγων ινδολίου με γνωστές δραστικότητες κατά της RNA πολυμεράσης του ιού της ηπατίτιδας C, και μέσω της μοριακής πρόσδεσης, του 3D-QSAR CoMSIA, της αναζήτησης ομοιότητας και της εικονικής διαλογής της βάσης δεδομένων της ChEMBL, κατορθώθηκε να εντοπιστούν νέα παράγωγα ινδολίου με υψηλές προβλεπόμενες τιμές δραστικότητας.
 - ✓ Ξεκινώντας από ένα σύνολο δεδομένων 53 παραγώγων ανθρανιλικού οξέος με γνωστές δραστικότητες κατά της RNA πολυμεράσης του ιού της ηπατίτιδας C, και μέσω της μοριακής πρόσδεσης, του 3D-QSAR CoMFA, της αναζήτησης ομοιότητας και της εικονικής διαλογής της βάσης δεδομένων της PubChem, κατορθώθηκε να εντοπιστούν νέα δυνάμει δραστικά παράγωγα ανθρανιλικού οξέος και να δοθεί προτεραιότητα για πειραματική αξιολόγηση σε έναν κατάλογο ενώσεων.

5. Αυτές οι ροές εργασίας μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη διαλογή άλλων βάσεων δεδομένων ή εικονικών συνδυασμών, ώστε να εξαχθούν και άλλα παράγωγα με επιθυμητή δραστικότητα.
6. Η χρήση της εικονικής διαλογής αποδείχτηκε αποδοτική, και η ίδια η μέθοδος αξιόπιστη, καθώς πολλές από τις νέες ενώσεις που εντοπίστηκαν έχουν ήδη δοκιμαστεί και έχει βρεθεί ότι έχουν ισχυρή αντι-ιική δράση κατά του HCV.
7. Η μοντελοποίηση φαρμακοφόρου και οι μεθοδολογίες CoMFA/CoMSIA κατάφεραν να συνδυαστούν με επιτυχία και να δώσουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Οι ισοϋψείς χάρτες που παρήχθησαν από την μελέτη 3D-QSAR για τις 33 χαλκόνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των δομικών χαρακτηριστικών που αφορούν την κυτταροτοξικότητα σε αυτή τη σειρά των ενώσεων και οι πληροφορίες που λαμβάνονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω σχεδιασμό βιοδραστικών μορίων.
8. Αναμένεται οι χαλκόνες να δεσμευτούν σε περιοχές διαφορετικές από τη θέση πρόσδεσης του ATP στην κινάση τυροσίνης BCR-ABL, και ως εκ τούτου τα κύτταρα της CML σε επεξεργασία με τους παράγοντες αυτούς μπορεί να μην αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στο φάρμακο λόγω των μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης. Πειράματα μοριακής πρόσδεσης στις πιθανές θέσεις πρόσδεσης της BCR-ABL έδειξαν για την πιο δραστική ένωση από το σύνολο των χαλκονών ότι προσδένεται με πολύ υψηλότερη βαθμολογία πρόσδεσης σε μια εναλλακτική θέση πρόσδεσης της κινάσης, και όχι στη θέση πρόσδεσης του ATP.
9. Φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αναστολής της κινάσης τυροσίνης BCR-ABL από χημικές ουσίες, όπως το imatinib, και της επαγωγής της διαφοροποίησης των αιμοποιητικών κυττάρων και ενεργοποίησης της γ -σφαιρίνης στην κυτταρική σειρά K562. Ως εκ τούτου, η εύρεση ισχυρών αναστολέων της κινάσης τυροσίνης που δεν δρουν μέσω της θέσης πρόσδεσης του ATP θα μπορούσε να έχει δύο ευεργετικά αποτελέσματα: την παροχή θεραπείας σε ασθενείς με CML μέσω της διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων, αλλά και την υποβοήθηση των ασθενών με β -θαλασσαιμία μέσω της επαγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης που επιτυγχάνεται μέσω της διαφοροποίησης.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός όρος
2D	Διδιάστατος
3D	Τριδιάστατος
Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity	Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός, Απέκκριση, Τοξικότητα
add hydrogens	προσθήκη ατόμων υδρογόνου
Align database	Ευθυγράμμιση βάσης δεδομένων
alignment	ευθυγράμμιση
assign bond orders	προσδιορισμός της σειράς δεσμών
atom-based model	μοντέλο βασισμένο στο άτομο
Bioinformatics	Βιοπληροφορική
box	κύβος
chain terminators	τερματιστές αλυσίδας
chemical space	χημικός χώρος
Cheminformatics	Χημειοπληροφορική
Chronic Myelogenous Leukemia	Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία
combined intermolecular interactions	συνδυασμένες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις
Common Pharmacophore Hypothesis	Υπόθεση Κοινού Φαρμακοφόρου
Comparative Molecular Field Analysis	Συγκριτική Ανάλυση Μοριακών Πεδίων
Comparative Molecular Similarity Indices Analysis	Συγκριτική Ανάλυση Δεικτών Μοριακής Ομοιότητας
Conjugated Gradient	Βαθμιδωτή Σύζευξη
conjugated systems	συζευγμένα συστήματα

contour maps	ισοϋψείς χάρτες
core	πυρήνας
cross-validation	διασταυρούμενη επικύρωση
Cross-validated correlation coefficient	συντελεστής συσχέτισης της διασταυρούμενης επικύρωσης
delete waters	διαγραφή μορίων νερού
descriptor coefficient	συντελεστής περιγραφικής μεταβλητής
descriptors	περιγραφικές μεταβλητές
dissociation constant	σταθερά διάστασης
electrostatic interactions	ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις
energy minimization	ελαχιστοποίηση ενέργειας
Extra Precision	Εξαιρετική Ακρίβεια
false positives	ψευδώς θετικά
Food and Drug Administration	(Οργανισμός) Διαχείρισης Τροφίμων και Φαρμάκων
filter the structures	φιλτράρισμα δομών
find overlaps	ανίχνευση επικαλύψεων
fingers	δάχτυλα (τμήμα)
flip	αναστροφή
formal charge	τυπικό φορτίο
free valences	ελεύθερα σθένη
generate alternative chiralities	δημιουργία εναλλακτικών χειρόμορφων κέντρων
generate heat states	δημιουργία ετεροκαταστάσεων
generate ionization states	δημιουργία καταστάσεων ιοντισμού
generate low-energy ring conformations	δημιουργία χαμηλής ενέργειας διαμορφώσεων δακτυλίων
generate tautomers	δημιουργία ταυτομερών

global energy minimum	ολικό ενεργειακό ελάχιστο
grid/lattice	πλέγμα
group	ομάδα
head fragments	θραύσματα βάσης
Hepatitis C Virus	Ιός της Ηπατίτιδας C
high quality 3D structures	υψηλής ποιότητας τριδιάστατες μοριακές δομές
High Throughput Screening	Διαλογή Υψηλής Απόδοσης
High Throughput Virtual Screening	Εικονική Διαλογή Υψηλής Απόδοσης
hit	οδηγός δομή
hydrophobic interactions	υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις
<i>in silico</i>	υπολογιστικά
inductive interactions	επαγωγικές αλληλεπιδράσεις
internal predictive ability	εσωτερική ικανότητα πρόβλεψης
intercept	τομή (σε άξονα γραφικής παράστασης)
ligand	Προσδέτης (πρόσδεμα)
Ligand-based Virtual Screening	Εικονική Διαλογή με βάση τον προσδέτη
ligand pose	πόζα πρόσδεσης (στιγμιαία απεικόνιση διαμόρφωσης προσδέτη στο κέντρο δράσης)
ligand preparation (ligprep)	προετοιμασία προσδέτη
Low Mode	(αναζήτηση) χαμηλής συχνότητας
Molecular Docking	Μοριακή Πρόσδεση
Monte Carlo Multiple Minimum	(αναζήτηση) πολλαπλών ελαχίστων Monte Carlo
minimization algorithms	αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης
neutralize charged groups	εξουδετέρωση φορτισμένων ομάδων
no validation	μη διασταυρούμενη επικύρωση

optimum number of components	βέλτιστος αριθμός συνιστωσών
open access	ελεύθερη προσβασιμότητα
optimization of hydrogen bonding network	βελτιστοποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου
optimize the geometry	βελτιστοποίηση μοριακής δομής
optimizing the structure	διαδικασία βελτιστοποίησης δομής
palm	παλάμη (τμήμα)
Partial Least Squares	(Ανάλυση) Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων
Potential Energy Surface	Επιφάνεια Δυναμικής Ενέργειας
pharmacophore	φαρμακοφόρο
pharmacophore-based model	μοντέλο βασισμένο στο φαρμακοφόρο
point	σημείο
probe	αισθητήρας αλληλεπίδρασης
probe atoms	άτομα αισθητήρες
protein-based alignment	ευθυγράμμιση βασισμένη στην πρωτεΐνη
Protein Preparation Wizard	Εφαρμογή Προετοιμασίας Πρωτεϊνών
pyramidalization distance	απόσταση πυραμιδοποίησης
Rational Drug Design	Ορθολογικός Σχεδιασμός Φαρμάκων
region core	περιοχή του πυρήνα
remove problematic structures	απομάκρυνση προβληματικών μοριακών δομών
remove unwanted molecules	απομάκρυνση μη επιθυμητών μοριακών δομών
replicon	μονάδα αντιγραφής, ρεπλικόνιο, αντιγραφόνιο
RNA-dependent RNA polymerase	RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση
rotamer groups	περιστρεφόμενες ομάδες

Quantitative Structure-Activity Relationships	Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης
scoring function	συνάρτηση βαθμολόγησης
similarity indices	δείκτες ομοιότητας
site	τοποθεσία
site points	σημεία πρόσδεσης
solvent accessible-surface	επιφάνεια μορίου προσιτή στον διαλύτη
stability	σταθερότητα
standard deviation	τυπική απόκλιση
Standard Error of Estimate	Τυπικό Σφάλμα Εκτίμησης
Standard Error of Prediction	Τυπικό Σφάλμα Πρόβλεψης
Standard Precision	Τυπική Ακρίβεια
Steepest Descent	Βαθύτατη Κατάδυση
structure-based alignment	ευθυγράμμιση βασισμένη στη δομή
Structure-based Virtual Screening	Εικονική Διαλογή με βάση τον υποδοχέα
template molecule	μόριο-πρότυπο
Test set	Ομάδα ελέγχου ή δοκιμής
thumb	αντίχειρας (τμήμα)
Training set	Ομάδα εκμάθησης ή εκπαίδευσης
treat disulfides	έλεγχος δισουλφιδικών δεσμών
treat metals	έλεγχος μετάλλων
variable metric	μεταβλητή μετρική
vector	διάνυσμα
Virtual Screening	Εικονική Διαλογή (Σάρωση)
X-ray resolution	Διακριτική ικανότητα ακτίνων Χ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους

2D	Two Dimensional
3D	Three Dimensional
A	Hydrogen bond Acceptor
ADMET	Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMBER	Assisted Model Building with Energy Refinement
Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartic acid
ATP	Adenosine Triphosphate
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region - Abelson
CHARMM	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
CII	Combined Intermolecular Interactions
CML	Chronic Myelogenous Leukemia
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
CoMSIA	Comparative Molecular Similarity Indices Analysis
ConfGen	Conformer Generation
CPH	Common Pharmacophore Hypothesis
Con1	Consensus genome 1
Cys	Cysteine
D	Hydrogen bond Donor
DNA	Deoxy-ribonucleic acid
EC ₅₀	half maximal Effective Concentration
EI	Electrostatic Interactions

Emodel	Model Energy score
EP	European Patent
EPO	Erythropoietin
F	Fisher test
FDA	Food and Drug Administration
FMNR	Full Matrix Newton Raphson
GLIDE	Grid-based Ligand Docking with Energetics
Gln	Glutamine
Glu	Glutamic acid
Gly	Glycine
GOLD	Genetic Optimization for Ligand Docking
GS	GlideScore
Gt1b	Genotype 1b
GUI	Graphical User Interface
H	Hydrophobic group
Hb	Haemoglobin
HbF	Fetal Haemoglobin
HbS	Sickle Haemoglobin
HCV	Hepatitis C Virus
Het	Heteroatom
HI	Hydrophobic Interactions
HIV	Human Immunodeficiency Virus
His	Histidine
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HTS	High Throughput Screening
HTVS	High-Throughput Virtual Screening
HU	Hydroxyurea

IC ₅₀	half maximal Inhibitory Concentration
IFN-α	Interferon-alpha
II	Inductive Interactions
JAK/STAT	Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription
K562	human erythroleukemic cell line
K _d	dissociation constant
kDa	KiloDalton
K _i	binding constant
KNIME	Konstanz Information Miner
LBFGS	Low-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno
LBVS	Ligand-Based Virtual Screening
Leu	Leucine
LHS	Left-Hand Side
LigPrep	Ligand Preparation
LOO	Leave One Out
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MAK	Μεταμόσχευση Αιμοποιητικών Κυττάρων
μM	Micromolar
MD	Molecular Dynamics
MM	Molecular Mechanics
MMFF	Merck Molecular Force Field
N	Negatively charged group
nM	Nanomolar
NIH	National Institute of Health
NI	Nucleoside Inhibitor
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

NNI	Non-Nucleoside Inhibitor
NS	Non-Structural
NTP	Nucleotide Triphosphate
ONC	Optimum Number of Components
OPLS	Optimized Potentials for Liquid Simulations
OSVM	Oren-Spedicato Variable Metric
P	Positively charged group
PDB	Protein Data Bank
PEG	Pegylated
PEOE	Partial Equalization of Orbital Electronegativity
PEPE	Partial Equalization of π -Electronegativity
PES	Potential Energy Surface
pEC	negative logarithm of Effective Concentration
pIC	negative logarithm of Inhibitory Concentration
PHASE	Pharmacophore Alignment and Scoring Engine
PI3K	Phosphatidylinositide 3-Kinase
PLS	Partial Least Squares, Projection to Latent Structures
PRCG	Polak-Ribiere Conjugated Gradient
RHS	Right-Hand Side
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
Q^2 \hat{r}_{cv}^2	Cross-validated correlation coefficient
R^2_{train} \hat{r}_{ncv}^2 \hat{r}^2	Non-validated correlation coefficient
R^2_{test} \hat{r}^2	correlation coefficient for test set
r_m^2	metric (external validation for test set)
R	Aromatic Ring
Ras/Raf/MEK/ERK	Rat Sarcoma/Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/ Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-

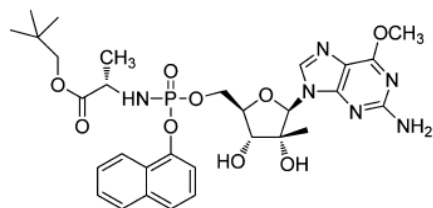
	Regulated kinase
RBV	Ribavirin
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RMSD	Root Mean Square Deviation
RNA	Ribonucleic Acid
Ro3	Rule of Three
Ro5	Rule of Five
SBVS	Structure-Based Virtual Screening
SCD	Sickle Cell Disease
SCF	Self-Consistent Field
SD	Standard Deviation
SEE	Standard Error of Estimate
SEP	Standard Error of Prediction
Ser	Serine
SMARTS	Smiles Arbitrary Target Specification
SMILE	Simplified Molecular-Input Line-Entry
SP	Standard Precision
TNCG	Truncated Newton Conjugate Gradient
Tyr	Tyrosine
US	United States
vdW	van der Waals
VS	Virtual Screening
WO	World Organization
XP	Extra Precision

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

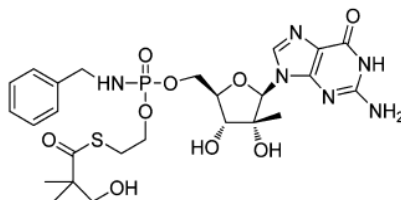
Πίνακας Π1: Δομές νουκλεοζιτικών αναστολέων.

Τροποποιημένοι Νουκλεοζίτες	
NM283	
PSI-6130	
RG7128	
PSI-6206	
Τροποποιημένα Νουκλεοτίδια	
GS-7977	
PSI-7851	
GS-938	

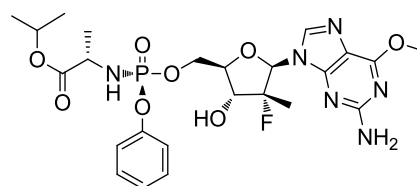
INX-08189



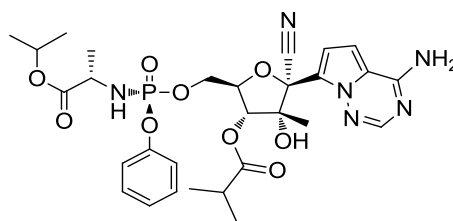
IDX184



PSI-353661



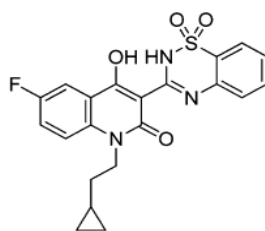
GS-6620



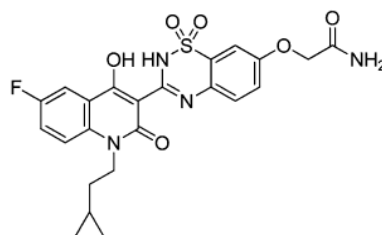
Πίνακας Π2: Δομές μη νουκλεοζιτικών αναστολέων.

Μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς

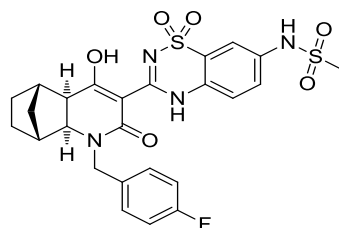
SB-711845



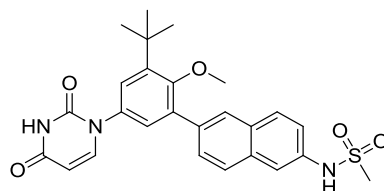
SB-750330



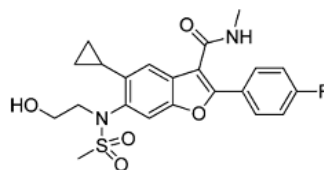
RG7790 (ANA598)



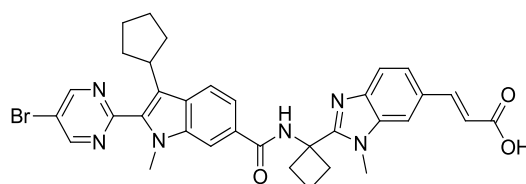
ABT-333



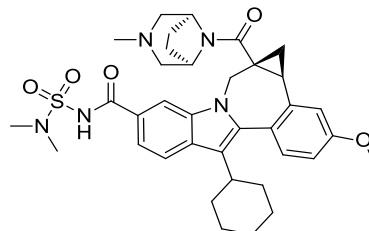
HCV-796



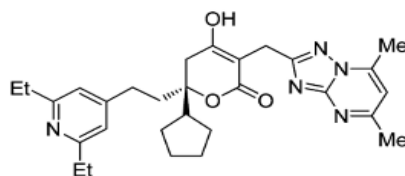
BI 207127



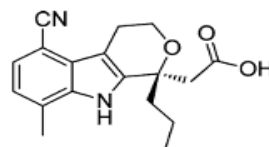
BMS-791325



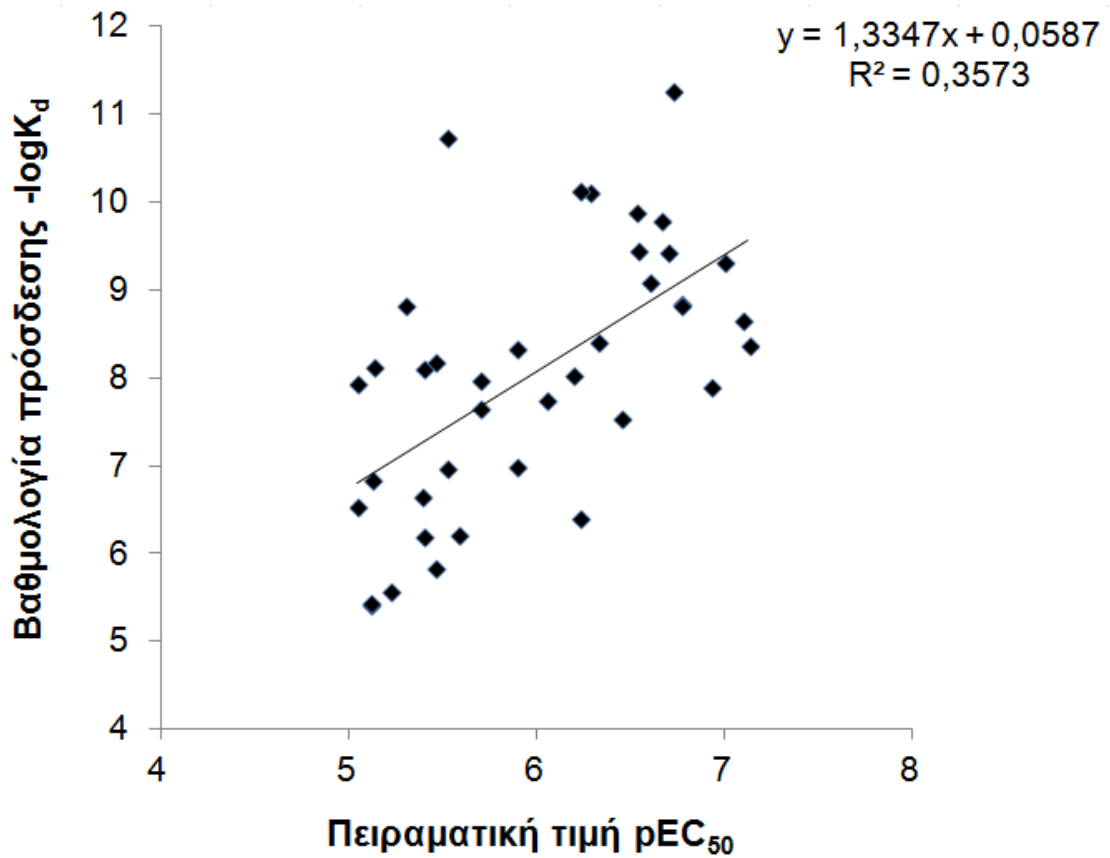
PF-00868554



HCV-371



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



Σχήμα Π1: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των βαθμολογιών μοριακής πρόσδεσης με το Surflex-Dock ($-\log K_d$) και των πειραματικών τιμών pEC_{50} για τα 41 παράγωγα ινδολίου.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ



Σχήμα Π1: Διάγραμμα συσχέτισης μεταξύ των βαθμολογιών μοριακής πρόσδεσης με το GLIDE (XP GScore) και των πειραματικών τιμών pIC_{50} για τα 53 παράγωγα του ανθρανιλικού οξέος.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Πίνακας Π1: Ενδομοριακές αποστάσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών του φαρμακοφόρου.

Σημείο1	Σημείο2	Απόσταση (Å)
A1	H3	7,290
A1	H6	2,103
A1	R8	3,702
A1	R9	5,008
H3	H6	7,090
H3	R8	5,776
H3	R9	2,769
H6	R8	3,985
H6	R9	4,411
R8	R9	4,219

Πίνακας Π2: Γωνίες μεταξύ των χαρακτηριστικών του φαρμακοφόρου.

Σημείο1	Σημείο2	Σημείο3	Γωνία
H3	A1	H6	76,2
H3	A1	R8	51,7
H3	A1	R9	14,9
H6	A1	R8	81,7
H6	A1	R9	61,5
R8	A1	R9	55,5
A1	H3	H6	16,7
A1	H3	R8	30,2
A1	H3	R9	27,8
H6	H3	R8	34,2

H6	H3	R9	11,5
R8	H3	R9	43,4
A1	H6	H3	87,0
A1	H6	R8	66,8
A1	H6	R9	93,7
H3	H6	R8	54,5
H3	H6	R9	7,2
R8	H6	R9	60,1
A1	R8	H3	98,2
A1	R8	H6	31,5
A1	R8	R9	78,1
H3	R8	H6	91,3
H3	R8	R9	26,8
H6	R8	R9	65,0
A1	R9	H3	137,3
A1	R9	H6	24,8
A1	R9	R8	46,3
H3	R9	H6	161,3
H3	R9	R8	109,8
H6	R9	R8	54,9

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

(Το ερευνητικό έργο κατά τη χρονική περίοδο της διδακτορικής διατριβής)

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

✓ σε διεθνή περιοδικά

1. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, E. Kaffe, T. Mavromoustakos, G. Kokotos, V. Aidinis, A. Afantitis, Computer Aided Drug Design Approaches for Identification of Novel Autotaxin (ATX) Inhibitors, *Curr. Med. Chem.*, 2016, *accepted after revision*
2. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, A. Afantitis, T. Mavromoustakos, G. Kollias, Searching for novel Janus kinase-2 inhibitors using a combination of pharmacophore modeling, 3D QSAR studies and virtual screening, *Mini Rev. Med Chem.*, 2016, *accepted*
3. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, S. Voskou, M.S. Phylactides, T. Mavromoustakos, M. Kleanthous, A. Afantitis, Development of a predictive pharmacophore model and a 3D-QSAR study for an *in silico* screening of new potent BCR-ABL kinase inhibitors, *Mini Rev. Med Chem.*, 2016, *accepted*
4. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, Searching for Anthranilic Acid-Based Thumb Pocket 2 HCV NS5B Polymerase Inhibitors through a Combination of Molecular Docking, 3D-QSAR and Virtual Screening, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2016, vol. 31, no. 1, pp. 38–52.
5. T. Kellici, D. Ntountaniotis, **E. Vrontaki**, G. Liapakis, P. Moutevelis-Minakakis, G. Kokotos, S. Hadjikakou, A.G. Tzakos, A. Afantitis, G. Melagraki, S. Bryant, T. Langer, V. Di Marzo, T. Mavromoustakos, Rational Drug Design Paradigms: The Odyssey for designing better Drugs, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 18, no. 3, 2015, pp. 238–256.
6. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, Exploiting ChEMBL database to identify indole analogs as HCV replication inhibitors, *Methods*, vol. 71, Jan. 2015, pp. 4–13.
7. **E. Vrontaki**, G. Leonis, A. Avramopoulos, M.G. Papadopoulos, M. Simčič, S.G. Grdadolnik, A. Afantitis, G. Melagraki, S.K. Hadjikakou, T.

Mavromoustakos, Stability and binding effects of silver(I) complexes at lipoxygenase-1, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 30, no. 4, 2015, pp. 539–549.

8. **E. Vrontaki**, G. Leonis, M.G. Papadopoulos, M. Simčič, S. Golic Grdadolnik, A. Afantitis, G. Melagraki, S.K. Hadjikakou, T. Mavromoustakos, Comparative binding effects of aspirin and anti-inflammatory Cu-complex in the active site of LOX-1, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, no. 12, Dec. 2012, pp. 3293–3301.

✓ **σε ελληνικά περιοδικά**

9. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, A. Afantitis, T. Mavromoustakos, Nanomaterials and Quantitative Structure-Activity Relationships, *Pharmakeftiki*, 2016, *in press*
10. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, A. Afantitis, A. Tsantili – Kakoulidou, T. Mavromoustakos, 3D Quantitative Structure-Activity Relationships (3D-QSAR): A short overview, *Pharmakeftiki*, vol. 27, no. IV, Oct.–Dec. 2015, 126–137.
11. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, Exploiting ChEMBL Database to Identify Indole Analogues as HCV Replication Inhibitors, *Rev. Clin. Pharmacol. Pharmacokinet. Int. Ed.*, vol. 28, no. 1, 2014, p. 31.
12. **E. Βροντάκη**, Θ. Μαυρομούστακος, Γ. Μελαγράκη, Α. Αφαντίτης, Προσεγγίσεις για την Επιτυχέστερη Καταπολέμηση της Ηπατίτιδας C, *Ιατρικά Νέα*, 2014, Τεύχος 56, σελ. 16–22.

✓ **σε διεθνή επιστημονικά βιβλία**

12. **E. Vrontaki**, T. Mavromoustakos, G. Melagraki, A. Afantitis, Chapter 14: Quantitative Nanostructure-Activity Relationship models for the Risk Assessment of NanoMaterials, in *Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design, Predictive Toxicology, and Risk Assessment*, K. Roy, Ed, 2015, IGI Global, pp. 535–559.

Συμμετοχή σε Σεμινάρια – Συνέδρια

1. NMR Applications in Life Sciences, Exploring Peptides & Proteins, Patras, Greece, June 18-20, 2015
2. IXth Joint Meeting in Medicinal Chemistry, Athens, Greece, June 7-10, 2015
3. 12^o Συνέδριο Χημείας Ελλάδας – Κύπρου, Χημεία, πυλώνας ανάπτυξης στη μετά κρίση εποχή, Θεσσαλονίκη, 8-10 Μαΐου 2015
4. Σεμινάριο «Ο ρόλος των επιστημόνων στην εποχή της κρίσης», στο πλαίσιο του Εξ Αποστάσεως Μεταπτυχιακού στις Επιστήμες Αγωγής του Πανεπιστημίου Λευκωσίας σε συνεργασία με την Έδρα UNESCO του Πανεπιστημίου Λευκωσίας, Αθήνα, 28 Φεβρουαρίου 2015
5. Symposium on Mass Spectrometry and Health, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece, November 18-19, 2014
6. 1st International Congress: From Drug Discovery to Drug Delivery, Athens, Greece, November 13-15, 2014
7. 4th THALAMOSS Scientific Meeting “Markers and Targets for Theranostics of Thalassemia” and 4th THALAMOSS GA Meeting, Athens Greece, November 5-6, 2014
8. The Onassis Foundation Science Lectures Series 2014 in Chemistry and Biology: «Molecular Conformational Fluctuations: Origins of Biological Specificity and Applications in Pharmacochimistry», FORTH (ITE), Heraklion, Crete, August 25-29, 2014
9. Ενημερωτική Ημερίδα για τον Ζύθο, Γενικό Χημείο του Κράτους, Αθήνα, 20 Ιουνίου 2014
10. 32nd Cyprus-Camerino-Noordwijkerhout Symposium in Trends in Drug Research, Limassol, Cyprus, May 18-22, 2014
11. 15^o Συνέδριο Ιατρικής Χημείας, Πάτρα, 9-11 Απριλίου 2014
12. Β' Κύκλος ομιλιών των Μορφωτικών Εκδηλώσεων του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών με τίτλο: «Η έξαρση των παρασιτικών νόσων στην Ελλάδα & Διεθνώς: Προκλήσεις για την έρευνα και τη δημόσια υγεία», Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 18 Φεβρουαρίου - 4 Μαρτίου 2014
13. Διημερίδα «Νέες τεχνικές σχεδιασμού φαρμάκων – Μελέτη της δράσης τους σε μοριακό επίπεδο» από το Τμήμα Οργανικής και Φαρμακευτικής

- Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 7-8 Οκτωβρίου 2013
14. Επιστημονικό forum «Τεχνολογικές εξελίξεις στη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου: Υπερθερμία – Νανοτεχνολογία», Αρεταίειο Νοσοκομείο, Αθήνα 4 Οκτωβρίου 2013
 15. Meeting of SYSPATHO program, ENS, Lyon, France, September 19-20, 2013
 16. Διημερίδα «Χημεία και Ερευνητικές Προκλήσεις» από το Τμήμα Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, στα πλαίσια του έργου FP7-REGPOT “ARCADE”, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 23-24 Απριλίου 2013
 17. Scientific / Kick-off Meeting of THALAMOSS (THALAssaemia Modular Stratification System for personalized therapy of beta-thalassaemia) Ferrara, Italy, January 14-15, 2013
 18. International Conference on Chemistry for Health, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9 -14 Σεπτεμβρίου 2012
 19. 32nd European Peptide Symposium στο Μέγαρο Μουσικής, Αθήνα (Megaron Athens International Conference Centre), 2-7 Σεπτεμβρίου 2012

Διαλέξεις – Ομιλίες σε Συνέδρια

1. “Searching for HCV inhibitors combining Molecular Docking, 3D-QSAR CoMFA and Virtual Screening procedures”, στο 12ο Συνέδριο Χημείας Ελλάδας – Κύπρου, Χημεία, πυλώνας ανάπτυξης στη μετά κρίση εποχή, Θεσσαλονίκη, 8-10 Μαΐου, 2015
2. “3D Quantitative structure-activity relationships employed for the optimization of CK-666” in 3rd Greece-Turkey bilateral collaboration Project Meeting “Discovery of novel Arp2/3 inhibitors: Synthesis, *in silico* design and *in vitro* analysis”, Biomedical Research Foundation, Academy of Athens, Greece, March 17-18, 2015
3. “An integrated approach using a combination of molecular docking and 3D-QSAR CoMSIA to understand the molecular basis of action of the indole

- analogues as inhibitors of HCV replication” in Meeting of SYSPATHO program, ENS, Lyon, France, September 19-20, 2013
4. “NovaMechanics Ltd Cheminformatics & bioinformatics solutions” in Scientific / Kick-off Meeting of THALAMOSS (THALAssaemia Modular Stratification System for personalized therapy of beta-thalassaemia) Ferrara, Italy, January 14-15, 2013

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια (Γραπτές)

1. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, Development of predictive pharmacophore model and 3D-QSAR CoMSIA study for the *in silico* screening of new potent β -thalassaemia agents, IXth Joint Meeting in Medicinal Chemistry, Athens, Greece, June 7-10, 2015
2. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, Searching for anthranilic acid-based thumb pocket-2 HCV NS5B polymerase inhibitors through a combination of Molecular Docking, 3D-QSAR and Virtual Screening, 1st International Congress: From Drug Discovery to Drug Delivery, Athens, Greece, November 13-15, 2014
3. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, An *in silico* effort to discover new HCV Replication Inhibitors, 32nd Cyprus-Camerino-Noordwijkerhout Symposium in Trends in Drug Research, Limassol, Cyprus, May 18-22, 2014
4. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, A. Afantitis, Developing *in silico* tools towards the personalized therapy of beta-thalassaemia, 32nd Cyprus-Camerino-Noordwijkerhout Symposium in Trends in Drug Research, Limassol, Cyprus, May 18-22, 2014
5. **E. Vrontaki**, G. Leonis, A. Avramopoulos, M. G. Papadopoulos, M. Simčič, S. Golic-Grdadolnik, A. Afantitis, G. Melagraki, S.K. Hadjikakou, T. Mavromoustakos, Stability and Binding Effects of Ag Metal Complexes at LOX-1, 32nd Cyprus-Camerino-Noordwijkerhout Symposium in Trends in Drug Research, Limassol, Cyprus, May 18-22, 2014
6. **E. Vrontaki**, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, Exploiting ChEMBL database to identify indole analogues as HCV replication inhibitors, 15th Conference of Medicinal Chemistry, Patras, Greece, April 9-11, 2014

Συμμετοχή σε Διεθνή Προγράμματα – Υποτροφίες

1. Ερευνητικό πρόγραμμα «THALAMOSS» (THALAssaemia Modular Stratification System for personalized therapy of beta-thalassemia) από το 7ο πρόγραμμα – πλαίσιο έρευνας της Ευρωπαϊκής Ένωσης FP7-HEALTH-2012-INNOVATION-1 (HEALTH.2012.1.2-1) (2012–2015)
2. Ερευνητικό πρόγραμμα «Συνεργασία» με τίτλο: «Αναστολείς Φωσφολιπασών A2: Ανάπτυξη αλυσίδας φαρμακευτικής ανακάλυψης για την αντιμετώπιση φλεγμονωδών νευρολογικών διαταραχών» με Κωδικό Αριθμό 70/3/12128, το οποίο διαχειρίζεται ο Ειδικός Λογαριασμός Κονδυλίων Έρευνας του Πανεπιστημίου Αθηνών, και συγχρηματοδοτείται από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης, και εντάσσεται στο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» (ΕΠΑΝ II), του Περιφερειακού Επιχειρησιακού Προγράμματος (ΠΕΠ) Αττικής, Α.Π. 3 «Ενίσχυση της Ανταγωνιστικότητας, της Καινοτομίας και της Ψηφιακής Σύγκλισης», του Άξονα Προτεραιότητας (Α.Π.) 1 «Δημιουργία και αξιοποίηση της καινοτομίας υποστηριζόμενης από έρευνα και τεχνολογική ανάπτυξη» (Υποτροφία 7 μηνών)
3. Ερευνητικό πρόγραμμα «IKYDA» (IKY-DAAD), όπου το IKY και η Γερμανική Υπηρεσία Ακαδημαϊκών Ανταλλαγών (DAAD) στο πλαίσιο διμερούς συμφωνίας, υλοποιούν από το έτος 2000 με στόχο την περαιτέρω προώθηση της επιστημονικής συνεργασίας των Ιδρυμάτων Τριτοβάθμιας Εκπαίδευσης καθώς και των ερευνητικών ιδρυμάτων της Ελλάδας και της Γερμανίας (2015–2016)

Επικουρικό Έργο

- Συνεπικουρία στη διεκπεραίωση διπλωματικής εργασίας (Δ. Πετροπούλου, προπτυχιακός) και ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης (Ι. Πετροπούλου, υποψήφια MSc)
- Επικουρία μελών ΔΕΠ στην άσκηση φοιτητών (εργαστήριο) για τα μαθήματα Οργανικής Χημείας II και Οργανικής Χημείας III
- Επιτήρηση εξετάσεων προπτυχιακών φοιτητών τόσο του τμήματος Χημείας όσο και του τμήματος Φυσικής

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. M. Houghton, The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus, *J. Hepatol.*, vol. 51, no. 5, Nov. 2009, pp. 939-948.
2. J. Cohen, The scientific challenge of hepatitis C, *Science*, vol. 285, no. 5424, Jul. 1999, pp. 26-30.
3. M.J. Alter, D. Kruszon-Moran, O.V. Nainan, G.M. McQuillan, F. Gao, L.A. Moyer, R.A. Kaslow, and H.S. Margolis, The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994, *N. Eng. J. Med.*, vol. 341, no. 8, Aug. 1999, pp. 556-562.
4. P.L. Almasio, D. Ingrassia, B. Vergara, and S. Filosto, New therapeutic prospects in HCV treatment, *Expert Rev. Anti-infect. Ther.*, vol. 6, no. 6, Dec. 2008, pp. 775-779.
5. C.W. Shepard, L. Finelli, and M.J. Alter, Global epidemiology of hepatitis C virus infection, *Lancet Infect. Dis.*, vol. 5, no. 9, Sep. 2005, pp. 558-567.
6. A.U. Neumann, N.P. Lam, H. Dahari, D.R. Gretch, T.E. Wiley, T.J. Layden, and A.S. Perelson, Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy, *Science*, vol. 282, no. 5386, Oct. 1998, pp. 103-107.
7. H.R. Rosen and D.R. Gretch, Hepatitis C virus: Current understanding and prospects for future therapies, *Mol. Med. Today*, vol. 5, no. 9, Sep. 1999, pp. 393-399.
8. A.M. Di Bisceglie, J. McHutchison, and C.M. Rice, New therapeutic strategies for hepatitis C, *Hepatology*, vol. 35, no. 1, Jan. 2002, pp. 224-231.
9. P. Simmonds, J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I.T. Shin, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, and A. Widell, Consensus proposals for a unified system of nomenclature of

- hepatitis C virus genotypes, *Hepatology*, vol. 42, no. 4, Oct. 2005, pp. 962-973.
10. A. Katsoulidou, V. Sypsa, N.C. Tassopoulos, J. Boletis, A. Karafoulidou, I. Ketikoglou, D. Tsantoulas, I. Vafiadi, G. Hatzis, A. Skoutelis, E. Akriadiadis, T. Vasiliadis, G. Kitis, G. Magiorkinis, and A. Hatzakis, Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in Greece: temporal trends in HCV genotype-specific incidence and molecular characterization of genotype 4 isolates, *J. Viral Hepat.*, vol. 13, no. 1, Jan. 2006, pp. 19-27.
 11. A.K. Ghosh, R. Steele, K. Meyer, R. Ray, and R.B. Ray, Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth, *J. Gen. Virol.*, vol. 80, no. Part 5, May 1999, pp. 1179-1183.
 12. T. Shimakami, M. Hijikata, H. Luo, Y.Y. Ma, S. Kaneko, K. Shimotohno, and S. Murakami, Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon, *J. Virol.*, vol. 78, no. 6, Mar. 2004, pp. 2738-2748.
 13. S.E. Behrens, L. Tomei, and R. De Francesco, Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus, *EMBO J.*, vol. 15, no. 1, Jan. 1996, pp. 12-22.
 14. F. Legrand-Abravanel, F. Nicot, and J. Izopet, New NS5B polymerase inhibitors for hepatitis C, *Expert. Opin. Investig. Drugs*, vol. 19, no. 8, Aug. 2010, pp. 963-975.
 15. P.L. Beaulieu, Non-nucleoside inhibitors of the HCV NS5B polymerase: Progress in the discovery and development of novel agents for the treatment of HCV infection, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, vol. 8, no. 8, Aug. 2007, pp. 614-634.
 16. C.M. Joyce, and T.A. Steitz, Polymerase Structures and function: Variations on a theme?, *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 22, Nov. 1995, pp. 6321-6329.
 17. J.P. Powers, D.E. Piper, Y. Li, V. Mayorga, J. Anzola, J.M. Chen, J.C. Jaen, G. Lee, J. Liu, M.G. Peterson, G.R. Tonn, Q. Ye, N.P.C. Walker,

and Z. Wang, SAR and mode of action of novel non-nucleoside inhibitors of hepatitis C NS5b RNA polymerase, *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 3, Feb. 2006, pp. 1034-1046.

18. S. Harper, B. Pacini, S. Avolio, M. Di Filippo, G. Migliaccio, R. Laufer, R. De Francesco, M. Rowley, and F. Narjes, Development and preliminary optimization of indole-N-acetamide inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase, *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 5, Mar. 2005, pp. 1314-1317.
19. M.J. Sofia, W. Chang, P. A. Furman, R.T. Mosley, and B.S. Ross, Nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA-polymerase, *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 6, Mar. 2012, pp. 2481-2531.
20. A.D. Kwong, L. McNair, I. Jacobson, and S. George, Recent progress in the development of selected hepatitis C virus NS3/4a protease and NS5B polymerase inhibitors, *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 8, no. 5, Oct. 2008, pp. 522-531.
21. N.A. Brown, Progress towards improving antiviral therapy for hepatitis C with hepatitis C virus polymerase inhibitors. Part I: Nucleoside analogues. *Expert. Opin. Investig. Drugs*, vol. 18, no. 6, Jun. 2009, pp. 709-725.
22. H.M. Powdrill, J.A. Bernatchez, and M. Götte, Inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA Polymerase NS5B, *Viruses*, vol. 2, no. 10, Oct 2010, pp. 2169-2195.
23. S.W. Ludmerer, D.J. Graham, E. Boots, E.M. Murray, A. Simcoe, E.J. Markel, J.A. Grobler, O.A. Flores, D.B. Olsen, D.J. Hazuda, and R.L. LaFemina, Replication fitness and NS5B drug sensitivity of diverse hepatitis C virus isolates characterized by using a transient replication assay, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 5, May 2005, pp. 2059-2069.
24. M.F. McCown, S. Rajyaguru, S. Le Pogam, S. Ali, W.-R. Jiang, H. Kang, J. Symons, N. Cammack, and I. Najera, The hepatitis C virus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to

- nonnucleoside polymerase or protease inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 5, May. 2008, pp. 1604-1612.
25. S.S. Carroll, and D.B. Olsen, Nucleoside analog inhibitors of hepatitis C virus replication, *Infect. Disord. Drug Targets*, vol. 6, no. 1, Mar. 2006, pp. 17-29.
 26. S. Le Pogam, W.R. Jiang, V. Leveque, S. Rajyaguru, H. Ma, H. Kang, S. Jiang, M. Singer, S. Ali, K. Klumpp, D. Smith, J. Symons, N. Cammack, and I. Najera, *In vitro* selected Con1 subgenomic replicons resistant to 2'-C-methyl-cytidine or to R1479 show lack of cross resistance, *Virology*, vol. 351, no. 2, Aug. 2006, pp. 349-359.
 27. G. Migliaccio, J.E. Tomassini, S.S. Carroll, L. Tomei, S. Altamura, B. Bhat, L. Bartholomew, M.R. Bosserman, A. Ceccacci, L.F. Colwell, R. Cortese, R. De Francesco, A.B. Eldrup, K.L. Getty, X.S. Hou, R.L. LaFemina, S.W. Ludmerer, M. MacCoss, D.R. McMasters, M.W. Stahlhut, D.B. Olsen, D.J. Hazuda, and O.A. Flores, Characterization of resistance to non-obligate chain-terminating ribonucleoside analogs that inhibit hepatitis C virus replication *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 49, Dec. 2003, pp. 49164-49170.
 28. J.M. Pawlotsky, I. Najera, and I. Jacobson, Resistance to mericitabine, a nucleoside analogue inhibitor of HCV RNA-dependent RNA polymerase, *Antivir. Ther.*, vol. 17, no. 3, Mar. 2012, pp. 411-423.
 29. C. Pierra, A. Amador, S. Benzaria, E. Cretton-Scott, M. D'Amours, J. Mao, S. Mathieu, A. Moussa, E.G. Bridges, D.N. Strandring, J.P. Sommadossi, R. Storer, and G. Gosselin, Synthesis and pharmacokinetics of valopicitabine (NM283), an efficient prodrug of the potent anti-HCV agent 2'-C-methylcytidine, *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 22, Oct. 2006, pp. 6614-6620.
 30. S.S. Carroll, J.E. Tomassini, M. Bosserman, K. Getty, M.W. Stahlhut, A.B. Eldrup, B. Bhat, D. Hall, A.L. Simcoe, R. LaFemina, C.A. Rutkowski, B. Wolanski, Z. Yang, G. Migliaccio, R. De Francesco, L.C. Kuo, M. MacCoss, and D.B. Olsen, Inhibition of hepatitis C virus RNA

replication by 2'-modified nucleoside analogs, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 14, Apr. 2003, pp. 11979-11984.

31. D.B. Olsen, A.B. Eldrup, L. Bartholomew, B. Bhat, M.R. Bosserman, A. Ceccacci, L.F. Colwell, J.F. Fay, O.A. Flores, K.L. Getty, J.A. Grobler, R.L. LaFemina, E.J. Markel, G. Migliaccio, M. Prhavc, M.W. Stahlhut, J.E. Tomassin, M. MacCoss, D.J. Hazuda, and S.S. Carroll, A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 10, Oct. 2004, pp. 3944-3953.
32. L.J. Stuyver, T.R. McBrayer, P.M. Tharnish, J. Clark, L. Hollecker, S. Lostia, T. Nachman, J. Grier, M.A. Bennett, M.Y. Xie, R.F. Schinazi, J.D. Morrey, J.L. Julander, P.A. Furman, and M.J. Otto, Inhibition of hepatitis C replicon RNA synthesis by beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine: a specific inhibitor of hepatitis C virus replication, *Antivir. Chem. Chemother.*, vol. 17, no. 2, Apr. 2006, pp. 79-87.
33. J.M. Berke, L. Vijgen, S. Lachau-Durand, M.H. Powdrill, S. Rawe, E. Sjuvarsson, S. Eriksson, M. Götte, E. Fransen, P. Dehertogh, C. Van den Eynde, L. Leclercq, T.H. Jonckers, P. Raboisson, M. Nilsson, B. Samuelsson, A. Rosenquist, G.C. Fanning, and T.I. Lin, Antiviral activity and mode of action of TMC647078, a novel nucleoside inhibitor of the hepatitis C virus NS5B polymerase, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 8, Aug. 2011, pp. 3812-3820.
34. H. Ma, W.R. Jiang, N. Robledo, V. Leveque, S. Ali, T. Lara-Jaime, M. Masjedizadeh, D.B. Smith, N. Cammack, K. Klumpp, and J. Symons, Characterization of the metabolic activation of hepatitis C virus nucleoside inhibitor beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine (PSI-6130) and identification of a novel active 5'-triphosphate species, *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 41, Oct. 2007, pp. 29812-29820.
35. M.J. Sofia, Nucleotide prodrugs for HCV therapy, *Antiviral Chem. Chemother.*, vol. 22, no. 1, Aug. 2011, pp. 23-49.
36. S.J. Hecker, and M.D. Erion, Prodrugs of phosphates and phosphonates, *J. Med. Chem.*, vol. 51, no. 8, Apr. 2008, pp. 2328-2345.

37. M.E. Ariza, Current prodrug strategies for the delivery of nucleotides into cells, *Drug Des. Rev. Online*, vol. 2, no. 5, Aug. 2005, pp. 373-387.
38. R.L. Mackman, and T. Cihlar, Prodrug strategies in the design of nucleoside and nucleotide antiviral therapeutics, *Annu. Rep. Med. Chem.*, vol. 39, Nov. 2004, pp. 305-321.
39. E. Murakami, C. Niu, H. Bao, H.M. Micolochick Steuer, Whitaker T, Nachman T, M.A. Sofia, P. Wang, M.J. Otto, and P.A. Furman, The mechanism of action of beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine involves a second metabolic pathway leading to beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methyluridine 5'-triphosphate, a potent inhibitor of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 2, Feb. 2008, pp. 458-464.
40. A.M. Lam, C. Espiritu, E. Murakami, V. Zennou, S. Bansal, H.M. Micolochick Steuer, C. Niu, M. Keilman, H. Bao, N. Bourne, R.L. Veselenak, P.G. Reddy, W. Chang, J. Du, D. Nagarathnam, M.J. Sofia, M.J. Otto, and P.A. Furman, Inhibition of hepatitis C virus replicon RNA synthesis by PSI-352938, a cyclic phosphate prodrug of {beta}-D-2'-deoxy-2'-{alpha}-fluoro-2'-{beta}-C-Methylguanosine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 6, Jun. 2011, pp. 2566-2575.
41. C. McGuigan, K. Madela, M. Aljarah, A. Gilles, A. Brancale, N. Zonta, S. Chamberlain, J. Vernachio, J. Hutchins, A. Hall, B. Ames, E. Gorovits, B. Ganguly, A. Kolykhalov, J. Wang, J. Muhammad, J.M. Patti, and G. Henson, Design, synthesis and evaluation of a novel double pro-drug: INX-08189. A new clinical candidate for hepatitis C virus, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 16, Aug. 2010, pp. 4850-4854.
42. X.J. Zhou, K. Pietropaolo, J. Chen, S. Khan, J. Sullivan-Bólyai, and D.J. Mayers, Safety and pharmacokinetics of IDX184, a liver-targeted nucleotide polymerase inhibitor of hepatitis C virus, in healthy subjects, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, no. 1, Jan. 2011, pp. 76-81.
43. W. Chang, D. Bao, B.-K. Chun, De. Naduthambi, D. Nagarathnam, S. Rachakonda, P.G. Reddy, B.S. Ross, H.-R. Zhang, S. Bansal, C.L. Espiritu, M. Keilman, A.M. Lam, C. Niu, H. Micolochick Steuer, P.A.

- Furman, M.J. Otto, and M.J. Sofia, Discovery of PSI-353661, a novel purine nucleotide prodrug for the treatment of HCV infection, *Med. Chem. Lett.*, vol. 2, no. 2, Dec. 2011, pp. 130-135.
44. A. Cho, L. Zhang, J. Xu, R. Lee, T. Butler, S. Metobo, V. Aktoudianakis, W. Lew, H. Ye, M. Clarke, E. Doerffler, D. Byun, T. Wang, D. Babusis, A.C. Carey, P. German, D. Sauer, W. Zhong, S. Rossi, M. Fenaux, J.G. McHutchison, J. Perry, J. Feng, A.S. Ray, and C.U. Kim, Discovery of the first C-nucleoside HCV polymerase inhibitor (GS-6620) with demonstrated antiviral response in HCV infected patients, *J. Med. Chem.*, vol. 57, no. 5, Mar. 2014, pp. 1812-1825.
45. C.A. Lesburg, M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A.F. Mannarino, and P.C. Weber, Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site, *Nat. Struct. Biol.*, vol. 6, no. 10, Oct. 1999, pp. 937-943.
46. R. Tedesco, A.N. Shaw, R. Bambal, D. Chai, N.O. Concha, M.G. Darcy, D. Dhanak, D.M. Fitch, A. Gates, W.G. Gerhardt, D.L. Haleboua, C. Han, G.A. Hofmann, V.K. Johnston, A.C. Kaura, N. Liu, R.M. Keenan, J. Lin-Goerke, R.T. Sarisky, K.J. Wiggall, M.N. Zimmerman, and K.J. Duffy, 3-(1,1-Dioxo-2H-(1,2,4)-benzothiadiazin-3-yl)-4-hydroxy-2(1H)-quinolinones, potent inhibitors of hepatitis C Virus RNA-dependent RNA polymerase, *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 3, Feb. 2006, pp. 971-983.
47. S. Le Pogam, H. Kang, S.F. Harris, V. Leveque, A.M. Giannetti, S. Ali, W.R. Jiang, S. Rajyaguru, G. Tavares, C. Oshiro, T. Hendricks, K. Klumpp, J. Symons, M.F. Browner, N. Cammack, and I. Najera, Selection and characterization of replicon variants dually resistant to thumb- and palm-binding nonnucleoside polymerase inhibitors of the hepatitis C virus. *J. Virol.*, vol. 80, no. 12, Jun. 2006, pp. 6146-6154.
48. A.N. Shaw, R. Tedesco, R. Bambal, D. Chai, N.O. Concha, M.G. Darcy, D. Dhanak, K.J. Duffy, D.M. Fitch, A. Gates, V.K. Johnston, R.M. Keenan, J. Lin-Goerke, N. Liu, R.T. Sarisky, K.J. Wiggall, and M.N. Zimmerman, Substituted benzothiadiazine inhibitors of hepatitis C virus

- polymerase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 15, Aug. 2009, pp. 4350-4353.
49. P. Thompson, R. Patel, K. Steffy, and J. Appleman, Preclinical studies of ANA598 combined with other anti-HCV agents demonstrate potential of combination treatment, *J. Hepatol.*, vol. 50 (Suppl.), 2009, p. S37.
 50. E. Lawitz, M. Rodriguez-Torres, V.K. Rustgi, T. Hassanein, M.H. Rahimy, C.A. Crowley, J.L. Freddo, A. Muir, and J. McHutchison, Safety and antiviral activity of ANA598 in combination with pegylated IFN alpha 2a plus ribavirin in treatment-naïve genotype-1 chronic HCV patients, *J. Hepatol.*, vol. 52 (Suppl.), 2010, pp. 334A-335A.
 51. F. Poordad, E. Lawitz, K.V. Kowdley, G.T. Everson, B. Freilich, D. Cohen, S. Siggelkow, M. Heckaman, R. Menon, T. Pilot-Matias, T. Podsadecki, and B. Bernstein, 12 weeks interferon-free regimen of ABT-450/R + ABT-333 + ribavirin achieved svr12 in more than 90 % of treatment-naive HCV genotype-1-infected subjects and 47 % of previous non-responders, *J. Hepatol.*, vol. 56 (Suppl.), 2012, pp. S549-S550.
 52. M.J. Slater, E.M. Amphlett, D.M. Andrews, G. Bravi, G. Burton, A.G. Cheasty, J.A. Corfield, M.R. Ellis, R.H. Fenwick, S. Fernandes, R. Guidetti, D. Haigh, C.D. Hartley, P.D. Howes, D.L. Jackson, R.L. Jarvest, V.L. Lovegrove, K.J. Medhurst, N.R. Parry, H. Price, P. Shah, O.M. Singh, R. Stocker, P. Thommes, C. Wilkinson, and A. Wonacott, Optimization of novel acyl pyrrolidine inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase leading to a development candidate, *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 5, Mar. 2007, pp. 897-900.
 53. F. Pauwels, W. Mostmans, L.M.M. Quiryne, L. van der Helm, C.W. Boutton, A.-S. Rueff, E. Cleiren, P. Raboisson, D. Surleraux, O. Nyanguile, and K.A. Simmen, Binding-site identification and genotypic profiling of hepatitis C virus polymerase inhibitors, *J. Virol.*, vol. 81, no. 13, Jul. 2007, pp. 6909-6919.
 54. F. Gray, L. Amphlett, H. Bright, L. Chambers, A. Cheasty, R. Fenwick, D. Haigh, D. Hartley, P. Howes, R. Jarvest, F. Mirzai, F. Nerozzi, N. Parry, M. Slater, S. Smith, P. Thommes, C. Wilkinson, and E. Williams,

- GSK625433; a novel and highly potent inhibitor of the HCVNS5B polymerase, *J. Hepatol.*, vol. 46 (Suppl.), 2007, p. S225.
55. A. Gopalsamy, A. Aplasca, G. Ciszewski, K. Park, J.W. Ellingboe, M. Orłowski, B. Feld, and A.Y. Howe, Design and synthesis of 3,4-dihydro-1H-[1]-benzothieno[2,3-c]pyran and 3,4-dihydro-1H-pyrano[3,4-b]benzofuran derivatives as nonnucleoside inhibitors of HCV NS5B RNA dependent RNA polymerase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 16, no. 2, Jan. 2006, pp. 457-460.
 56. N.M. Kneteman, A.Y.M. Howe, T. Gao, J. Lewis, D. Pevear, G. Lund, D. Douglas, D.F. Mercer, D.L.J. Tyrrell, F. Immermann, I. Chaudhary, J. Speth, S.A. Villano, J. O'Connell, and M. Collett, HCV796: a selective nonstructural protein 5B polymerase inhibitor with potent anti-hepatitis C virus activity *in vitro*, in mice with chimeric human livers, and in humans infected with hepatitis C virus, *Hepatology*, vol. 49, no. 3, Mar. 2009, pp. 745-752.
 57. J.A. Pfefferkorn, R. Nugent, R.J. Gross, M. Greene, M.A. Mitchell, M.T. Reding, L.A. Funk, R. Anderson, P.A. Wells, J.A. Shelly, R. Anstadt, B.C. Finzel, M.S. Harris, R.E. Kilkuskie, L.A. Kopta, and F.J. Schwende, Inhibitors of HCV NS5B Polymerase. Part 2: Evaluation of the northern region of (2Z)-2-Benzoylamino-3-(4-phenoxy-phenyl)-acrylic acid, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 15, no. 11, Jun. 2005, pp. 2812-2818.
 58. S. Yan, T. Appleby, E. Gunic, J.H. Shim, T. Tasu, H. Kim, F. Rong, H. Chen, R. Hamatake, J.Z. Wu, Z. Hong, and N. Yao, Isothiazoles as active-site inhibitors of HCV NS5B polymerase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 1, Jan. 2007, pp. 28-33.
 59. V. Summa, A. Petrocchi, P. Pace, V.G. Matassa, F.R. De, S. Altamura, L. Tomei, U. Koch, and P. Neuner, Discovery of α,γ -diketo acids as potent selective and reversible inhibitors of hepatitis C virus NS5b RNA-dependent RNA polymerase, *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 1, Jan. 2004, pp. 14-17.
 60. S. Di Marco, C. Volpari, L. Tomei, S. Altamura, S. Harper, F. Narjes, U. Koch, M. Rowley, R. De Francesco, G. Migliaccio, and A. Carfí,

Interdomain communication in hepatitis C virus polymerase abolished by small molecule inhibitors bound to a novel allosteric site, *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 33, Aug. 2005, pp. 29765-29770.

61. G. Kukolj, G.A. McGibbon, G. McKercher, M. Marquis, S. Lefèbvre, L. Thauvette, J. Gauthier, S. Goulet, and M.A. Poupart, Binding site characterization and resistance to a class of non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase, *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 47, Nov. 2005, pp. 39260-39267.
62. P.L. Beaulieu, M. Bos, M.G. Cordingley, C. Chabot, G. Fazal, M. Garneau, J.R. Gillard, E. Jolicoeur, S. LaPlante, G. McKercher, M. Poirier, M.A. Poupart, Y.S. Tsantrizos, J. Duan, and G. Kukolj, Discovery of the first thumb pocket 1 NS5B polymerase inhibitor (BILB 1941) with demonstrated antiviral activity in patients chronically infected with genotype 1 hepatitis C virus (HCV), *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 17, Sep. 2012, pp. 7650-7666.
63. D.M. Brainard, A. Petry, K. van Dyck, R.B. Nachbar, I. de Leppeleire, L. Caro, J.A. Stone, P. Sun, M. Uhle, F. Wagner, E. O'Mara, and J.A. Wagner, Safety and antiviral activity of NS5B polymerase inhibitor MK-3281, in treatment-naïve genotype 1a, 1b and 3 HCV-infected patients, *Hepatology*, vol. 50 (Suppl.), 2009, pp. 1026A-1027A.
64. B. Devogelaere, J.M. Berke, L. Vijgen, P. Dehertogh, E. Fransen, E. Cleiren, L. van der Helm, O. Nyanguile, A. Tahri, K. Amssoms, O Lenz, M.D. Cummings, R.F. Clayton, S. Vendeville, P. Raboisson, K.A. Simmen, G.C. Fanning, and T.I. Lin, TMC647055, a potent nonnucleoside hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitor with cross-genotypic coverage, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 9, Sep. 2012, pp. 4676-4684.
65. D.G. Larrey, Y. Benhamou, A.W. Lohse, C. Trepo, C. Moelleken, and J.P. Bronowicki, Bi 207127 is a potent HCV RNA polymerase inhibitor during 5 days monotherapy in patients with chronic hepatitis C, *Hepatology*, vol. 50 (Suppl.), 2009, p. 1044A.

66. F. Narjes, B. Crescenzi, M. Ferrara, J. Habermann, S. Colarusso, R. Ferreira Mdel, I. Stansfield, A.C. Mackay, I. Conte, C. Ercolani, S. Zaramella, M.C. Palumbi, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, C. Giuliano, F. Fiore, S. Di Marco, P. Baiocco, U. Koch, G. Migliaccio, S. Altamura, R. Laufer, R. De Francesco, and M. Rowley, Discovery of (7R)-14-cyclohexyl-7-[[2-(dimethylamino)ethyl](methyl)amino]-7,8-dihydro-6H-indolo[1,2-e][1,5] benzoxazocine-11-carboxylic acid (MK-3281), a potent and orally bioavailable finger-loop inhibitor of the hepatitis C virus NS5B polymerase, *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 1, Jan. 2011, pp. 289-301.
67. A. Erhardt, K. Deterding, Y. Benhamou, M. Reiser, X. Forns, S. Pol, J.L. Calleja, S. Ross, H.C. Spangenberg, J. Garcia-Samaniego, M. Fuchs, J. Enríquez, J. Wiegand, J. Stern, K. Wu, G. Kukolj, M. Marquis, P. Beaulieu, G. Nehmiz, and J. Steffgen, Safety, pharmacokinetics and antiviral effect of BILB 1941, a novel hepatitis C virus RNA polymerase inhibitor, after 5 days oral treatment, *Antiviral. Ther.*, vol. 14, no. 1, 2009, pp. 23-32.
68. D. Larrey, A.W. Lohse, V. de Ledinghen, C. Trepo, T. Gerlach, J.P. Zarski, A. Tran, P. Mathurin, R. Thimme, K. Arastéh, C. Trautwein, A. Cerny, N. Dikopoulos, M. Schuchmann, M.H. Heim, G. Gerken, J.O. Stern, K. Wu, N. Abdallah, B. Girlich, J. Scherer, F. Berger, M. Marquis, G. Kukolj, W. Böcher, and J. Steffgen, Rapid and strong antiviral activity of the nonnucleosidic NS5B polymerase inhibitor BI 207127 in combination with peginterferon alfa 2a and ribavirin, *J. Hepatol.*, vol. 57, no. 1, Jul. 2012, pp. 39-46.
69. M. Wang, K.K. Ng, M.M. Cherney, L. Chan, C.G. Yannopoulos, J. Bedard, N. Morin, N. Nguyen-Ba, M.H. Alaoui-Ismaili, R.C. Bethell, and M.N. James, Non-nucleoside analogue inhibitors bind to an allosteric site on HCV NS5B polymerase, Crystal structures and mechanism of inhibition, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 11, Mar. 2003, pp. 9489-9495.
70. M. Rodriguez-Torres, E. Lawitz, and B. Conway, Safety and antiviral activity of the HCV non-nucleoside polymerase inhibitor VX-222 in

- treatment-naive genotype 1 HCV-infected patients, *J. Hepatol.*, vol. 52 (Suppl.), 2010, p. S14.
71. H. Li, J. Tatlock, A. Linton, J. Gonzalez, T. Jewell, L. Patel, S. Ludlum, M. Drowns, S.V. Rahavendran, H. Skor, R. Hunter, S.T. Shi, K.J. Herlihy, H. Parge, M. Hickey, X. Yu, F. Chau, J. Nonomiya, and C. Lewis, Discovery of (R)-6-Cyclopentyl-6-(2-(2,6-diethylpyridin-4-yl)ethyl)-3-((5,7-dimethyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-2-yl)methyl)-4-hydroxy-5,6-dihydropyran-2-one (PF-00868554) as a potent and orally available hepatitis C virus polymerase inhibitor, *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 5, Mar. 2009, pp. 1255-1258.
 72. A.Y. Howe, J. Bloom, C.J. Baldick, C.A. Benetatos, H. Cheng, J.S. Christensen, S.K. Chunduru, G.A. Coburn, B. Feld, A. Gopalsamy, W.P. Gorczyca, S. Herrmann, S. Johann, X. Jiang, M.L. Kimberland, G. Krisnamurthy, M. Olson, M. Orlowski, S. Swanberg, I. Thompson, M. Thorn, A. Del Vecchio, D.C. Young, M. van Zeijl, J.W. Ellingboe, J. Upeslakis, M. Collett, T.S. Mansour, and J.F. O'Connell, Novel nonnucleoside inhibitor of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 12, Dec. 2004, pp. 4813-4821.
 73. A.Y. Howe, H. Cheng, I. Thompson, S.K. Chunduru, S. Herrmann, J. O'Connell, A. Agarwal, R. Chopra, and A.M. Del Vecchio, Molecular mechanism of a thumb domain hepatitis C virus nonnucleoside RNA-dependent RNA polymerase inhibitor, *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, no. 12, Dec. 2006, pp. 4103-4113.
 74. M.M. May, D. Brohm, A. Harrenga, T. Marquardt, B. Riedl, J. Kreuter, H. Zimmermann, H. Ruebsamen-Schaeff, and A. Urban, Discovery of substituted N-phenylbenzenesulphonamides as a novel class of non-nucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitors, *Antiviral Res.*, vol. 95, no. 2, Aug. 2012, pp. 182-191.
 75. C.A. Lesburg, M.B. Cable, E. Ferrari, Z. Hong, A.F. Mannarino, and P.C. Weber, Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from

- hepatitis C virus reveals a fully encircled active site, *Nat. Struct. Biol.*, vol. 6, no. 10, Oct. 1999, pp. 937-943.
76. S. Bressanelli, L. Tomei, F.A. Rey, and R. De Francesco, Structural Analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides, *J. Virol.*, vol. 76, no. 7, Apr. 2002, pp. 3482-3492.
 77. J.Q. Hang, Y. Yang, S.F. Harris, V. Leveque, H.J. Whittington, S. Rajyaguru, G. Ao-leong, M.F. McCown, A. Wong, A.M. Giannetti, S. Le Pogam, F. Talamas, N. Cammack, I. Najera, and K. Klumpp, Slow binding inhibition and mechanism of resistance of non-nucleoside polymerase inhibitors of hepatitis C virus, *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 23, Jun. 2009, pp. 15517-15529.
 78. S.L. Thein, Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia, *Br. J. Haematol.*, vol. 124, no. 3, Feb. 2004, pp. 264-274.
 79. J.M. Old, Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders, *Blood Rev.*, vol. 17, no. 1, Mar. 2003, pp. 43-53.
 80. C. Borgna-Pignatti, M.D Cappellini, P. De Stefano, G.C. Del Vecchio, G.L. Forni, M.R. Gamberini, R. Ghilardi, R. Origa, A. Piga, M.A. Romeo, H. Zhao, A. Cnaan, Survival and complications in thalassaemia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1054, 2005, pp. 40-47.
 81. E. Voskaridou, V. Ladis, A. Kattamis, E. Hassapopoulou, M. Economou, A. Kourakli, K. Maragkos, K. Kontogianni, S. Lafioniatis, E. Vrettou, F. Koutsouka, A. Papadakis, A. Mihos, E. Eftihiadis, K. Farmaki, O. Papageorgiou, G. Tapaki, P. Maili, M. Theohari, M. Drosou, Z. Kartasis, M. Aggelaki, A. Basileiadi, I. Adamopoulos, I. Lafiatis, A. Galanopoulos, G. Xanthopoulidis, E. Dimitriadou, A. Mprimi, M. Stamatopoulou, E. Damba Haile, M. Tsironi, A. Anastasiadis, M. Kalmanti, M. Papadopoulou, E. Panori, P. Dimoxenou, A. Tsirka, D. Georgakopoulos, P. Drandrakis, D. Dionisopoulou, A. Ntalamaga, I. Davros, M. Karagiorga, on behalf of the Greek Haemoglobinopathies Study Group, A national registry of haemoglobinopathies in Greece: Deducted demographics, trends in mortality and affected births, *Ann. Hematol.*, vol. 91, no. 9, Sep. 2012, pp. 1451-1458.

82. P. Pootrakul, P. Sirankapracha, J. Sankote, U. Kachintorn, W. Maungsub, K. Sriphen, K. Thakernpol, K. Atisuk, S. Fucharoen, U. Chantraluksri, O. Shalev, A.V. Hoffbrand, Clinical trial of deferiprone iron chelation therapy in beta-thalassaemia/haemoglobin E patients in Thailand, *Br. J. Haematol.*, vol.122, no. 2, Jul. 2003, pp. 305-310.
83. E. Voskaridou, E. Plata, M. Douskou, M. Papadakis, E.E Delaki, D. Christoulas, E. Terpos, Treatment, with deferasirox (Exjade) effectively decreases iron burden in patients with thalassaemia intermedia: results of a pilot study, *Br. J. Haematol.*, vol. 148, no.2, Jan. 2010, pp. 332-334.
84. V. Ladis, H. Berdousi, E. Gotsis, A. Kattamis, Deferasirox administration for the treatment of non-transfusional iron overload in patients with thalassaemia intermedia. *Br. J. Haematol.*, vol. 151, no. 5, Dec. 2010, pp. 504-508.
85. M.W. Deininger, J.M. Goldman, J.V. Melo, The molecular biology of chronic myeloid leukemia, *Blood*, vol. 96, no. 10, Nov. 2000, pp. 3343-3356.
86. R. Kurzrock, J.U. Gutterman, M. Talpaz, The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias, *N. Engl. J. Med.*, vol. 319, no. 15, Oct. 1998, pp. 990-998.
87. C.B. Lozzio, B.B. Lozzio, Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood*, vol. 45, no. 3, Mar. 1975, pp. 321-334.
88. T.R. Rutherford, J.B. Clegg, D.J. Weatherall, K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin, *Nature*, vol. 280, no. 5718, Jul. 1979, pp. 164-165.
89. T. Rutherford, J.B. Clegg, D.R. Higgs, R.W. Jones, J. Thompson, D.J. Weatherall, Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562, *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 1, Jan. 1981, pp. 348-352.
90. N.F. Olivieri, D.J. Weatherall, The therapeutic reactivation of fetal haemoglobin, *Hum. Mol. Genet.*, vol. 7, no. 10, 1998, pp. 1655-1658.

91. R. Gambari, E. Fibach, Medicinal chemistry of fetal hemoglobin inducers for treatment of beta-thalassemia, *Curr. Med. Chem.*, vol. 14, no. 2, 2007, pp. 199-212.
92. A.T. Taher, K.M. Musallam, M.D. Cappellini, D.J. Weatherall, Optimal management of β thalassaemia intermedia, *Br. J. Haematol.*, vol. 152, no. 5, Mar. 2011, pp. 512-523.
93. G.J. Dover, S. Brusilow, D. Samid, Increased fetal haemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate, *N. Engl. J. Med.*, vol. 327, no. 8, Aug. 1992, pp. 569-570.
94. H. Fathallah, G. Atweh, Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease, *Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 2006, pp. 58-62.
95. G.P. Rodgers, G.J. Dover, N. Uyesaka, C.T. Noguchi, A.N. Schechter, A.W. Nienhuis, Augmentation by erythropoietin of fetal-hemoglobin response to hydroxyurea in sickle cell disease. *N. Engl. J. Med.*, vol. 328, no. 2, Jan. 1993, pp. 73-80.
96. P. Rigano, A. Pecoraro, R. Calzolari, A. Troia, S. Acuto, D. Renda, G.R. Pantalone, A. Maggio, R. Di Marzo, Desensitization to hydroxycarbamide following long-term treatment of thalassaemia intermedia as observed *in vivo* and in primary erythroid cultures from treated patients. *Br. J. Haematol.*, vol. 151, no. 5, Dec. 2010, pp. 509-515.
97. R.S. Weinberg, X. Ji, M. Sutton, S. Perrine, Y. Galperin, Q. Li, S.A. Liebhaber, G. Stamatoyannopoulos, G.F. Atweh, Butyrate increases the efficiency of translation of gammaglobin mRNA, *Blood*, vol. 105, no. 4, Feb. 2005, pp. 1807-1809.
98. N. Masera, L. Tavecchia, M. Capra, G. Cazzaniga, C. Vimercati, L. Pozzi, A. Biondi, G. Masera, Optimal response to thalidomide in a patient with thalassaemia major resistant to conventional therapy, *Blood Transfus.*, vol. 8, no. 1, Jan. 2010, pp. 63-65.

99. L.B. Aguilar-Lopez, J.L. Delgado-Lamas, B. Rubio-Jurado, F.J. Perea, B. Ibarra, Thalidomide therapy in a patient with thalassemia major, *Blood Cells Mol. Dis.*, vol. 41, no. 1, Jul.-Aug. 2008, pp. 136-137.
100. K. Bourantas, G. Economou, J. Georgiou, Administration of high doses of recombinant human erythropoietin to patients with beta-thalassemia intermedia: a preliminary trial, *Eur. J. Haematol.*, vol. 58, no. 1, Jan. 1997, pp. 22-25.
101. S.T. Singer, E.P. Vichinsky, N. Sweeters, E. Rachmilewitz, Darbepoetin alfa for the treatment of anaemia in alpha- or beta-thalassaemia intermedia syndromes, *Br. J. Haematol.*, vol. 154, no. 2, Jul. 2011, pp. 281-284.
102. S.W. Cowan-Jacob, V. Guez, G. Fendrich, J.D. Griffin, D. Fabbro, P. Furet, J. Liebetanz, J. Mestan, P.W. Manley, Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment, *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 4, no. 3, Mar. 2004, pp. 285-299.
103. A. Quintas-Cardama, J. Cortes, Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia, *Blood*, vol. 113, no. 8, Feb. 2009, pp. 1619-1630.
104. R. Ren, Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 3, Mar. 2005, pp. 172-183.
105. D. Cortez, L. Kadlec, A.M. Pendergast, Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis, *Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 10, Oct. 1995, pp. 5531-5541.
106. T.G. Lugo, A.M. Pendergast, A.J. Muller, O.N. Witte, Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products, *Science*, vol. 247, no. 4946, Mar. 1990, pp. 1079-1082.
107. A.J. McGahon, D.G. Brown, S.J. Martin, G.P. Amarante-Mendes, T.G. Cotter, G.M. Cohen, D.R. Green, Downregulation of Bcr-Abl in K562

- cells restores susceptibility to apoptosis: characterization of the apoptotic death, *Cell Death Differ.*, vol. 4, no. 2, Feb. 1997, pp. 95-104.
108. J.J. Gu, L. Santiago, B.S. Mitchell, Synergy between imatinib and mycophenolic acid in inducing apoptosis in cell lines expressing Bcr-Abl, *Blood*, vol. 105, no. 8, Apr. 2005, pp. 3270-3277.
109. J. Jakubowska, M. Stasiak, A. Szulawska, A. Bednarek, M. Czyz, Combined effects of doxorubicin and STI571 on growth, differentiation and apoptosis of CML cell line K562, *Acta Biochim. Pol.*, vol. 54, no. 4, 2007, pp. 839-846.
110. T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W.T. Miller, B. Clarkson, J. Kuriyan, Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase, *Science*, vol. 289, no. 5486, Sept. 2000, pp. 1938-1942.
111. N.P. Shah, C.L. Sawyers, Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias, *Oncogene*, vol. 22, no. 47, Oct. 2003, pp. 7389-7395.
112. C.L. Sawyers, Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer, *Genes Dev.*, vol. 17, no. 24, Dec. 2003, pp. 2998-3010.
113. M.V. Reddy, V.R. Pallela, S.C. Cosenza, M.R. Mallireddigari, R. Patti, M. Bonagura, M. Truongcao, B. Akula, S.S. Jatiani, E.P. Reddy, Design, synthesis and evaluation of (E)-alpha-benzylthio chalcones as novel inhibitors of BCR-ABL kinase, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, no. 6, Mar. 2010, pp. 2317-2326.
114. G. Wei, S. Rafiyath, D. Liu, First-line treatment for chronic myeloid leukemia: dasatinib, nilotinib, or imatinib, *J. Hematol. Oncol.*, vol. 3, no. 1, Nov. 2010, p. 47.
115. E. Weisberg, P.W. Manley, S.W. Cowan-Jacob, A. Hochhaus, J.D. Griffin, Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia, *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 5, May 2007, pp. 345-356.

116. A. Taher, M.M. Khaled, M. Karimi, A. El-Beshlawy, K. Belhoul, S. Daar, M.-S.E. Saned, A.-H. El-Chafic, M.R. Fasulo, M.D. Cappellini, Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study, *Blood*, vol. 115, no. 10, Mar. 2010, pp. 1886-1892.
117. D.C. Young, *Computational drug design: A guide for Computational and Medicinal Chemists*, John Wiley & Sons, Inc., 2009, pp. 14-16.
118. Θ. Μαυρομούστακος, και Π. Ζουμπουλάκης, *Μοριακή Μοντελοποίηση, Εφαρμογές στην Οργανική και Φαρμακευτική Χημεία*, Ιατρικές εκδόσεις Γ.Β. Παρισιάνος, 2008, pp. 32-126.
119. A.R. Leach, *Molecular Modelling, Principles and applications*, Pearson Education Ltd, 2001, pp. 1-24.
120. N.C. Cohen, Structure-based drug design and the discovery of aliskiren (Tekturna): perseverance and creativity to overcome a R&D pipeline challenge, *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 70, no. 6, Dec. 2007, pp. 557-565.
121. T.P. Lybrand, Ligand-protein docking and rational drug design, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 5, no. 2, Apr. 1995, pp. 224-228.
122. M. Böhm, J. St rzebecher, and G. Klebe, Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analyses using comparative molecular field analysis and comparative molecular similarity indices analysis to elucidate selectivity differences of inhibitors binding to trypsin, thrombin, and factor Xa, *J. Med. Chem.*, vol. 42, no. 3, Feb. 1999, pp. 458-477.
123. MacroModel, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
124. N.L. Allinger, Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 99, no. 25, Dec. 1977, pp. 8127-8134.
125. N.L. Allinger, Y.H. Yuh, and J.H. Lij, Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, no. 23, Mar. 1989, pp. 8551-8566.

126. W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, and P.A. Kollman, A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, 1995, pp. 5179-51.
127. D.M. Ferguson, and P.A. Kollman, Can the Lennard-Jones 6-12 function replace the 10-12 form in molecular mechanics calculations?, *J. Comput. Chem.*, vol. 12, no. 5, Jun. 1991, pp. 620-626.
128. D.Q. McDonald, and W.C. Still, AMBER* torsional parameters for the peptide backbone, *Tetrahedron Lett.*, vol. 33, 1992, pp. 7743-7746.
129. W.L. Jorgensen, and J. Tirado-Rives, The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, 1988, pp. 1657-1666.
130. T.A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94, *J. Comput. Chem.*, vol. 17, no. 5-6, Apr. 1996, pp. 490-519.
131. T.A. Halgren, Merck Molecular Force Field: II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions, *J. Comput. Chem.*, vol. 17, no. 5-6, Apr. 1996, pp. 520-552.
132. T.A. Halgren, Merck Molecular Force Field: III. Molecular geometries and vibrational frequencies, *J. Comput. Chem.*, vol. 17, no. 5-6, Apr. 1996, pp. 553-586.
133. T.A. Halgren, and R.B. Nachbar, Merck molecular force field. IV. Conformational energies and geometries for MMFF94, *J. Comput. Chem.*, vol. 17, no. 5-6, Apr. 1996, pp. 587-615.
134. T A. Halgren, Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules, *J. Comput. Chem.*, vol. 17, no. 5-6, Apr. 1996, pp. 616-641.
135. T.A. Halgren, MMFF VI. MMFF94s Option for energy minimization studies, *J. Comput. Chem.*, vol. 20, no. 7, May 1999, pp. 720-729.

136. T.A. Halgren, MMFF VII. Characterization of MMFF94, MMFF94s and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular interaction energies and geometries, *J. Comput. Chem.*, vol. 20, no.7, May 1999, pp. 730-748.
137. W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, and J. Tirado-Rives, Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, no. 45, Jun. 1996, pp. 11225-11236.
138. G.A. Kaminski, R.A. Friesner, J. Tirado-Rives, and W.L. Jorgensen, Evaluation and reparameterization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with accurate quantum chemical calculations on peptides, *J. Phys. Chem. B*, vol. 105, no. 28, 2001, pp. 6474-6487.
139. E. Polak, and G. Ribiere, Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées. *ReV. Fr. Informat. Recherche Operationelle Ser. Rouge*, vol. 16, 1969, pp. 35-43.
140. J.W. Ponder, and F.M. Richards, An efficient newton-like method for molecular mechanics energy minimization of large molecules, *J. Comput. Chem.*, vol. 8, no. 7, Oct/Nov.1987, pp. 1016-1024.
141. S.S. Oren, and E. Spedicato, Optimal conditioning of self-scaling variable Metric algorithms, *Math. Program.*, vol. 10, no. 1, Dec. 1976, pp. 70-90.
142. 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.
143. LigPrep, version 2.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
144. E. Fischer, Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, vol. 27, 1894, pp. 2985-2993.
145. D.E. Koshland, Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 44, 1958, pp. 98-104.

146. G. Ermondi, and G. Caron, Recognition forces in ligand-protein complexes: blending information from different sources, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 72, no. 12, Dec. 2006, pp. 1633-1645.
147. J. Blaney, and J. Dixon, A good ligand is hard to find: Automated docking methods, *Perspect. Drug Discov.*, vol. 1, no. 2, Dec. 1993, pp. 301-319.
148. I.D. Kuntz, Structure-based strategies for drug design and discovery, *Science*, vol. 257, no. 5073, Aug. 1992, pp. 1078-1082.
149. R. Abagyan, and M. Totrov, High-throughput docking for lead generation, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 4, Aug. 2001, pp. 375-382.
150. W.P. Walters, M.T. Stahl, and M.A. Murcko, Virtual screening—an overview, *Drug Discov. Today*, vol. 3, no. 4, 1998, pp. 160-178.
151. W.D. Cornell, P. Cieplak, C.I. Bayly, I.R. Gould, K.M. Merz, D.M. Ferguson, D.C. Spellmeyer, T. Fox, J.W. Caldwell, and P.A. Kollman, A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids and organic molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, 1995, pp. 5179-5197.
152. W.L. Jorgensen, and J. Tirado-Rives, The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, 1988, pp. 1657-1666.
153. B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, and M. Karplus, CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comput. Chem.*, vol. 4, 1983, pp. 187-217.
154. M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, and R.P. Mee, 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.*, vol. 11, no. 5, Sep. 1997, pp. 425-445.

155. I. Muegge, and Y.C. Martin, A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach, *J. Med. Chem.*, Mar. 1999, vol. 42, no. 5, pp. 791-804.
156. A.N. Jain, T.G. Dietterich, R.H. Lathrop, D. Chapman, R.E. Critchlow Jr., B.E. Bauer, T.A. Webster, and T. Lozano-Perez, A shape-based machine learning tool for drug design, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 8, no. 6, Dec. 1994, pp. 635-652.
157. W. Welch, J. Ruppert, and A.N. Jain, Hammerhead, fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites, *Chem. Biol.*, vol. 3, no.6, Jun. 1996, pp. 449-462.
158. SYBYL/Surflex-Dock, molecular modeling software packages, version 8.0, 2007, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO 63144-2917.
159. A.N. Jain, Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine, *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 4, Feb. 2003, pp. 499-511.
160. J. Ruppert, W. Welch, and A.N. Jain, Automatic identification and representation of protein binding sites for molecular docking, *Protein Sci.*, vol. 6, no. 3, Mar. 1997, pp. 524-533.
161. A.N. Jain, Scoring noncovalent protein-ligand interactions: A continuous differentiable function tuned to compute binding affinities, *J. Comput. Aided-Mol. Des.*, vol. 10, no. 5, Oct. 1996, pp. 427-440.
162. Glide, version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, User Manual, 2012.
163. R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, and P.S. Shenkin, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy, *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 7, Mar. 2004, pp. 1739-1749.
164. T.A. Halgren, R.B. Murphy, R.A. Friesner, H.S. Beard, L.L. Frye, W.T. Pollard, and J.L. Banks, Glide: a new approach for rapid, accurate

- docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening, *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 7, Mar. 2004, pp. 1750-1759.
165. R.A. Friesner, R.B. Murphy, M.P. Repasky, L.L. Frye, J.R. Greenwood, T.A. Halgren, P.C. Sanschagrin, and D.T. Mainz, Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes, *J. Med. Chem.*, vol. 49, no. 21, Oct. 2006, 6177-6196.
166. B. Li, Z. Liu, and L. Zhang, Multiple-docking and affinity fingerprint methods for protein classification and inhibitors selection, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 49, no. 7, Jul. 2009, pp. 1725-1733.
167. M.T.D. Cronin, and A.P. Worth, (Q)SARs for predicting effects relating to reproductive toxicity QSAR & Combinatorial, *Science*, vol. 27, no. 1, Jan. 2008, pp. 91-100.
168. T. Puzyn, N. Suzuki, M. Haranczyk, and J. Rak, Calculation of quantum-mechanical descriptors for QSPR at the DFT level: Is it necessary? *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 48, no. 6, Jun. 2008, pp. 1174-1180.
169. M. Urbano-Cuadrado, J.J. Carbo, A.G. Maldonado, and C. Bo, New quantum mechanics-based three-dimensional molecular descriptors for use in QSSR approaches: application to asymmetric catalysis, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 47, no. 6, Nov-Dec. 2007, pp. 2228-2234.
170. T.I. Netzeva, A.O. Aptula, E. Benfenati, M.T.D. Cronin, G. Gini, I. Lessigiarska, U. Maran, M. Vracko, and G. Schüürmann, Description of the electronic structure of organic chemicals using semiempirical and ab initio methods for development of toxicological QSARs, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 45, no. 1, Jan-Feb. 2005, pp. 106-114.
171. R. Todeschini, and V. Consonni, *Molecular Descriptors for Chemoinformatics*, 2nd ed., Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH & Co, 2009.
172. A. Schüürmann, ed., *Quantum chemical descriptors in structure–activity relationships – calculation, interpretation and comparison of methods*, Taylor and Francis, London, 2004.

173. A.F.A. Cros, *Action de l'alcool amylique sur l'organisme*, Thesis, University of Strasbourg, Strasbourg, France, 1863.
174. A. Crum-Brown, and T.R. Fraser, On the connection between chemical constitution and physiological action. Part 1. On the physiological action of the ammonium bases, derived from Strychia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia and Nicotia, *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, vol. 25, 1868, pp. 151-203.
175. C. Richet, and C.R. Seancs, Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales, *Soc. Biol. Ses. Fil.*, vol. 9, 1893, p. 775.
176. H. Meyer, Zur Theorie der Alkoholnarkose Erste Mittheilung. Welche Eigenschaft der Anästhetica bedingt ihre narkotische Wirkung?, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, vol. 42, no. 2-4, 1899, pp. 109-118.
177. E. Overton, Studien über die Narkose, *Fischer*, Jena, Germany, 1901.
178. J. Ferguson, The use of chemical potentials as indices of toxicity, *Proc. R. Soc. London Ser. B*, vol. 127, 1939, pp. 387-404.
179. L.P. Hammett, Some relations between reaction rates and equilibrium constants, *Chem. Rev.*, vol. 17, 1935, pp. 125-136.
180. C. Hansch, and T. Fujita, p- σ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 86, no. 8, Apr. 1964, pp. 1616-1626.
181. H. Kubinyi, *QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*, VCH, Weinheim, 1993.
182. R.D. Cramer, D.E. Patterson, and J.D. Bunce, Comparative Molecular-Field Analysis (Comfa) .1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, no. 18, Aug. 1988, pp. 5959-5967.
183. C. Hansch, A. Leo, and S.R. Heller, ed., *Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*, American Chemical Society, Washington, DC, 1995.

184. C.A. Ramsden, ed., *Quantitative Drug Design, Vol. 4 of Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, C. Hansch, P.G. Sammes, and J.B. Taylor, eds., Pergamon Press, Oxford, 1990
185. H. Kubinyi, in *Burger's Medicinal Chemistry*, vol. I, M.E. Wolff, ed., Wiley, New York, 5th ed., 1995, pp. 497-571.
186. H. van de Waterbeemd, ed., *Structure Property Correlations in Drug Research*, Academic Press, Austin, TX, 1996.
187. R. Todeschini, M. Lasagni, and E. Marengo, New molecular descriptors for 2D and 3D structures. Theory, *J. Chemometrics*, vol. 8, no. 4, Jul.-Aug. 1994, pp. 263-272.
188. C. Hansch, A. Leo, and D. Hoekman, *Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and steric constants*, American Chemical Society, Washington, DC, 1995, p. 348.
189. T. Fujita, The role of QSAR in drug design, G. Jolles and K.R.H. Woldridge, eds., *Drug design: Fact or fantasy?*, Academic Press, London, 1984, pp. 19-33.
190. D.B. Boyd, Successes of computer-assisted molecular design, K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd, eds., *Reviews in computational chemistry*, VCH, New York, 1990, pp. 355-371.
191. C. Hansch, and T. Fujita, ed., *Classical and three-dimensional QSAR in agrochemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, 1995, pp. 342.
192. A. Tsantili-Kakoulidou, QSAR: A valuable tool in drug design or a computer game? A dialectic view, *Pharmakeftiki*, vol. 21, 2008, pp. 45-56.
193. T. Puzyn, J. Leszczynski, and M.T. Cronin, eds., *Recent Advances in QSAR Studies Methods and Applications*, Springer, 2010.
194. Y.C. Martin, 3D QSAR: Current state, scope, and limitations, *Perspect. Drug Discov. Des.*, vol. 12-14, 1998, pp. 3-23.

195. H. Kubinyi, 3D QSAR in Drug Design: Volume 1: Theory Methods and Applications (Three-Dimensional Quantitative Structure Activity Relationships), Springer, 1993.
196. S.S. Kulkarni, L.K. Gediya, and V.M. Kulkarni, Three-dimensional Quantitative Structure Activity Relationships (3D-QSAR) of antihyperglycemic agents, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 7, no. 7, Jul. 1999, pp. 1475-1485.
197. P. Hanumanthappa, M.K. Teli, R.G. Krishnamurthy, Generation of pharmacophore and atom based 3D-QSAR model of novel isoquinolin-1-one and quinazolin-4-one-type inhibitors of TNF α , *Med Chem.*, vol. 8, no. 3, May 2012, pp. 436-451.
198. G. Klebe, U. Abraham, and T. Mietzner, Molecular similarity indexes in a comparative-analysis (Comsia) of drug molecules to correlate and predict their biological activity, *J. Med. Chem.*, vol. 37, no. 24, Nov. 1994, pp. 4130-4146.
199. L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikström, S. Wold, Multi- and megavariate data analysis Part 1: Principles & Applications, 2nd ed., Umea, Sweden, MKS Umetrics AB, 2006.
200. K.H. Kim, G. Greco, and E. Novellino, A critical review of recent CoMFA applications, *Perspect. Drug Discovery Des.*, vol. 12-14, Jan. 1998, pp. 257-315.
201. J. Gasteiger, and M. Marsili, Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges, *Tetrahedron*, vol. 36, no. 22, Mar. 1980, pp. 3219-3228.
202. W.P. Purcell, and J.A. Singer, A brief review and table of semiempirical parameters used in the Hueckel molecular orbital method, *J. Chem. Eng. Data*, vol. 12, 1967, pp. 235-246.
203. S. Wold, A. Ruhe, H. Wold, and W.J. Dunn, The collinearity problem in linear regression: The partial least squares approach to generalized inverses, *SIAM J. Sci. Stat. Comput.*, vol. 5, 1984, p. 735-743.

204. R.D. Cramer III, J.D. Bunce, D.E. Patterson, and I.E. Frank, Crossvalidation, bootstrapping, and partial least squares compared with multiple regression in conventional QSAR studies, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, vol. 7, no. 1, 1988, pp. 18-25.
205. D.M. Hawkins, S.C. Basak, and D. Mills, Assessing model fit by cross-validation, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, vol. 43, no. 2, Mar-Apr. 2003, pp. 579-586.
206. A. Tropsha, Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation, *Mol. Inf.*, vol. 29, no. 6-7, Jul. 2010, pp. 476-488.
207. S.L. Dixon, A.M. Smondyrev, E.H. Knoll, S.N. Rao, D.E. Shaw, and R.A. Friesner, PHASE: a new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 20, no. 10-11, Oct-Nov. 2006, pp. 647-671.
208. S.L. Dixon, A.M. Smondyrev, and S.N. Rao, PHASE: a novel approach to pharmacophore modeling and 3D database searching, *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 67, no. 5, May 2006, pp. 370-372.
209. D.E. Clark, What has virtual screening ever done for drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov. Perspect.*, vol. 3, no. 8, Aug. 2008, pp. 841-851.
210. D.A. Horvath, Virtual screening approach applied to the search of trypanothione reductase inhibitors, *J. Med. Chem.*, vol. 40, no. 15, Jul. 1997, pp. 2412-2423.
211. M.T. Stahl, W.P. Walters, and M.A. Murcko, Virtual Screening: an overview, *Drug Discovery Today*, vol. 3, no. 4, Apr. 1998, pp. 160-178.
212. T.N. Doman, S.L. McGovern, B.J. Witherbee, T.P. Kasten, R. Kurumbail, W.C. Stallings, D.T. Connolly, and B.K. Shoichet, Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B, *J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 11, May 2002, pp. 2213-2221.

213. K. Kim, N.D. Kim, and B. Seong, Pharmacophore-based virtual screening: A review of recent applications, *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 5, no. 3, Mar. 2010, pp. 205-222.
214. V.I. Pérez-Nueno, D.W. Ritchie, O. Rabal, R. Pascual, J.I. Borrell, and J. Teixidó, Comparison of ligand-based and receptor-based virtual screening of HIV entry inhibitors for the CXCR4 and CCR5 receptors using 3D ligand shape matching and ligand-receptor docking, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 48, 2008, pp. 509-533.
215. A. Varnek, and A. Tropsha, Royal Society of Chemistry (Great Britain). *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening*, A. Varnek, and A. Tropsha (Eds), Cambridge: RSC Pub., 2008, xvi, 338 p.: ill. (some col.)
216. A. Gaulton, L.J. Bellis, A.P. Bento, J. Chambers, M. Davies, A. Hersey, Y. Light, S. McGlinchey, D. Michalovich, B. Al-Lazikani, and J.P. Overington, ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery, *Nucleic Acids Res.*, vol. 40 (Database issue), 2012, pp. D1100-7.
217. <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>
218. E. Bolton, Y. Wang, P.A. Thiessen, and S.H. Bryant, PubChem: Integrated platform of small molecules and biological activities, Chapter 12, In: *Annual Reports in Computational Chemistry*, R.A. Wheeler, and D.C. Spellmeyer, eds., Elsevier: Oxford, UK, 2008, vol. 4, pp. 217-240.
219. G. Chen, H. Ren, A. Turpoff, A. Arefolov, R. Wilde, J. Takasugi, A. Khan, N. Almstead, Z. Gu, T. Komatsu, C. Freund, J. Breslin, J. Colacino, J. Hedrick, M. Weetall, and M.G Karp, Discovery of N-(4'-(indol-2-yl)phenyl)sulfonamides as novel inhibitors of HCV replication, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 13, Jul. 2013, pp. 3942-3946.
220. M. Karelson, D.A. Dobchev, G. Karelson, T. Tamm, K. Tämm, A. Nikonov, M. Mutso, and A. Merits, Fragment-based development of HCV protease inhibitors for the treatment of hepatitis C, *Curr. Comput. Aided Drug Des.*, vol. 8, no. 1, Mar. 2012, pp. 55-61.

221. M.L. Barreca, N. Iraci, G. Manfroni, and V. Cecchetti, Allosteric inhibition of the hepatitis C virus NS5B polymerase: *in silico* strategies for drug discovery and development, *Future Med. Chem.*, vol. 3, no. 8, Jun. 2011, pp. 1027-1055.
222. J.C. Shelley, A. Cholleti, L.L. Frye, J.R. Greenwood, M.R. Timlin, and M. Uchimaya, Epik: a software program for pK(a) prediction and protonation state generation for drug-like molecules, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 21, no. 12, Dec. 2007, pp. 681-691.
223. A.A. Kolykhalov, E.V. Agapov, K.J. Blight, K. Mihalik, S.M. Feinstone, and C.M. Rice, Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA, *Science*, vol. 277, no. 5325, Jul. 1997, pp. 570-574.
224. U. Koch, and F. Narjes, Recent progress in the development of inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase, *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 7, no. 13, 2007, pp. 1302-1329.
225. SYBYL, Molecular Modeling Software Packages Version 8.0, Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, MO, 2007.
226. R. Balamurugan, A. Stalin, and S. Ignacimuthu, Molecular docking of γ -sitosterol with some targets related to diabetes, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 47, no.1, Jan. 2012, pp. 38-43.
227. G. Melagraki, A. Afantitis, H. Sarimveis, O. Igglessi-Markopoulou, and A. Alexandridis, A novel RBF neural network training methodology to predict toxicity to *Vibrio Fischeri*, *Mol. Divers.*, vol. 10, no. 2, May 2006, pp. 213-221.
228. K. Nesmerak, A.A. Toropov, A.P. Toropova, P. Kohoutova, and K. Waisser, SMILES-based quantitative structure-property relationships for half-wave potential of N-benzylsalicylthioamides, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 67, Sep. 2013, pp. 111-114.
229. P.R. Murumkar, M.K. Sharma, A.C. Shinde, and K.G. Bothara, Three-dimensional quantitative structure-activity relationship CoMFA/CoMSIA

- on pyrrolidine-based tartrate diamides as TACE inhibitors, *Med. Chem. Res.*, vol. 22, no. 9, Sep. 2013, pp. 4192-4201.
230. J. Yuan, Y. Pu, and L. Yin, Docking-based three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) predicts binding affinities to aryl hydrocarbon receptor for polychlorinated dibenzodioxins, dibenzofurans, and biphenyls, *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 32, no. 7, Jul. 2013, pp. 1453-1458.
231. A. Golbraikh, and A. Tropsha, Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection, *Mol. Divers.*, vol. 5, no. 4, 2002, pp. 231-243.
232. A. Afantitis, G. Melagraki, H. Sarimveis, P.A. Koutentis, O. Igglessi-Markopoulou, and G. Kollias, A combined LS-SVM & MLR QSAR workflow for predicting the inhibition of CXCR3 receptor by quinazolinone analogs, *Mol. Divers.*, vol. 14, no. 2, May 2010, pp. 225-235.
233. S. Kar, and K. Roy, How far can virtual screening take us in drug discovery?, *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 8, no. 3, Mar. 2013, pp. 245-261.
234. P.K. Ojha, and K. Roy, First report on exploring structural requirements of alpha and beta thymidine analogs for PftMPK inhibitory activity using *in silico* studies, *Biosystems*, vol. 113, no. 3, Sep. 2013, pp. 177-195.
235. P.P. Roy, S. Paul, I. Mitra, and K. Roy, On two novel parameters for validation of predictive QSAR models, *Molecules*, vol. 14, no. 5, Apr. 2009, pp. 1660-1701.
236. K. Roy, P. Chakraborty, I. Mitra, P.K. Ojha, S. Kar, and R.N. Das, Some case studies on application of "rm2" metrics for judging quality of quantitative structure-activity relationship predictions: emphasis on scaling of response data. *J. Comput. Chem.*, vol. 34, no. 12, May 2013, pp. 1071-1082.

237. G. Melagraki, and A. Afantitis, Enalos KNIME nodes: Exploring corrosion inhibition of steel in acidic medium, *Chem. Intel. Lab. Syst.*, vol. 123, Apr. 2013, pp. 9-14.
238. T.T. Talele, P. Arora, S.S. Kulkarni, M.R. Patel, S. Singh, M. Chudayeu, and N. Kaushik-Basu, Structure-based virtual screening, synthesis and SAR of novel inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 18, no. 13, Jul. 2010, pp. 4630-4638.
239. J. Kim, K.-S. Kim, D.-E. Kim, and Y. Chong, Identification of novel HCV RNA-dependent RNA polymerase inhibitors using pharmacophore-guided virtual screening, *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 72, no. 6, Dec. 2008, pp. 585-591.
240. G. Melagraki, A. Afantitis, H. Sarimveis, P.A. Koutentis, J. Markopoulos, and O. Igglessi-Markopoulou, Identification of a series of novel derivatives as potent HCV inhibitors by a ligand-based virtual screening optimized procedure, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 15, no. 23, Dec. 2007, pp. 7237-7247.
241. I. Musmuca, A. Caroli, A. Mai, N. Kaushik-Basu, P. Arora, and R. Ragno, Combining 3D quantitative structure-activity relationship with ligand based and structure based alignment procedures for *in silico* screening of new hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitors, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 50, no. 4, Apr. 2010, pp. 662-676.
242. J. Zhu, Y. Li, H. Yu, L. Zhang, X. Mao, and T. Hou, Insight into the structural requirements of narlaprevir-type inhibitors of NS3/NS4A protease based on HQSAR and molecular field analyses, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 15, no. 6, Jul. 2012, pp. 439-450.
243. K. Ryu, N.D. Kim, S.I. Choi, C.K. Han, J.H. Yoon, K.T. No, K.-H. Kim, and B.L. Seong, Identification of novel inhibitors of HCV RNA-dependent RNA polymerase by pharmacophore-based virtual screening and *in vitro* evaluation, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 17, no. 8, Apr. 2009, pp. 2975-2982.
244. S. Louise-May, W. Yang, X. Nie, D. Liu, M.S. Deshpande, A.S. Phadke, M. Huang, and A. Agarwal, Discovery of novel dialkyl substituted

- thiophene inhibitors of HCV by *in silico* screening of the NS5B RdRp, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 14, Jul. 2007, pp. 3905-3909.
245. T. Li, M. Froeyen, and P. Herdewijn, Insight into ligand selectivity in HCV NS5B polymerase: molecular dynamics simulations, free energy decomposition and docking, *J. Mol. Model.*, vol. 16, no. 1, Jan. 2010, pp. 49-59.
246. X. Wang, W. Yang, X. Xu, H. Zang, Y. Li, and Y. Wang, Studies of benzothiadiazine derivatives as hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitors using 3D-QSAR, molecular docking and molecular dynamics, *Curr. Med. Chem.*, vol. 17, no. 25, 2010, pp. 2788-2803.
247. B.C. Davis, and I.F. Thorpe, Thumb inhibitor binding eliminates functionally important dynamics in the hepatitis C virus RNA polymerase, *Proteins*, vol. 81, no. 1, Jan. 2013, pp. 40-52.
248. L. Su, L. Li, Y. Li, X. Zhang, X. Huang, and H. Zhai, Simple and accurate approaches to predict the activity of benzothiadiazine derivatives as HCV inhibitors, *Med. Chem. Res.*, vol. 21, no. 8, Aug. 2012, pp. 2079-2096.
249. M.A.H. Ismail, D.A. Abou El Ella, K.A.M. Abouzid, and A.H. Mahmoud, Integrated structure-based activity prediction model of benzothiadiazines on various genotypes of HCV NS5b polymerase (1a, 1b and 4) and its application in the discovery of new derivatives, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 20, no. 7, Apr. 2012, pp. 2455-2478.
250. E.M. Duffy, and W.L. Jorgensen, Prediction of properties from simulations: Free energies of solvation in hexadecane, octanol, and water, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, no. 12, Mar. 2000, pp. 2878-2888.
251. W.L. Jorgensen, and E.M. Duffy, Prediction of drug solubility from Monte Carlo simulations, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 10, no. 11, Jun. 2000, pp. 1155-1158.
252. C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in

- drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 46, no. 1-3, Mar. 2001, pp. 3-26.
253. W.L. Jorgensen, and E.M. Duffy, Prediction of drug solubility from structure, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 3, Mar. 2002, pp. 355-366.
254. QikProp, version 3.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
255. M.J. Robarge, D.C. Bom, L.N. Tumey, N. Varga. E. Gleason. D. Silver, J. Song, S.M. Murphy, G. Ekema, C. Doucette, D. Hanniford, M. Palmer, G. Pawlowski, J. Danzig, M. Loftus, K. Hunady, B.A. Sherf, R.W. Mays, A. Sticker-Krongrad, K.R. Brunden, J.J. Harrington, and Y.L. Bennani, Isosteric ramatroban analogs: selective and potent CRTH-2 antagonists, *Biorg. Chem. Lett.*, vol. 15, no. 6, Mar. 2005, pp. 1749-1753.
256. B. Hu, J.W. Jetter, J.E. Wrobel, T.M. Antrilli, J.S. Bauer, L. Di, S. Polakowski, U. Jain, and D.L. Crandall, Synthesis and SAR of 2-carboxylic acid indoles as inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 15, no. 15, Aug. 2005, pp. 3514-3518.
257. K.X. Chen, B. Vibulbhan, W. Yang, M. Sannigrahi, F. Velazquez, T.Y. Chan, S. Venkatraman, G.N. Anilkumar, Q. Zeng, F. Bennet, Y. Jiang, C.A. Lesburg, J. Duca, P. Pinto, S. Gavalas, Y. Huang, W. Wu, O. Selyutin, S. Agrawal, B. Feld, H.C. Huang, C. Li, K.C. Cheng, N.Y. Shih, J.A. Kozlowski, S.B. Rosenblum, and F.G. Njoroge, Structure-activity relationship (SAR) development and discovery of potent indole-based inhibitors of the hepatitis C virus (HCV) NS5B polymerase, *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 2, Jan. 2012, pp. 754-765.
258. M. Brands, J.K. Erguden, K. Hashimoto, D. Heimbach, C. Schroder, S. Siegel, J.P. Stasch, and S. Weigand, Novel, selective indole-based ECE inhibitors: lead optimization via solid-phase and classical synthesis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 15, no. 19, Oct. 2005, pp. 4201-4205.
259. C. Hundsdorfer, H.J. Hemmerling, C. Gotz, F. Totzke, P. Bednarski, M. Le Borgne, and J. Jose, Indeno[1.2-b]indole derivatives as a novel class of potent human protein kinase CK2 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 20, no. 7, Apr. 2012, pp. 2282-2289.

260. K. Park, A. Gopalsamy, A. Aplasca, J.W. Ellingboe, W. Xu, Y. Zhang, and J.I. Levin, Synthesis and activity of tryptophan sulfonamide derivatives as novel non-hydroxamate TNF- α converting enzyme (TACE) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 17, no. 11, Jun. 2009, pp. 3857-3865.
261. M. Gallant, C. Beaulieu, C. Berthelette, J. Colucci, M.A. Crackower, C. Dalton, D. Denis, Y. Ducharme, R.W. Friesen, D. Guay, F.G. Gervais, M. Hamel, R. Houle, C.M. Krawczyk, B. Kosjek, S. Lau, Y. Leblanc, E.E. Lee, J.F. Levesque, C. Mellon, C. Molinaro, W. Mullet, G.P. O'Neill, P. O'Shea, N. Sawyer, S. Sillaots, D. Simard, D. Slipetz, R. Stocco, D. Sørensen, V.L. Truong, E. Wong, J. Wu, H. Zaghdane, and Z. Wang, Discovery of MK-7246, a selective CRTH2 antagonist for the treatment of respiratory diseases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 1, Jan. 2011, pp. 288-293.
262. W. Liu, K. Liu, H.B. Wood, M.E. McCann, T.W. Doebber, C.H. Chang, T.E. Akiyama, M. Einstein, J.P. Berger, and P.T. Meinke, Discovery of a peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) modulator with balanced PPAR α activity for the treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia, *J. Med. Chem.*, vol. 52, no. 14, Jul. 2009, pp. 4443-4453.
263. J.S. Sawyer, D.W. Beight, E.C. Smith, D.W. Snyder, M.K. Chastain, R.L. Tielking, L.W. Hartley, and D.G. Carlson, Carbocyclic[g]indole inhibitors of human nonpancreatic s-PLA₂, *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 3, Feb. 2005, pp. 893-896.
264. V. Mouchlis, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, G. Kollias, and A. Afantitis, Molecular modeling on pyrimidine-urea inhibitors of TNF- α production: an integrated approach using a combination of molecular docking, classification techniques and 3D-QSAR CoMSIA, *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 52, no. 3, Mar. 2012, pp. 711-723.
265. L. Zhang, A. Sedykh, A. Tripathi, H. Zhu, A. Afantitis, V. Mouchlis, G. Melagraki, I. Rusyn, and A. Tropsha, Identification of putative estrogen receptor-mediated endocrine disrupting chemicals using QSAR- and

- structure-based virtual screening approaches, *Tox. Appl. Pharm.*, vol. 272, no. 1, Oct. 2013, pp. 67-76.
266. E. Vrontaki, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, Exploiting ChEMBL database to identify indole analogs as HCV replication inhibitors, *Methods*, vol. 71, Jan. 2015, pp. 4-13.
267. T.A. Stammers, R. Coulombe, J. Rancourt, B. Thavonekham, G. Fazal, S. Goulet, A. Jakalian, D. Wernic, Y. Tsantrizos, M.-A. Poupart, M. Bös, G. McKercher, L. Thauvette, G. Kukolj, and P.L. Beaulieu, Discovery of a novel series of non-nucleoside thumb pocket 2 HCV NS5B polymerase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 9, May 2013, pp. 2585-2589.
268. T.A. Stammers, R. Coulombe, M. Duplessis, G. Fazal, A. Gagnon, M. Garneau, S. Goulet, A. Jakalia, S. LaPlant, J. Rancourt, B. Thavonekham, D. Wernic, G. Kukolj, and P.L. Beaulieu, Anthranilic acid-based Thumb Pocket 2 HCV NS5B polymerase inhibitors with sub-micromolar potency in the cell-based replicon assay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 24, Dec. 2013, pp. 6879-6885.
269. R.A. Love, H.E. Parge, X. Yu, M.J. Hickey, W. Diehl, J. Gao, H. Wriggers, A. Ekker, L. Wang, J.A. Thomson, P.S. Dragovich, and S.A. Fuhrman, Crystallographic identification of a noncompetitive inhibitor binding site on the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase enzyme, *J. Virol.*, vol. 77, no. 13, Jul. 2003, pp. 7575-7581.
270. M. Kontoyianni, L.M. McClellan, and G.S. Sokol, Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms, *J. Med. Chem.*, vol. 47, no. 3, Jan. 2004, pp. 558-565.
271. SYBYL/QSAR and COMFA, version 8.0, Tripos Inc, St Louis, MO, 2007.
272. K.K. Sethi, and S.M. Verma, A systematic quantitative approach to rational drug design and discovery of novel human carbonic anhydrase IX inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 29, no. 4, Aug. 2014, pp. 571-581.

273. G. Melagraki, A. Afantitis, H. Sarimveis, O. Igglessi-Markopoulou, and C.T. Supuran, QSAR study on parasubstituted aromatic sulfonamides as carbonic anhydrase II inhibitors using topological information indices, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 14, no. 4, Feb 2006, pp. 1108-1114.
274. S. Singh, and C.T. Supuran, 3D-QSAR CoMFA studies on sulfonamide inhibitors of the Rv3588c β -carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis* and design of not yet synthesized new molecules, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 29, no. 3, Jun. 2014, pp. 449-455.
275. G. Agelis, A. Resvani, C. Koukoulitsa, T. Tůmová, J. Slaninová, D. Kalavrizioti, K. Spyridaki, A. Afantitis, G. Melagraki, A. Siafaka, E. Gkini, G. Megariotis, S.G. Grdadolnik, M.G. Papadopoulos, D. Vlahakos, M. Maragoudakis, G. Liapakis, T. Mavromoustakos, and J. Matsoukas, Rational design, efficient syntheses and biological evaluation of N,N'-symmetrically bisubstituted butylimidazole analogs as a new class of potent angiotensin II receptor blockers, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 62, Apr. 2013, pp. 352-370.
276. J.B. Ghasemi, and N. Meftah, Docking, CoMFA and CoMSIA studies of a series of sulfonamides derivatives as carbonic anhydrase I inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 28, no. 2, Apr. 2013, pp. 320-327.
277. E. Cichero, O. Bruno, and P. Fossa, Docking-based CoMFA and CoMSIA analyses of tetrahydro- β -carboline derivatives as type-5 phosphodiesterase inhibitors, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 27, no. 5, Oct. 2012, pp. 730-743.
278. S. Durdagi, M.G. Papadopoulos, D.P. Papahadjis, T. Mavromoustakos, Combined 3D QSAR and molecular docking studies to reveal novel cannabinoid ligands with optimum binding activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 17, no. 24, Dec. 2007, pp. 6754-6763.
279. A. Afantitis, G. Melagraki, H. Sarimveis, P.A. Koutentis, J. Markopoulos, and O. Igglessi-Markopoulou, Development and evaluation of a QSPR model for the prediction of diamagnetic susceptibility, *QSAR Comb. Sci.*, vol. 27, no. 4, Apr. 2008, pp. 432-436.

280. A. Vaidya, A.K. Jain, P. Kumar, S.K. Kashaw, and, R.K. Agrawal, Predicting anti-cancer activity of quinoline derivatives: CoMFA and CoMSIA approach, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 26, no. 6, Dec. 2011, pp. 854-861.
281. S. Durdagi, T. Mavromoustakos, and M.G. Papadopoulos, 3D QSAR CoMFA/CoMSIA, molecular docking and molecular dynamics studies of fullarene-based HIV-1 PR inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 23, Dec. 2008, pp. 6283-6289.
282. M. Hao, Y. Li, S.-W. Zhang, and W. Yang, Investigation on the binding mode of benzothiophene analogues as potent factor IXa (FIXa) inhibitors in thrombosis by CoMFA, docking and molecular dynamic studies, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 26, no. 6, Dec. 2011, pp. 792-804.
283. S. Rännar, F. Lindgren, P. Geladi, S. Wold, A PLS kernel algorithm for data sets with many variables and fewer objects. Part 1: theory and algorithm, *J. Chemometrics*, vol. 8, no. 2, Mar-Apr. 1994, pp. 111-125.
284. M.P. De Bethune, S. De Meyer, K. Hertogs, et al., Small molecule entry inhibitors, Patent US7429677B2; 30-09-2008.
285. E. Vrontaki, G. Melagraki, T. Mavromoustakos, A. Afantitis, Searching for anthranilic acid-based thumb pocket 2 HCV NS5B polymerase inhibitors through a combination of molecular docking, 3D-QSAR and virtual screening, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2016, vol. 31, no. 1, pp. 38-52.
286. J.F. Dorsey, J.M. Cunnick, S.M. Mane, and J. Wu, Regulation of the Erk2-Elk1 signaling pathway and megakaryocytic differentiation of Bcr-Abl(+) K562 leukemic cells by Gab2, *Blood*, vol. 99, no. 4, Feb. 2002, pp. 1388-1397.
287. A. Jacquel, M. Herrant, L. Legros, N. Belhacene, F. Luciano, G. Pages, P. Hofman, and P. Auberger, Imatinib induces mitochondria-dependent apoptosis of the Bcr-Abl-positive K562 cell line and its differentiation toward the erythroid lineage, *FASEB J.*, vol. 17, no. 14, Nov. 2003, pp. 2160-2162.

288. E. Brognara, I. Lampronti, G. Breveglieri, A. Accetta, R. Corradini, A. Manicardi, M. Borgatti, A. Canella, C. Multineddu, R. Marchelli, and R. Gambari, C(5) modified uracil derivatives showing antiproliferative and erythroid differentiation inducing activities on human chronic myelogenous leukemia K562 cells, *Eur. J. Pharmacol*, vol. 672, no. 1-3, Dec. 2011, 30-37.
289. PHASE, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
290. A.A. San Juan, Structural investigation of PAP derivatives by CoMFA and CoMSIA reveals novel insight towards inhibition of Bcr-Abl oncoprotein, *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 26, no. 2, Sep. 2007, pp. 482-493.
291. J. Cui, R. Fu, L.H. Zhou, S.P. Chen, G.W. Li, S.X. Qian, S. Liu, BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor pharmacophore model derived from a series of phenylaminopyrimidine-based (PAP) derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 23, no. 8, Apr. 2013, pp. 2442-2450.
292. H.N. Banavath, O.P. Sharm, M.S. Kumar, R. Baskaran, Identification of novel tyrosine kinase inhibitors for drug resistant T315I mutant BCR-ABL: a virtual screening and molecular dynamics simulations study, *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 4, Nov. 2014, p. 6948.
293. X. Pan, F. Wang, Y. Zhang, H. Gao, Z. Hu, S. Wang, J. Zhang, Design, synthesis and biological activities of nilotinib derivatives as antitumor agents, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 21, no. 9, May 2013, pp. 2527-2534.
294. X. Pan, J. Dong, H. Gao, F. Wang, Y. Zhang, S. Wang, J. Zhang, Design, synthesis and biological evaluation of pyridin-3-yl pyrimidines as potent Bcr-Abl inhibitors, *Chem. Biol. Drug. Des.*, vol. 83, no. 5, May 2014, pp. 592-599.
295. S. Shukla, A. Kouanda, L. Silverton, T.T. Talele, S.V. Ambudkar, Pharmacophore modeling of nilotinib as an inhibitor of ATP-binding cassette drug transporters and BCR-ABL kinase using a three-dimensional quantitative structure-activity relationship approach, *Mol. Pharm.*, vol. 11, no. 7, Jul. 2014, pp. 2313-2322.

296. S. Ma, G. Zeng, D. Fang, J. Wang, W. Wu, W. Xie, S. Tan, K. Zheng, Studies of N(9)-arenthenyl purines as novel DFG-in and DFG-out dual Src/Abl inhibitors using 3D-QSAR, docking and molecular dynamics simulations, *Mol. Biosyst.*, vol. 11, no. 2, Feb. 2015, pp. 394-406.
297. ChemBioDraw Ultra 12.0, ChemBioOffice 2010, PerkinElmer.
298. Maestro 10.2, Graphical User Interface, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
299. LigPrep, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
300. MacroModel, version 10.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
301. SiteMap, version 3.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
302. Glide, version 6.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015.
303. E. Vrontaki, G. Melagraki, S. Voskou, M.S. Phylactides, T. Mavromoustakos, M. Kleanthous, A. Afantitis, Development of a predictive pharmacophore model and a 3D-QSAR study for an *in silico* screening of new potent Bcr-Abl kinase inhibitors, *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2016, accepted