



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

---

# Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου ως μοριακός στόχος για τον σχεδιασμό υπογλυκαιμικών φαρμάκων

---

Γεωργουσάκης Χρήστος  
Λάρισα 2015

---

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

### **Δρ. Λεωνίδας Δημήτρης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, τμήμα  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

### **Δρ. Σκαμνάκη Βασιλική**

Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού, τμήμα  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

### **Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, τμήμα  
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου  
Θεσσαλίας

## Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εκπονήθηκε κατά το χρονικό διάστημα 2009-2010 στα πλαίσια της συνεργασίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με το Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας όπου και πραγματοποιήθηκε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κα. Κοντού Μαρία, Λέκτορα Κλινικής Χημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας που αρχικά δέχτηκε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον τότε ερευνητή του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και νυν αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Δρ. Δημήτρη Λεωνίδα που δέχτηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψη του καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά του.

Επίσης, θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω τη κα. Σκαμνάκη, Λέκτορα Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύπλευρη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου. Σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου υπήρξε δίπλα μου τις στιγμές που τη χρειάστηκα προσφέροντάς μου την πολύτιμη βοήθειά της.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υποψήφια διδάκτωρ και φίλη μου Βίκυ Τσιρκώνη για την αμέριστη βοήθεια και τη στήριξή της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία και τη δημιουργία ενός πραγματικά φιλικού κλίματος στο εργαστήριο. Νιώθω ιδιαίτερα ευτυχής που μου δόθηκε η ευκαιρία στα αρχικά αυτά στάδια της δραστηριότητάς μου σε εργαστηριακό χώρο, να γνωρίσω τόσο αξιόλογους ανθρώπους.

# Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....

Abstract.....

Περίληψη.....

## Θεωρητικός μέρος

**1. Ο σακχαρώδης διαβήτης σε κλινικό και μοριακό επίπεδο .....**

1.1 Ο σακχαρώδης διαβήτης.....

1.2 Η ινσουλίνη και ο ρόλος της στην μεταφορά της γλυκόζης .....

1.3 Η οικογένεια των φωσφορυλασών του γλυκογόνου .....

1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ένας μοριακός στόχος για τον ΣΔΤ II .....

**2. Ο σχεδιασμός φαρμάκων .....**

2.1 Αναδρομή στο σχεδιασμό φαρμάκων .....

2.2 Ο σχεδιασμός φαρμάκων σήμερα .....

**3. Φαρμακευτικές ενώσεις με φθόριο .....**

3.1 Γενικά .....

3.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες των φθοριούχων φαρμάκων .....

3.3 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες φθοριούχων φαρμάκων .....

3.4 Φαρμακολογικές συνέπειες φθοριούχων φαρμάκων .....

## Πειραματικό μέρος

**4.1 Αντικείμενο μελέτης.....**

**4.2 Αντιδραστήρια και Υλικά .....**

**4.3 Κινητικές μελέτες .....**

4.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων πολλαπλών συγκεντρώσεων G1P .....

4.3.2 Παρασκευή διαλύματος γλυκογόνου .....

4.3.3 Παρασκευή διαλυμάτων πολλαπλών συγκεντρώσεων G1P παρουσία AMP .....

4.3.4 Προσδιορισμός φωσφόρου με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος .....

4.3.5 Παρασκευή τυφλών διαλυμάτων .....

4.3.6 Προσδιορισμός των αρχικών ταχυτήτων ( $v$ ) .....

4.3.8 Διαλυτοποίηση και ρύθμιση pH των υποψήφιων αναστολέων.....

4.3.9 Προσδιορισμός IC50 αναστολέα .....

### **Αποτελέσματα & Συζήτηση**

5.1 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων.....

5.2 Συζήτηση .....

**Βιβλιογραφία.....**

## Abstract

Design of inhibitors of glycogen phosphorylase (GP) with pharmaceutical applications in improving glycaemic control in type 2 diabetes is a promising therapeutic strategy. The catalytic site of muscle glycogen phosphorylase b (GPb) has been probed with two deoxy-fluoro-glucose derivatives. These inhibitors had fluorine instead of hydroxyl at the 3' position of the glucose moiety and different pyrimidine derivatives at the 1' position. To elucidate the potency of the inhibition for these compounds, kinetic experiments have been performed. The kinetic parameters of the compounds, assayed with GPb in the direction of glycogen synthesis. The ligands are displaying mM range inhibition ( $K_i$ 's =  $3.67 \pm 0.30$  mM and  $3.46 \pm 0.07$  mM). The fluorine substitution in the 3' position of the glucose moiety has a substantial effect on the potency since it increased more than 500 times the  $K_i$  values of the compounds with respect to N-Acetyl-b-D-glucopyranosylamine (NAG) ( $K_i = 32$   $\mu$ M). NAG was one of the first efficient glucose analogue inhibitors of GP, and has been used as a lead in inhibitor design. The present study has demonstrated that the novel analogues are competitive inhibitors of muscle GP albeit with moderate affinity. Further work is currently in progress to examine modified analogues with greater potency for the catalytic site of the enzyme.

**Keywords:** Glycogen phosphorylase; Diabetes; Structure-assisted inhibitor design;

## Περίληψη

Ο σχεδιασμός αναστολέων για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) με στόχο τον Σακχαρώδη διαβήτη τύπου II αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική. Το καταλυτικό κέντρο της GPb μελετήθηκε για δύο δεοξυ-φλουρο-γλυκοζιτικά ανάλογα. Αυτοί οι αναστολείς διαθέτουν ένα φθόριο αντί για υδροξύλιο στην θέση 3' της γλυκόζης και διαφορετικές πυριμιδίνες στην θέση 1'. Για να αποσαφηνίσουμε την αποτελεσματικότητα της αναστολής αυτών των ενώσεων πραγματοποιήσαμε κινητικά πειράματα. Οι κινητικές παράμετροι αυτών των ενώσεων υπολογίσθηκαν για την μορφή b της φωσφορυλάσης, προς την κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου. Οι προσδέτες παρουσίασαν αναστολή της τάξεως των mM ( $K_i$ 's =  $3.67 \pm 0.30$  mM και  $3.46 \pm 0.07$  mM). Η υποκατάσταση με φθόριο στην 3' θέση της γλυκόζης επηρέασε σημαντικά την ισχύ της πρόσδεσης. Οι τιμές της σταθεράς αναστολής  $K_i$  αυξήθηκαν πάνω από 500 φορές σε σύγκριση με αυτή της N-ακετυλό-β-D-γλυκοκυρανοζυλαμίνης (NAG) ( $K_i = 32$  μM). Ο NAG ήταν ένας από τους πρώτους ισχυρούς αναστολείς για το καταλυτικό κέντρο της GP και έχει χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για τον σχεδιασμό αναστολέων. Η παρούσα εργασία δείχνει πως τα καινοτόμα αυτά ανάλογα είναι συναγωνιστικοί αναστολείς της μυϊκής GP, ενώ την ίδια στιγμή ο σχεδιασμός τροποποιημένων αναλόγων με υψηλότερη συγγένεια για το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται σε εξέλιξη.

# 1. Ο σακχαρώδης διαβήτης σε κλινικό και μοριακό επίπεδο

## 1.1 Ο σακχαρώδης διαβήτης

Μία από τις ασθένειες, που στις ημέρες μας έχει λάβει διαστάσεις επιδημίας, κυρίως σε χώρες με χαμηλή ή μεσαία ανάπτυξη, είναι ο σακχαρώδης διαβήτης. Τα δεδομένα της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας μιλούν για μια ραγδαία αύξηση της επίπτωσής του παγκοσμίως. Μόνο το 2004, περίπου 3.4 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν λόγω διαταραγμένων επιπέδων γλυκόζης νηστείας. Στις μέρες μας, 382 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από διαβήτη και σύμφωνα με τις εκτιμήσεις αναμένεται ότι το 2035 ο αριθμός αυτός θα έχει φτάσει ήδη τα 592 εκατομμύρια, κατατάσσοντας την ως την 7<sup>η</sup> κυριότερη αιτία θανάτου (**Εικόνα 1.1**).<sup>1</sup>



Εικόνα 1.1: Εκτίμηση για την επικράτηση της νόσου παγκοσμίως έως το έτος 2030<sup>1</sup>

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια μεταβολική νόσος, η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης και κατ'επέκταση αύξηση της συγκέντρωσής της στο αίμα. Εμφανίζεται στην περίπτωση που το πάγκρεας δεν παράγει επαρκή ινσουλίνη ή όταν ο οργανισμός δεν αποκρίνεται αποτελεσματικά στην παραχθείσα ινσουλίνη.<sup>3</sup>

Η ασθένεια εμφανίζεται σε τρεις μορφές, τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (ΣΔΤ I), τον τύπου II (ΣΔΤ II) και τον διαβήτη της κήσης.



Ο **σακχαρώδης διαβήτης τύπου I** (ινσουλινοεξαρτώμενος), κατατάσσεται στα αυτοάνοσα νοσήματα και οφείλεται στην καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων, υπεύθυνα για τη σύνθεση και έκκριση της ινσουλίνης, της ορμόνης που επιτρέπει στα κύτταρα να προσλάβουν τη γλυκόζη. Συνεπώς, Η καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων οδηγεί σε πλήρης έλλειψη ινσουλίνης, καθιστώντας αναγκαία την εξωγενή χορήγησή της στον ασθενή, ώστε να διατηρούνται φυσιολογικά τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα.

Ο **σακχαρώδης διαβήτης τύπου II** (μη ινσουλινοεξαρτώμενος) είναι η συχνότερη αιτία διαβήτη στους ενηλίκους. Χαρακτηρίζεται από μη-φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης και ελάττωση της ευαισθησίας των κυττάρων σε αυτή (ινσουλινοαντοχή), με αποτέλεσμα την μη επαρκή “δράση” της ινσουλίνης.

Ο **διαβήτης της κήσης** εμφανίζεται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ο τύπος αυτός μοιάζει με το διαβήτη τύπου II ως προς το ότι χαρακτηρίζεται από ταυτόχρονη ελαττωμένη έκκριση ινσουλίνης και ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη.

Παρότι η αναλογία μεταξύ ΣΔΤ I και ΣΔΤ II είχε εκτιμηθεί ~25:75 στην αρχή της δεκαετίας του 90, ο ΣΔΤ II έφτασε να ξεπέρνα το 90% στις μέρες μας. Ο ΣΔΤ II έχει συνδεθεί άμεσα με γενετική προδιάθεση, ενώ ταυτόχρονα παράγοντες, όπως το γήρας, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης, οι διατροφικές συνήθειες φαίνονται να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην εμφάνισή του.<sup>4</sup> Τα κυριότερα συμπτώματα της νόσου αναφορικά είναι η πολυδιψία, η πολυουρία, η πολυφαγία, η οποία όμως συνοδεύεται από απώλεια και όχι από αύξηση βάρους, ο κνησμός, η συχνή εξάντληση χωρίς ιδιαίτερη σωματική δραστηριότητα, η δυσκολία επούλωσης των πληγών και τέλος οι συχνές φλεγμονές και λοιμώξεις.<sup>5</sup>

Παρά τις εκτενείς έρευνες, η κατανόηση της νόσου σε μοριακό επίπεδο παραμένει ελλιπής. Οι διάφοροι τύποι των υπογλυκαιμικών φαρμάκων (σουλφονουλουρίες, διγουανίδια, θειαζολιδινεδιόνες) (**Πίνακας 1.1**) χρησιμοποιούνται ως θεραπείες μόνο για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων χωρίς να προσφέρουν μια οριστική λύση στην αντιμετώπιση της ασθένειας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι N-γλυκοσιδικοί αναστολείς (acarbose, miglitol, voglibose), οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως για την ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα. Εντούτοις η δράση τους συνοδεύεται από μια σειρά σημαντικών παρενεργειών και τον κίνδυνο να προκληθεί υπογλυκαιμία. Επιπλέον, αυτά τα σκευάσματα εμφανίζονται αναποτελεσματικά για το 30-40 % των ασθενών (**Πίνακας 1.1**).<sup>2</sup>

Συνεπώς, η αναζήτηση νέων θεραπευτικών μέσων που θα παρουσιάζουν λιγότερες παρενέργειες και θα οδηγούν σε αποτελεσματικότερο γλυκαιμικό έλεγχο καθίσταται όχι μόνο δελεαστική αλλά και αναγκαία.<sup>6</sup> Το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο 'κλειδί' για τη διάσπαση του γλυκογόνου, αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της αναζήτησης.

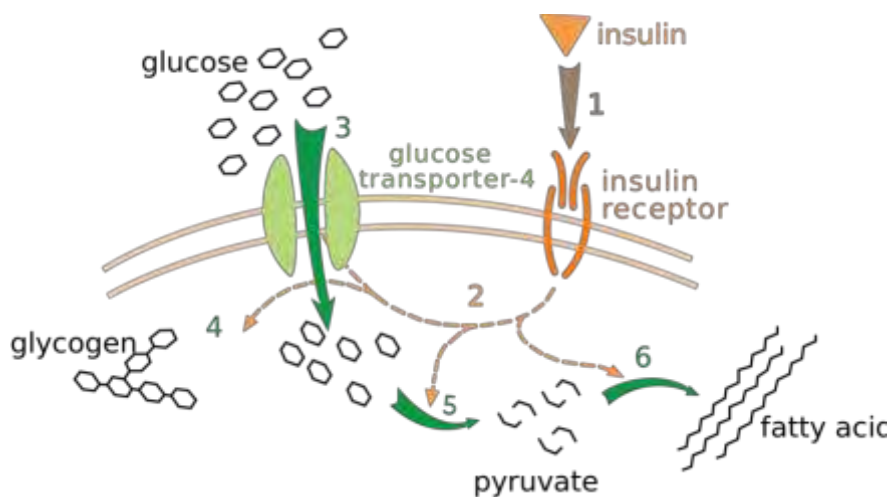
Κατηγορία	Μοριακός στόχος	Περιοχή δράσης	Ανεπιθύμητες παρενέργειες
<b>Ινσουλίνη</b>	Υποδοχέας ινσουλίνης	Ήπαρ, μυς, λιπώδης ιστός	Υπογλυκαιμία, βάρος
<b>Σουλφονουλουρίδες</b>	K <sup>+</sup> ATP κανάλια	Παγκρεατικά β-κύτταρα	Υπογλυκαιμία, βάρος
<b>Διγουανιδίνες (μετμορφίνη)</b>	Άγνωστος	Ήπαρ, (μυς)	Γαστροεντερικές διαταραχές, γαλακτική οξέωση
<b>Acarbose</b>	α-γλυκοζιτάση	Πεπτικό σύστημα	Γαστροεντερικές διαταραχές
<b>Θειαζολιδινεδιόνες</b>	PPARγ	Λιπώδης ιστός, μυς, ήπαρ	Βάρος, οίδημα, αναιμία

**Πίνακας 1.1:** Κατηγορίες υπογλυκαιμικών φαρμάκων, μοριακοί στόχοι, περιοχή δράσης τους και οι κύριες παρενέργειές.<sup>2</sup>

## 1.2 Η ινσουλίνη και ο ρόλος της στην μεταφορά της γλυκόζης

Η διαδικασία της μεταφοράς τη γλυκόζης δια μέσου την κυτταρικής μεμβράνης και η αύξηση της γλυκόλυσης περιλαμβάνει την σύνδεση της γλυκόζης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης και την μετακίνηση της στο κυτταρόπλασμα μέσω των μεταφορέων γλυκόζης (GLUT). Έως τώρα έχουν χαρακτηριστεί 11 είδη μεταφορέων (GLUT1-11), βάση της κατηγορίας του ιστού.<sup>7</sup> Στον μυϊκό και λιπώδη ιστό υπάρχουν κυρίως δύο μεταφορείς, ο GLUT1, υπεύθυνος για την μη ινσουλινοεξαρτώμενη μεταφορά γλυκόζης, και ο GLUT4, υπεύθυνος για την μεταφορά γλυκόζης, παρουσία αυξημένων επιπέδων ινσουλίνης (πχ μεταγευματικά).<sup>8</sup>

Η δράση της ινσουλίνης στην μεταφορά της γλυκόζης είναι καταλυτικής σημασίας καθώς αυξάνει τη πρόσληψη της από τους μύες και τον λιπώδη ιστό, μέσω του GLUT4 ενώ ταυτόχρονα ελαττώνει την παραγωγή γλυκόζης από το συκώτι. Επιπλέον, προάγει τη σύνθεση γλυκογόνου και πρωτεϊνών και παρεμποδίζει τη λιπόλυση, τη γλυκογονόλυση και τη και την πρωτεϊνική αποικοδόμηση.<sup>9</sup>



**Εικόνα 1.2:** Μεταφορά της γλυκόζης μέσω του GLUT4(μεταφορέας γλυκόζης) μετά από ενεργοποίηση του ινσουλινο-υποδοχέα.

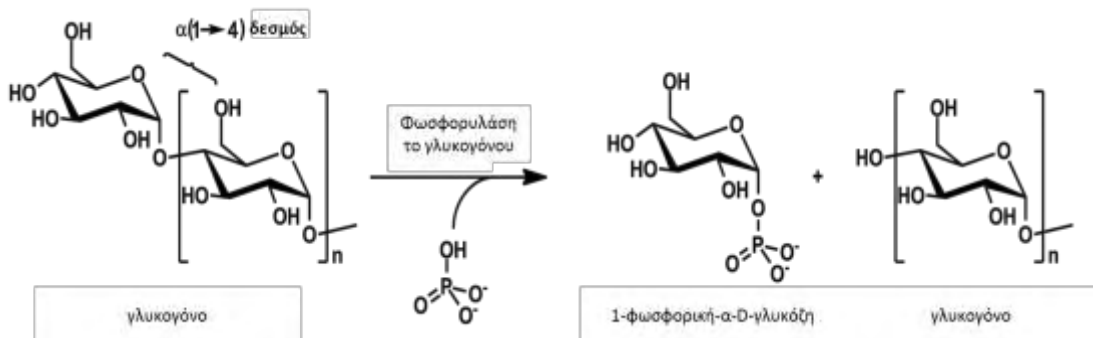
### 1.3 Η οικογένεια των φωσφορυλασών του γλυκογόνου

Τα ισoenζυμα της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (1,4  $\alpha$ -D-glucan: orthophosphate  $\alpha$ -D-glucosyltransferase, E.C.2.4.1.1) παίζουν κεντρικό ρόλο στην κινητοποίηση των αποθηκευμένων υδρογονανθράκων σε έναν μεγάλο αριθμό οργανισμών και ιστών. Το πιο καλά μελετημένο ισoenζυμο της φωσφορυλάσης είναι αυτό του σκελετικού μυ του κουνελιού. Αυτό το ένζυμο ανακαλύφθηκε το 1936 και εν συνεχεία το 1938 αποδείχθηκε ότι η δραστηριότητα του εξαρτάται άμεσα από την παρουσία του AMP. Το 1943 αποδείχθηκε ότι η εναλλαγή μεταξύ ενεργούς και ανενεργούς κατάστασης του ενζύμου πραγματοποιείται μέσω ενός ομοιοπολικού μηχανισμού. Τα ένζυμα, κινάση της φωσφορυλάσης  $\beta$  και φωσφατάση της φωσφορυλάσης, που καταλύουν αυτή την φωσφορυλίωση/αποσφωσφορυλίωση ανακαλύφθηκαν πολύ αργότερα το 1955. Η κρυσταλλική δομή της ανενεργούς φωσφορυλάσης  $\beta$  σε ευκρίνεια 6 Å δημοσιεύθηκε το 1974 και ακολούθησε η δομή της φωσφορυλάσης  $\alpha$  σε ευκρίνεια 3 Å το 1976. Η ατομικής ευκρίνειας δομές των ενζύμων  $\alpha$  και  $\beta$  είναι πλέον διαθέσιμες και η μεταξύ τους σύγκριση αποκάλυψε τον ρόλο αυτής της ομοιοπολικής φωσφορυλίωσης. Η έρευνα πάνω στην φωσφορυλάση του γλυκογόνου συνεχίστηκε σε τέτοιο βαθμό, ώστε έχει χαρακτηριστεί μία από τις πιο καλά μελετημένες πρωτεΐνες της ιστορίας.

### 1.4 1.3 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου, ένας μοριακός στόχος για τον ΣΔΤ II

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP), (EC 2.4.1.1; MW:~97500Da; 842 αμινοξέα), αποτελεί ένα από τα κύρια ένζυμα του μονοπατιού της γλυκογονόλυσης και καταλύει την σταδιακή διάσπαση του γλυκογόνου σε γλυκόζη (**Εικόνα 1.3**).<sup>3,10</sup> Το ένζυμο απαντάται ως διμερές σε δύο μορφές, την φωσφορυλιωμένη α (GPα, υψηλή δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα, επικρατέστερη η ενεργή R 'χαλαρή' κατάσταση) και την αποφωσφορυλιωμένη β (GPβ, χαμηλή δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα, επικρατέστερη η ανενεργή T 'τεταμένη' κατάσταση). Οι κρυσταλλικές δομές των T και R καταστάσεων της GP έχουν προσδιορισθεί. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν αποκαλύψει τις δομικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την ενεργοποίηση του ενζύμου στον μυ και την μετάβαση από την T στην R κατάσταση μέσω φωσφορυλίωσης ή παρουσία AMP.<sup>11-13</sup> Η GP είναι ένα τυπικό αλλοστερικό ένζυμο και διαθέτει 5 περιοχές σύνδεσης:

**Εικόνα 1.3:** Η δράση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.

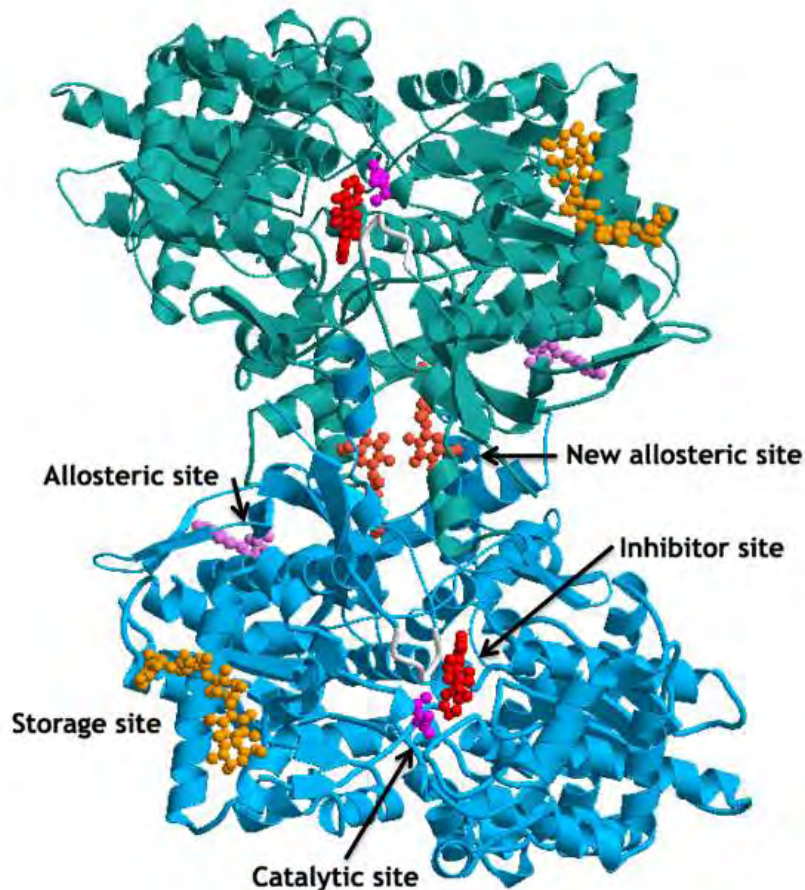


το καταλυτικό κέντρο, το κέντρο πρόσδεσης αναστολέα, το αλλοστερικό, το νέο αλλοστερικό και το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου (**Εικόνα 1.4**).

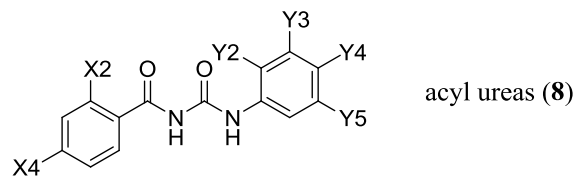
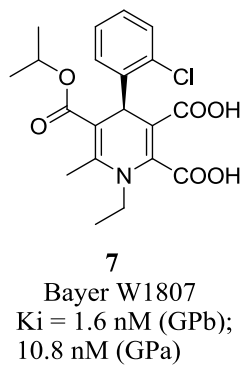
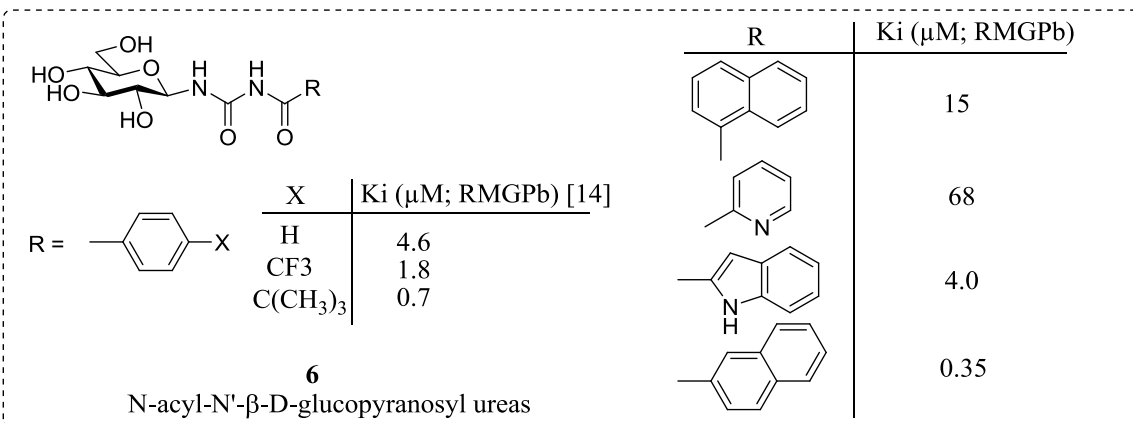
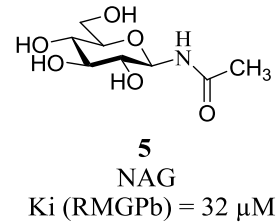
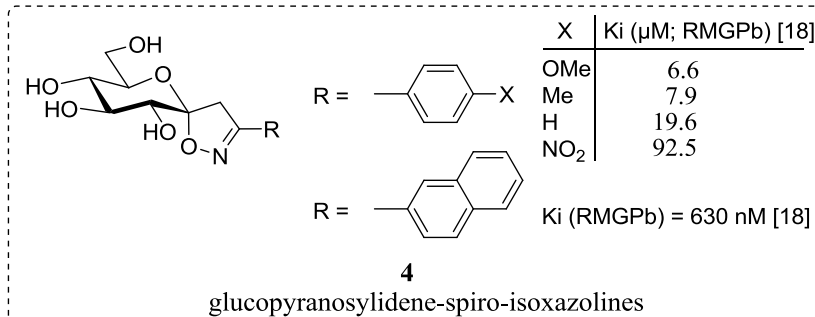
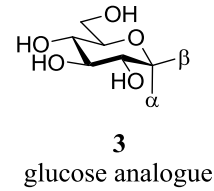
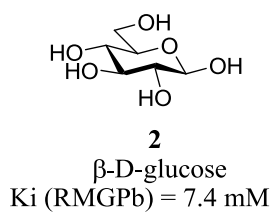
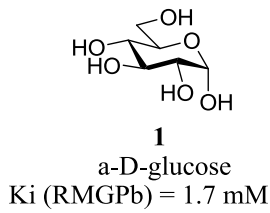
Ο σχεδιασμός αποτελεσματικών αναστολέων για την GP απαιτεί γνώση των χαρακτηριστικών της κάθε περιοχής πρόσδεσης, πιο συγκεκριμένα, τα αμινοξέα-κλειδιά, την ευελιξία της κάθε περιοχής, την πρόσβαση του διαλύτη και τον βαθμό υδροφοβικότητας.

Το καταλυτικό κέντρο της GP περιέχει τον συμπάραγοντα 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP), ο οποίος εσωκλείεται στο κέντρο της κάθε υπομονάδας (**Εικόνα 1.4**). Η πρόσβαση του διαλύτη επιτυγχάνεται δια μέσου ενός καναλιού μήκους 15 Å. Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου προάγουν την T διαμόρφωση (λιγότερο ενεργή) μέσω της σταθεροποίησης της κλειστής διαμόρφωσης του βρόχου 280s (αμινοξέα 282-287), εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσβαση του υποστρώματος στο καταλυτικό κέντρο (**Εικόνα 1.4**). Η α-D-γλυκόζη (**Εικόνα 1.5**)

είναι ο φυσιολογικός αναστολέας του καταλυτικού κέντρου της GPb με σταθερά αναστολής  $K_i$  1.7 mM ενώ η β-D-γλυκόζη (Εικόνα 1.5) προσδέεται με  $K_i$  7.4 mM.



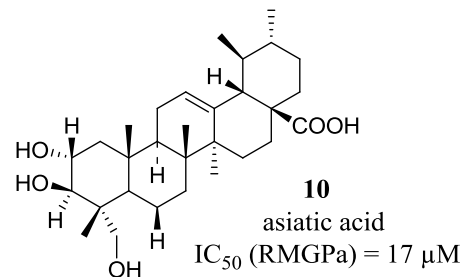
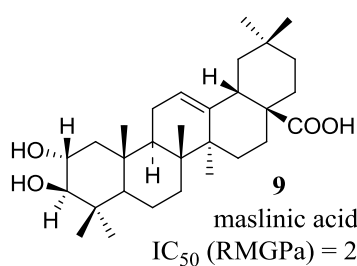
**Εικόνα 1.4:** Σχηματική αναπαράσταση του διμερούς της μυϊκής GPb (απομόνωση από μυ κουνελιού). Απεικονίζονται το καταλυτικό κέντρο, το αλλοστερικό, το κέντρο αναστολής, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου και το νέο αλλοστερικό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο, το οποίο βρίσκεται στο κέντρο κάθε υπομονάδας, φαίνεται η γλυκόζη (μωβ), η οποία λειτουργεί ως συναγωνιστικός αναστολέας, που ευνοεί τη λιγότερο ενεργή T διαμόρφωση μέσω σταθεροποίησης της κλειστής διαμόρφωσης του βρόχου 280 (280s loop) (λευκό). Στο καταλυτικό κέντρο συμπεριλαμβάνεται επίσης ο συμπαραγόντας 5'-φωσφορική-πυριδοξάλη, ο οποίος δεν απεικονίζεται στην παρούσα εικόνα. Στο αλλοστερικό κέντρο, το οποίο προσδέει τον ενεργοποιητή μονοφωσφορική-αδενοσίνη (AMP), άλλα φωσφορυλιωμένα μόρια, όπως την τριφωσφορική-αδενοσίνη (ATP) και την 6-φωσφορική-γλυκόζη απεικονίζεται η ένωση της Bayer, W1807 (ανοιχτό μωβ). Στο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην διεπιφάνεια των δύο υπομονάδων σε απόσταση περίπου 30 Å από το καταλυτικό κέντρο. Το κέντρο αναστολής, το οποίο στην T διαμόρφωση εμποδίζει την είσοδο στο καταλυτικό κέντρο, προσδέει πουρίνες, όπως η καφεΐνη, νουκλεοσίδια ή νουκλεοτίδια σε υψηλές συγκεντρώσεις και την φλαβοπυριδόλη (κόκκινο). Το κέντρο αναστολής βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου περίπου 12 Å από το καταλυτικό κέντρο. Το νέο αλλοστερικό κέντρο βρίσκεται στην κοιλότητα που σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση των δύο υπομονάδων σε απόσταση περίπου 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Στην εικόνα φαίνεται προσδεμένη η ένωση CP320626 (ανοιχτό κόκκινο). Στο κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου φαίνεται προσδεμένη η μαλτοπενταόζη (πορτοκαλί).



**8a:** X<sub>2</sub>=Y<sub>3</sub>=Cl; Y<sub>4</sub>=O(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH; X<sub>4</sub>=Y<sub>2</sub>=Y<sub>5</sub>=H  
 IC<sub>50</sub> (HLGPa) = 2 μM; IC<sub>50</sub> (RMGPb) = 2.2 μM

**8b:** X<sub>2</sub>=Cl; X<sub>4</sub>=F; Y<sub>2</sub>=OMe; Y<sub>3</sub>=Y<sub>4</sub>=H; Y<sub>5</sub>=OH  
 IC<sub>50</sub> (HLGPa) = 23 nM [26]

**8c:** X<sub>2</sub>=Cl; X<sub>4</sub>=X<sub>5</sub>=F; Y<sub>2</sub>=OMe; Y<sub>3</sub>=Y<sub>4</sub>=H; Y<sub>5</sub>=NHCONHMe  
 IC<sub>50</sub> (HLGPa) = 53 nM [26]



Εικόνα 1.5: Αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου<sup>10</sup>

Ο σχεδιασμός αναστολέων για το καταλυτικό κέντρο αρχικά βασίστηκε σε γλυκοζιτικά ανάλογα (**Εικόνα 1.5**) με α- και β-υποκαταστάσεις στο ανωμερές C1 άτομο.<sup>4,10,14,15</sup> Σκοπός των β-υποκαταστάσεων είναι η αξιοποίηση της υποπεριοχής του καταλυτικού κέντρου, γνωστή ως β-κοιλότητα. Η β-κοιλότητα είναι μία περιοχή πολικών και μη-πολικών ομάδων που παρέχει χώρο για τις β-1-C ομάδες των γλυκοζιτικών αναλόγων. Ο αναστολέας γλυκοκυρανοζυλιδενο-σπιρο-οξαζολίνη (R=naphtyl) είναι ένας από τους πιο ισχυρούς αναστολείς που έχουν βρεθεί έως σήμερα με  $K_i$  630 nM.<sup>16</sup> Μια αλληλεπίδραση, που συχνά επιζητάτε κατά τον σχεδιασμό προσδετών για τη φωσφορυλάση είναι ο δεσμός υδρογόνου με το καρβονυλικό οξυγόνο της κύριας αλυσίδας του αμινοξέος His377. Για παράδειγμα, η ένωση N-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλαμίνη (NAG) (**Εικόνα 1.5**), η οποία σχηματίζει δεσμό υδρογόνου μέσω της αμινομάδας της (NH) προς το οξυγόνο (O) της His377 αναστέλλει το ένζυμο με  $K_i$  32  $\mu$ M,<sup>17</sup> δηλαδή 50 φορές περισσότερο από την α-D-γλυκόζη (**Εικόνα 1.5**) και χωρίς να προκαλούνται δομικές μεταβολές στο ενεργό κέντρο σε σχέση με το σύμπλοκο φωσφορυλάσης – α-D-γλυκόζης. Τα αμινοξικά κατάλοιπα του βρόχου 280s (αμινοξέα 282–287) παρουσιάζουν την ίδια διαμόρφωση όπως σε αυτή του συμπλόκου φωσφορυλάσης – α-D-γλυκόζης.

Μερικοί αναστολείς (για παράδειγμα, οι N-ακυλ-N'-β-D-γλυκοκυρανοζυλουρίες)<sup>4,15</sup> (**Εικόνα 1.5**) κατά την πρόσδεση τους στο καταλυτικό κέντρο προκαλούν μετατόπιση του βρόχου 280s, η οποία (ανάλογα με τον βαθμό στον οποίο συμβαίνει) πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε μελέτες μοντελοποίησης (*vide infra*).

Οι δύο διαφορετικές διαμορφώσεις της Asn284,<sup>18</sup> η θέση της φωσφορικής ομάδας της PLP,<sup>18</sup> η διαμόρφωση της καρβοξυλομάδας της κύριας αλυσίδας της Asp283,<sup>18,19</sup> ο προσανατολισμός της Ser674 και της His377<sup>18</sup> έχει δειχθεί από κρυσταλλογραφικές δομές ότι επηρεάζονται από τη σύνδεση με τον αναστολέα. Άλλες τέτοιες σημαντικές δομικές μεταβολές, που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά είναι στα αμινοξέα Ala673-Thr676, τον βρόχο 280s και τον βρόχο 380 (αμινοξέα 377-384).

## 2. Ο σχεδιασμός φαρμάκων

### 2.1 Αναδρομή στο σχεδιασμό φαρμάκων

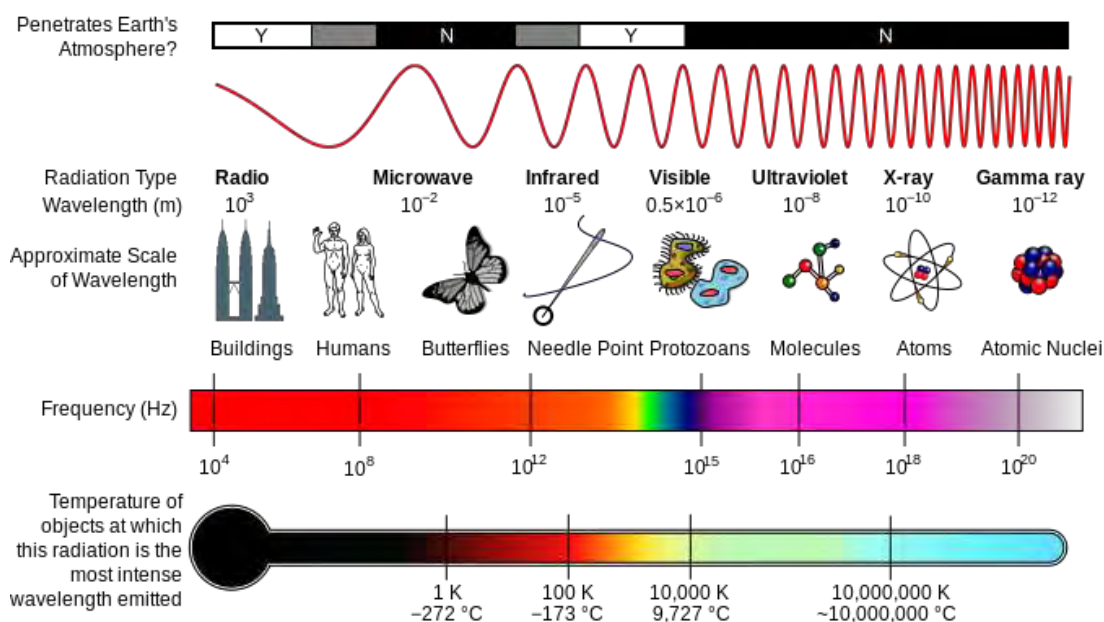
Ιστορικά, ενδογενείς βιο-δραστικοί προσδέτες είχαν ανιχνευθεί πολύ πριν απομονωθεί και χαρακτηριστεί η δομή του συγγενούς τους βιομοριακού υποδοχέα.<sup>20,21</sup> Η πρωταρχική γνώση σε δομές προσδετών υπήρξε φτωχή σε σύγκριση με τις λεπτομέρειες που παρείχε στην πορεία η πειραματική χημεία και οι υπολογιστικές κυματο-συναρτήσεις. Εντούτοις η αρχική αυτή γνώση απεδείχθη επαρκής σε αρκετές περιπτώσεις στην εξαγωγή συμπερασμάτων και στην ανάπτυξη υποθέσεων για την φυσιολογική σημασία αυτών των προσδετών ακόμα και όταν οι φυσιολογικοί μηχανισμοί παρέμεναν άγνωστοι. Η εξαγωγή των στεροειδών ορμονών από χολικά οξέα στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα αποτελεί ένα τέτοιο εμβληματικό παράδειγμα. Στις δεκαετίες του 1920 και 1930 πολλά βραβεία Nobel δόθηκαν για τις ανακαλύψεις στεροειδών, τα οποία είχαν συνδεθεί με την διαδικασία της οξειδωσης στα κύτταρα, τις βιταμίνες, την ανάπτυξη της σεξουαλικότητας και την εγκυμοσύνη.<sup>22</sup> Σημαντικές προσπάθειες κατεβλήθησαν στην χρήση εμπειρικών μεθόδων, που βασιζόνταν στην πυρολυτική διάσπαση των χημικών δομών ώστε να βρεθεί ο τρόπος με τον οποίο οι δακτύλιοι των στεροειδών διευθετούνταν μεταξύ τους.

Το 1932, η έλευση των ακτίνων Χ υπήρξε καθοριστικής σημασίας στην αποκάλυψη της διευθέτησης των ατόμων, που συνθέτουν τα στεροειδή στις τρεις διαστάσεις, την ακριβή τους θέση και την στερεοχημεία των υποκαταστατών (**Εικόνα 2.1**). Ο συνδυασμός των δομικών χαρακτηριστικών των στεροειδικών προσδετών με την βιοχημική γνώση έδειξε πως η ποικιλομορφία στις χημικές ομάδες των υποκαταστατών μπορεί να σχετίζεται με συγκεκριμένες βιολογικές δράσεις, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάπτυξη νέων φαρμάκων.<sup>22,23</sup>

Στις μέρες μας, η ανακάλυψη νέων φαρμάκων βασίζεται στην χρήση βιολογικών στόχων, γενετικών μελετών, διαγονιδιακών ζώων, μοριακής βιολογίας, γονιδιακής τεχνολογίας και των πρωτεϊνών. Συνεπώς, η γνώση της δομής του βιομοριακού στόχου είναι υψίστης σημασίας. Με την βοήθεια των συγχροτρονικών εγκαταστάσεων και την χρήση υπολογιστών υψηλής ταχύτητας οι σχεδιαστές φαρμάκων μπορούν πλέον να οπτικοποιήσουν τα σύμπλοκα των προσδετών με τον στόχο τους παρέχοντας κατά αυτόν τον τρόπο μια πληθώρα πληροφοριών σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις που συμμετέχουν στην πρόσδεση (ελκτικο-απωθητικές δυνάμεις Van der Waals, δεσμοί υδρογόνου, γέφυρες άλατος, και την διαμεσολάβηση μορίων νερού και ιόντων).



Πολυάριθμες υπολογιστικές μέθοδοι (αγκυροβόλιση υποκαταστατών σε πρωτεΐνες, μοριακές προσομοιώσεις, *de novo* σχεδιασμός) έχουν επινοηθεί για την αξιολόγηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-προσδέτη. Παρά την ύπαρξη πολλών διαθέσιμων κρυσταλλογραφικών δομών υποδοχών σε συγκρυστάλλωση με τους προσδέτες τους, καθώς και πολλών υπολογιστικών μεθόδων με σύνθετο λογισμικό μοριακής μοντελοποίησης, μόνο ένα μέρος της φυσικής πραγματικότητας μπορεί να απεικονισθεί αφήνοντας έτσι ερωτηματικά για την αξιοπιστία αυτού του επιστημονικού πεδίου.<sup>24,25</sup> Παραδείγματος χάριν, η θερμοδυναμική του συμπλόκου προσδέτη-υποδοχέα δεν μπορεί απλώς να αναπαρασταθεί από τον υπολογισμό μόνο των κοντινών αλληλεπιδράσεων, κάτι το οποίο δυσχεραίνει τις επιστημονικές προσπάθειες προς τον αποτελεσματικό σχεδιασμό φαρμάκων.<sup>24,25</sup>



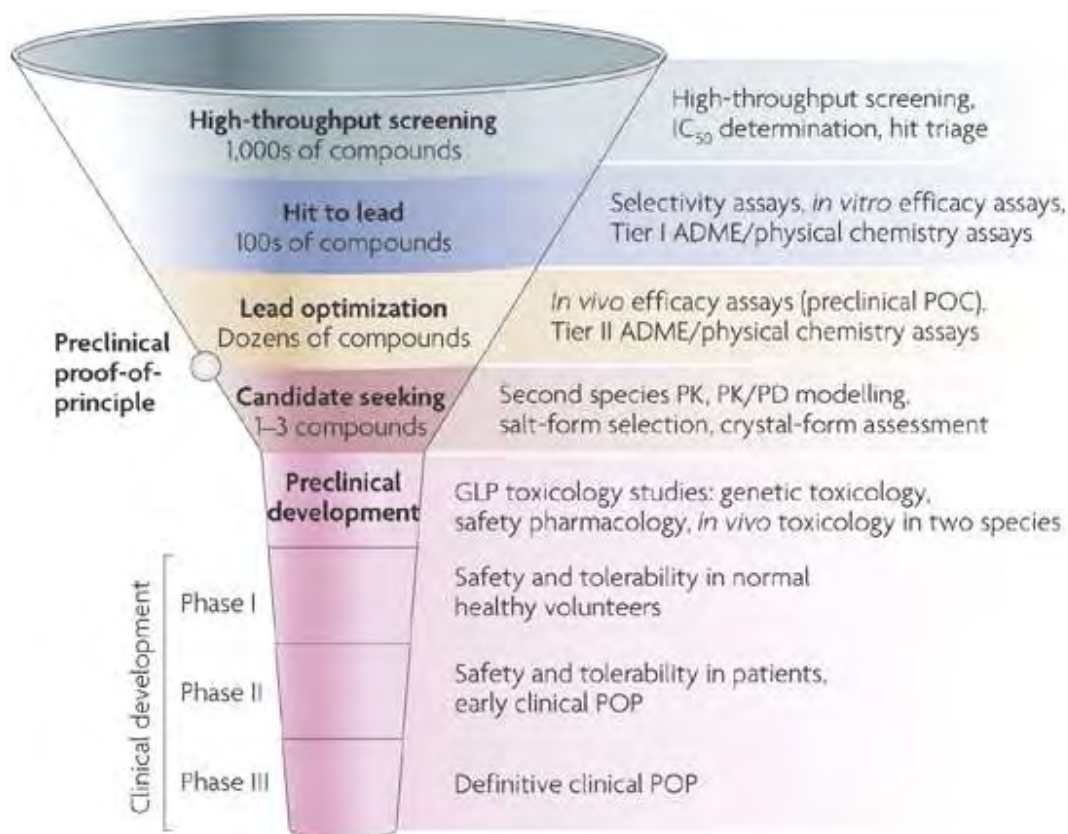
**Εικόνα 2.1:** Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα και οι ακτίνες X, η έλευση των οποίων υπήρξε καθοριστικής σημασίας στην αποκάλυψη της διευθέτησης των ατόμων.

## 2.2 Ο σχεδιασμός φαρμάκων σήμερα

Υπάρχουν άραγε περισσότερα αστέρια στο σύμπαν από ότι οργανικά μόρια με μοριακό βάρος  $< 600$ ; Η πρόταση των αστροφυσικών είναι ότι υπάρχουν περίπου  $10^{23}$  αστέρια σε  $10^{11}$  γαλαξίες.<sup>26</sup> Παράλληλα, ο αριθμός των υποκαταστατών που μπορούν να υπάρξουν αποτέλεσε αντικείμενο πολλών εκτιμήσεων.<sup>27,28</sup> Αυτό που δυσχεραίνει το να δοθεί μια απάντηση σε αυτό το ερώτημα είναι το ότι όλες οι χημικά επιθυμητές μοριακές δομές δεν είναι και συνθετικά προσβάσιμες ή οικονομικά ανεκτές. Εντούτοις, τα ως τώρα στοιχεία υποδεικνύουν έναν αριθμό

ανάλογο με αυτόν που έχει προταθεί για τα αστέρια. Ούτε το σύμπαν ούτε το σύνολο των πιθανών προσδετών μπορεί να εξερευνηθεί συστηματικά.

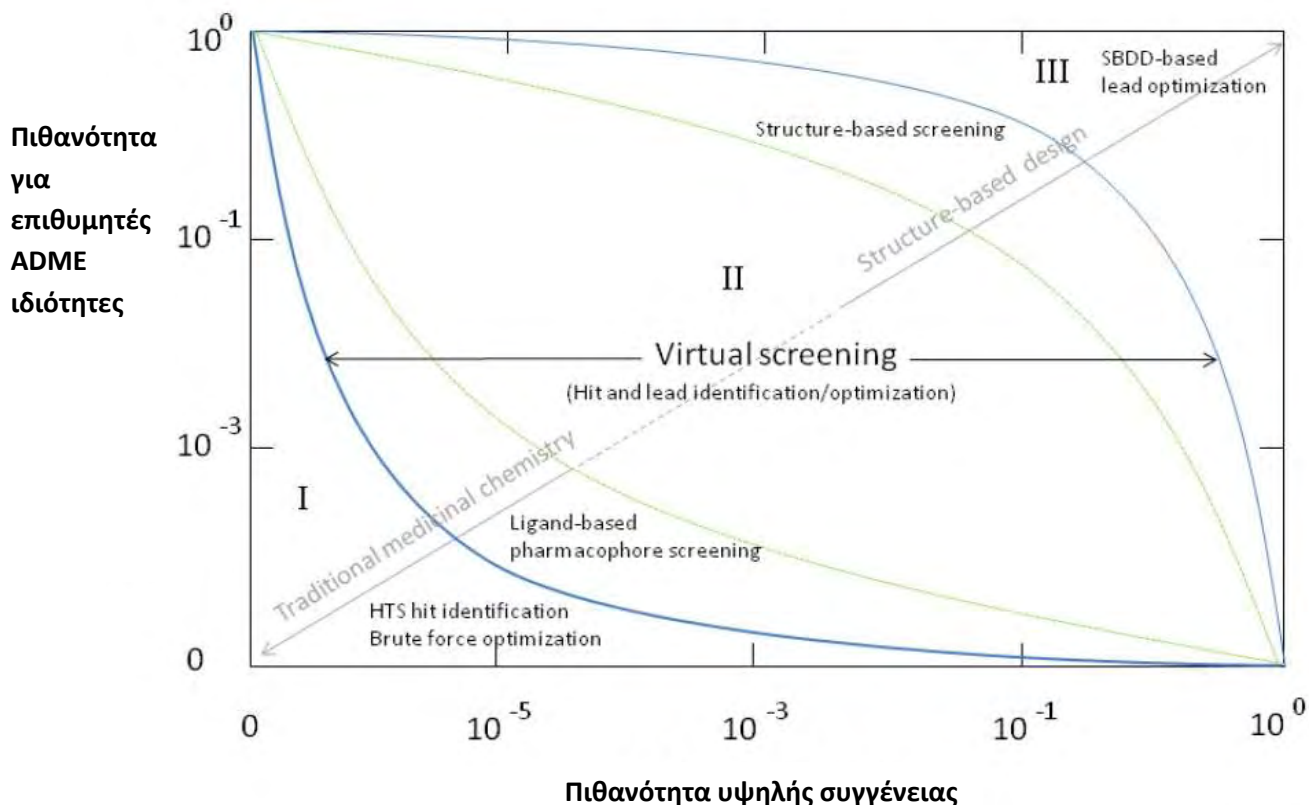
Το σύμπαν υποδεικνύει ότι μπορεί να υπάρχουν εξωγήινοι πολιτισμοί, αλλά οι πιθανότητες για ένα διαστημόπλοιο που ταξιδεύει για αιώνες με την ταχύτητα του φωτός να συναντήσει έναν από αυτούς παραμένουν μηδαμινές, μια λεπτομέρεια που οι περισσότεροι λάτρεις της επιστημονικής φαντασίας αγνοούν. Μια παρόμοια πρόκληση αντιμετωπίζει η φαρμακευτική βιομηχανία με την διαλογή υψηλής απόδοσης (HTS, *high throughput screening*), που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανίχνευση ενώσεων-προσδετών.<sup>29</sup> Με άλλα λόγια, οι ενώσεις που προκύπτουν έπειτα από τους τυπικούς γύρους βελτιστοποίησης από τη διαλογή υψηλής απόδοσης (HTS) είναι συχνά δύσκολο να μετατραπούν σε φαρμακευτικά σκευάσματα (**Εικόνα 2.2**).



**Εικόνα 2.2:** : Τυπική αναπαράσταση της διαδικασίας ανακάλυψης φαρμάκων.

Η βελτιστοποίηση της συγγένειας προσδέτη-υποδοχέα με κλασικές τεχνικές ιατρικής χημείας συνήθως οδηγεί σε κακές ADME ιδιότητες.<sup>30</sup> Την ίδια στιγμή ο αριθμός των προσδετών που προκύπτει είναι περιορισμένος, χωρίς σημαντική διαφοροποίηση και το πιο σημαντικό η HTS δεν παρέχει πληροφορίες για τις

### Διάγραμμα ανεύρεσης προ-κλινικών φαρμάκων



**Εικόνα 2.3:** Ιδανική περιγραφή του πεδίου πιθανοτήτων της διαδικασίας ανεύρεσης προ-κλινικών φαρμάκων. Η ανίχνευση ενώσεων με χαμηλή μέτρια συγγένεια μέχρι και την βελτιστοποίηση τους σε υψηλής συγγένειας σε συνάρτηση με τις επιθυμητές ADME ιδιότητες, δύο ανεξάρτητες (ορθογώνιες) διαστάσεις που δεν μπορεί να βελτιστοποιηθούν εύκολα ξεχωριστά. Οι προσδέτες που προκύπτουν μέσω της διαλογής υψηλής απόδοσης δεν έχουν πάντα και τις επιθυμητές ADME ιδιότητες. Αυτή η κατάσταση οδηγεί σε χαμηλή πιθανότητα επιτυχίας και απεικονίζεται στο κάτω μέρος του διαγράμματος (περιοχή I). Διαφυγή από τη ζώνη αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τη βοήθεια μιας ευρείας ποικιλίας των εικονικών μεθόδων διαλογής που περιλαμβάνει τεχνικές φαρμακοφόρων και τις τεχνικές που βασίζονται στη δομή (περιοχή II). Τελικά, οι κατευθυνόμενες από την δομή τεχνικές μπορούν να οδηγήσουν τους σχεδιαστές φαρμάκων προς την αποδοτική περιοχή (III) του διαγράμματος. Οι τάξεις μεγέθους για τις πιθανότητες είναι μόνο μια πρόχειρη εκτίμηση και τα όρια μεταξύ των περιοχών είναι σχηματικά.

αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα, αποκλείοντας έτσι την αποτελεσματική βελτιστοποίηση (Εικόνα 2.3).

Η βελτιστοποιημένη συλλογή προσδετών που προκύπτει τείνει να αντιπροσωπεύει ότι είναι διαθέσιμο στον εκάστοτε οργανισμό, το οποίο τελικά δεν είναι το αποτέλεσμα μορφολογικής επιλογής χημειούτυπων. Επιπλέον, στην HTS ευνοείται η ποσότητα και όχι η ποιότητα κάτι που οδηγεί σε μεγάλο όγκο δεδομένων αμφίβολης ποιότητας, που απαιτεί πολύ χρόνο και προσπάθεια για να αναλυθεί. Κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι οι τεράστιοι πόροι που έχουν επενδυθεί στην HTS θα μπορούσαν να έχουν χρησιμοποιηθεί πιο παραγωγικά ώστε να προσδιοριστεί ο τρόπος που αλληλεπιδρούν οι προσδέτες με το στόχο τους και να είναι κατ'επέκταση αποτελεσματική και η βελτιστοποίηση τους.

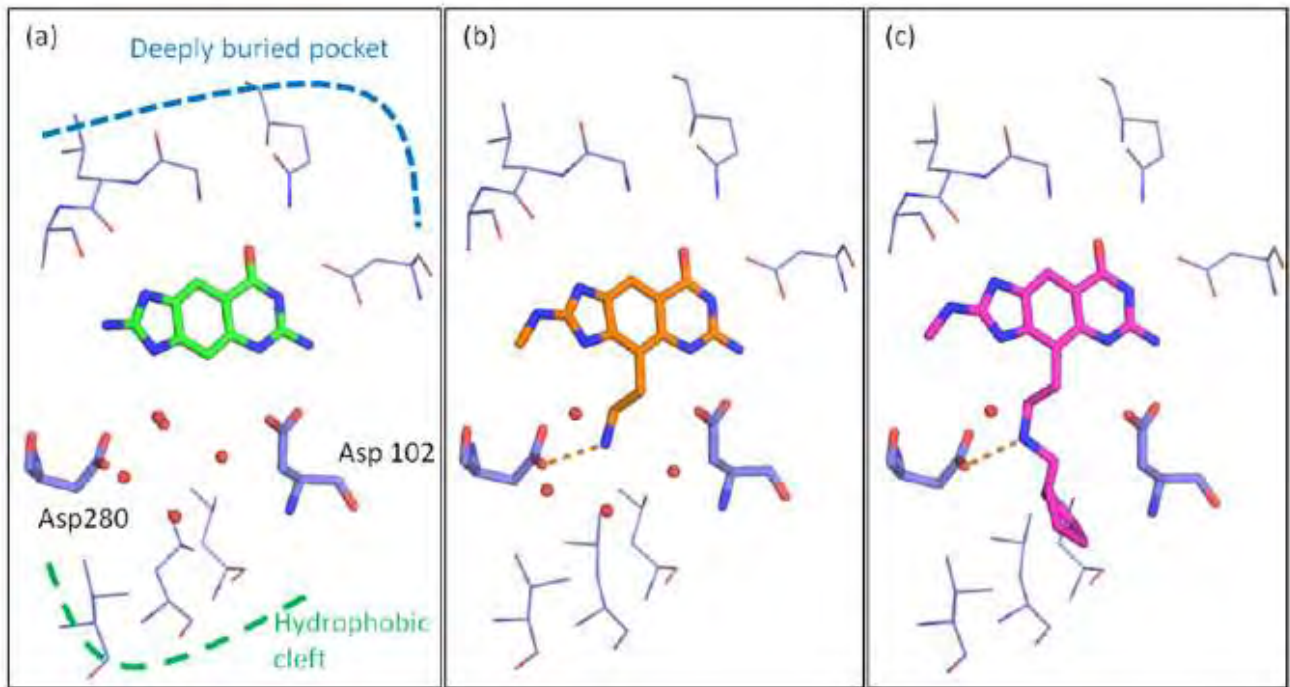
Σε απάντηση αυτής της τοποθέτησης πολλές ερευνητικές ομάδες αφιέρωσαν τις προσπάθειες τους στον κατευθυνόμενο από την δομή σχεδιασμό φαρμάκων (SBDD) και στην σάρωση βιβλιοθηκών μικρών ενώσεων (VLS), δύο πολλά υποσχόμενες προσεγγίσεις για την ανίχνευση προσδετών για φαρμακευτικούς στόχους.<sup>31,32</sup> Ο SBDD ρίχνει φώς στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεΐνης-προσδέτη δίνοντας έτσι την δυνατότητα στους ιατρικούς χημικούς να τροποποιούν τους προσδέτες με υψηλή ακρίβεια, από την άλλη μεριά η δύναμη και η ευελιξία του VLS βασίζεται στο ότι οι ενώσεις μπορούν να φιλτραριστούν με οποιοδήποτε κριτήρια που μπορούν να εκφραστούν με όρους μοριακών ιδιοτήτων (φαρμακοφόρα ή / και φυσικοχημικοί δείκτες). Τα προγράμματα αγκυροβόλησης μικρών ενώσεων χρησιμοποιούνται για το φιλτράρισμα βιβλιοθηκών μικρών ενώσεων.<sup>33</sup>

Η έλλειψη αξιόπιστων συναρτήσεων βαθμονόμησης σε ετερογενείς χημικές κατηγορίες και η συχνή αδυναμία να προβλεφθεί σωστά ο τρόπος πρόσδεσης έχει δημιουργήσει αμφιβολίες για την χρήση των προγραμμάτων αγκυροβόλησης ως μέθοδοι σάρωσης βιβλιοθηκών. Εντούτοις ο συνδυασμός του VLS με τον SBDD και με τα προγράμματα αγκυροβόλησης μπορεί να οδηγήσει σε πολύ καλύτερα αποτελέσματα. Ο SBDD έχει διακριτά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις κλασικές βασιζόμενες στον προσδέτη τεχνικές όπως είναι το πεδίο συγκριτικής μοριακής ανάλυσης (CoMFA) και οι βασιζόμενες στα φαρμακοφόρα τεχνικές.<sup>34</sup> Ένα άλλο βασικό πλεονέκτημα είναι ότι οι υπολογιστικές βιβλιοθήκες μπορούν να περιλαμβάνουν ήδη υπάρχουσες ενώσεις, καθώς και ενώσεις που δεν έχουν συντεθεί ακόμα, αλλά είναι χημικώς συναφείς.

Ο SBDD μπορεί να θεωρηθεί ένα βασικό κομμάτι περισσότερο των ορθολογικών τεχνικών διαλογής του HTS. Για παράδειγμα, ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση θραύσματα/fragment-based drug design (FBDD) έχει αναδειχθεί ως ένα πολύ ισχυρό μέσο για να αυξήσει τα ποσοστά επιτυχίας από το HTS με την αξιοποίηση μοριακών θραυσμάτων με μοριακό βάρος <150-250.<sup>35</sup> Αυτά τα θραύσματα μπορούν να επιλεχθούν με βάση φυσικο-χημικές ιδιότητες, συλλέγονται από βιβλιοθήκες και χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες που προκύπτουν από τον SBDD, ανασυναρμολογούνται σε μεγαλύτερα μόρια με βελτιωμένα χαρακτηριστικά(**Εικόνα 2.4**).<sup>36-38</sup>

Ο SBDD μπορεί να αποκαλύψει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις σχέσεις δομής-δραστικότητας μιας σειράς χημικών ενώσεων, ειδικά στην φάση της βελτιστοποίησης, όπου τροποποιήσεις υψηλής ακρίβειας απαιτούνται για την απόκτηση καλών ADME ιδιοτήτων διατηρώντας παράλληλα ισχυρή δέσμευση με την πρωτεΐνη-στόχο. Η επιλογή της πρωτεΐνης-στόχου είναι ένα άλλο θέμα, όπου ο SBDD είναι ζωτικής σημασίας, ωστόσο, απαιτείται να είναι διαθέσιμη η κρυσταλλογραφική δομή για τον φαρμακευτική στόχο, ή ένα έγκυρο μοντέλο που

έχει δημιουργηθεί μέσω ομολογίας. Η γνώση της δομής του στόχου παίζει καθοριστικό ρόλο εφόσον παρέχει πληροφορίες για το μέγιστο δυνατό όγκο που ο προσδέτης μπορεί να καταλάβει, το προσανατολισμό του και υδρόφοβες ή / και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις που μπορούν να λάβουν χώρα.



**Εικόνα 2.4:** Παράδειγμα του SBDD στην αντικατάσταση διατεταγμένων (ακίνητοποιημένων) μορίων νερού στο ενεργό κέντρο ενός ενζύμου.

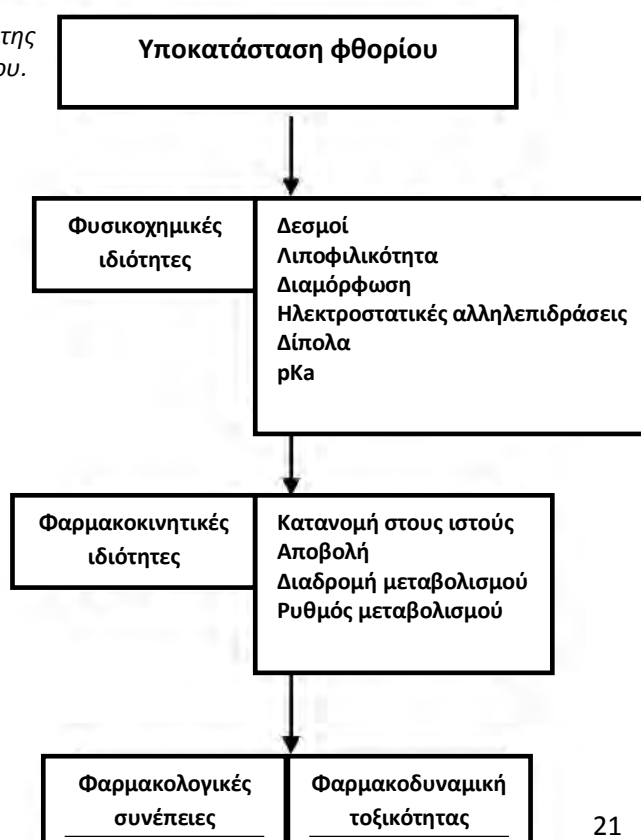
### 3. Φαρμακευτικές ενώσεις με φθόριο

#### 3.1 Γενικά

Η ενσωμάτωση του φθορίου έχει φανεί να είναι μείζονος σημασίας μιας και η προσθήκη του σε μια ένωση μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις χημικές ιδιότητες του φαρμάκου, την κατανομή, την απέκκριση και τον μεταβολισμό του. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν ιδιαίτερως δελεαστικές τις φθοριούχες ενώσεις με άμεσο αποτέλεσμα την ευρεία χρήση τους στις μέρες μας για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως η μαλάρια, ως αντικαταθλιπτικά, αντιφλεγμονώδη, αντιψυχωτικά αντι-ιικά, στεροειδή και γενικά αναισθητικά<sup>39</sup>. Η χημεία και η ιατρική χημεία των φθορο-οργανικών ενώσεων έχει ήδη μελετηθεί εκτενώς<sup>40-43</sup>. Η ανάπτυξη νέων φθοριούχων παραγόντων έδωσε τη δυνατότητα σύνθεσης νέων φθοριούχων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Επιπλέον, η ανάπτυξη 'εκλεπτυσμένων' αναλυτικών τεχνικών που βασίζονται στο φθόριο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και την τοπογραφία εκπομπής ποζιτρονίων έχει μεταφέρει τη μελέτη των φθοριούχων φαρμάκων στον άνθρωπο και τα ζώα<sup>44-46</sup>.

Η ένταξη ενός ατόμου φθορίου σε ένα φάρμακο μπορεί να επηρεάσει τόσο την διάθεση του φαρμάκου, όπως έχει ήδη αναφερθεί, όσο και την αλληλεπίδραση του φαρμάκου με τον στόχο του (**Εικόνα 3.1**). Για παράδειγμα, η υποκατάσταση με ένα άτομο φθορίου έχει δειχθεί να επηρεάζει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις με τέτοιο τρόπο ώστε να παρουσιάζεται επιλεκτικότητα στους υπο-τύπους των

**Εικόνα 3.1:** Διάγραμμα αναπαράστασης της επίδρασης μετά από υποκατάσταση φθορίου.



χολινεργικών και αδρενεργικών υποδοχέων<sup>47-49</sup>. Συνεπώς, η υποκατάσταση φθορίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί εποικοδομητικά από τους ιατρικούς χημικούς για να βελτιώσουν τόσο την ασφάλεια όσο και την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου.

### 3.2 Φυσικοχημικές ιδιότητες των φθοριούχων φαρμάκων

Η αντικατάσταση ενός ατόμου υδρογόνου ή μιας υδροξυλομάδας με ένα άτομο φθορίου για αλλαγή στη βιολογική λειτουργία αποτελεί μια γνωστή στρατηγική στην ανάπτυξη φαρμάκων. Είναι γνωστό πως η υποκατάσταση ενός ατόμου υδρογόνου με αυτό του φθορίου παρουσιάζει μηδαμινές στερικές αλλαγές στις εκάστοτε περιοχές πρόσδεσης μιας και η ακτίνα van der Waals του φθορίου (1.47Å) είναι μεταξύ αυτής του οξυγόνου (1.57Å) και του υδρογόνου (1.2Å) (Πίνακας 3.1). Παρά το γεγονός ότι το φθόριο έχει μεγαλύτερο μέγεθος από το υδρογόνο, πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι αποτελεί μια καλή επιλογή ως υποκατάστατο υδρογόνου<sup>41</sup>.

Στοιχείο	Ηλεκτραρνητικότητα	Μήκος δεσμού (CH <sub>2</sub> X, Å)	Ακτίνα Van der Waals (Å)	Ενέργεια δεσμού (kcal/mol)
H	2.1	1.09	1.20	99
F	4.0	1.39	1.35	116
O(OH)	3.5	1.43	1.40	85

Πίνακας 3.1: Φυσικοχημικές ιδιότητες του δεσμού άνθρακα-φθορίου.

Πάρα την μικρή διάφορα στο μέγεθος μεταξύ υδρογόνου και φθορίου εμφανίζουν σημαντική διαφορά στην ηλεκτραρνητικότητα. Το φθόριο είναι το πιο ηλεκτραρνητικό στοιχείο του περιοδικού πίνακα (Πίνακας 3.1). Η αλλαγή στην ηλεκτρονιακή κατανομή ενός μορίου, η οποία προκύπτει από την αντικατάσταση ενός ατόμου υδρογόνου με ένα φθόριο, μπορεί να μεταβάλλει την τιμή της pKa, την διπολικότητα, και ακόμα και την χημική δραστηριότητα και σταθερότητα με τις γειτονικές λειτουργικές ομάδες. Το μέγεθος της αλλαγής στις ηλεκτρονιακές ιδιότητες καθορίζεται από τον δεσμό μεταξύ του φθορίου και της εκάστοτε λειτουργικής ομάδας. Συνεπώς, η παρουσία ενός φθορίου σε θέση *ortho* σε σχέση με μία φαινολική ομάδα εμφανίζει μειωμένη pKa της τάξεως του 1.2, ενώ υποκαταστάσεις σε *meta* και *para* θέση έχουν πολύ μικρότερη επίδραση. Η ενσωμάτωση δύο ατόμων φθορίου στις θέσεις 2- και 6- μιας φαινόλης οδηγεί σε μείωση της pKa σε 2.7U. Χάρη σε αυτή την αλλαγή, η 2,6-διφθοροφαινόλη χρησιμοποιήθηκε ως ένας ισοεστέρας του καρβοξυλικού οξέος σε μια σειρά αναστολέων της GABA αμινοτρανσφοράς<sup>50</sup>.



Το φθόριο σχηματίζει έναν δυνατό δεσμό με τον άνθρακα (116 kcal/mol), ο οποίος παρουσιάζει αυξημένη οξειδωτική και θερμική σταθερότητα σε σχέση με αυτόν μεταξύ άνθρακα και υδρογόνου (99 kcal/mol) (**Πίνακας 3.1**). Ο δεσμός άνθρακα-φθορίου είναι ένας από τους ισχυρούς δεσμούς στην χημεία. Επιπλέον, ένα άτομο φθορίου αντιστρέψιμους ηλεκτροστατικούς δεσμούς με συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες.

Ο δεσμός άνθρακα-φθορίου οδηγεί σε ένα ισχυρό δίπολο το οποίο μπορεί να αλληλεπιδρά, είτε θετικά είτε αρνητικά, με άλλα δίπολα. Για παράδειγμα, σε φθοριούχα ανάλογα νοραδρεναλίνης οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενός δακτυλίου του δεσμού άνθρακα-φθορίου με μια υδροξυλομάδα του β-άνθρακα τις πλευρικής αλυσίδας καθορίζει την διαμόρφωση του μορίου, συνεπώς η θέση του φθορίου σ'έναν αρωματικό δακτύλιο μπορεί να καθορίσει την επιλεκτικότητα του υποδοχέα<sup>51</sup>. Το φθόριο παρουσιάζει επίσης μια σειρά ειδικών στερεοηλεκτρικών επιδράσεων, όπως η Anh-Eisenstein επίδραση σταθεροποίησης και η *cis* επίδραση στα διφθοριούχα αλκάνια<sup>41</sup>.

Η παρουσία του φθορίου μπορεί ανάμεσα σε όλα να επηρεάσει και την λιποφιλικότητα ενός μορίου και κατ'επέκταση τον μερισμό του φαρμάκου στις μεμβράνες, ενώ την ίδια στιγμή διευκολύνει και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τις περιοχές πρόσδεσης των στόχων. Η αντικατάσταση ενός μόνο αρωματικού υδρογόνου συνήθως οδηγεί σε μέτρια αύξηση της λιποφιλικότητας ενώ η CF3 ομάδα βρίσκεται ανάμεσα στους πιο λιποφιλείς υποκαταστάτες.

### 3.3 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες φθοριούχων φαρμάκων

Η εισαγωγή ενός ατόμου φθορίου μπορεί να μεταβάλλει τον ρυθμό του μεταβολισμού, την μεταβολική διαδρομή και την κατανομή του φαρμάκου (**Εικόνα 3.1**). Η υποκατάσταση με φθόριο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ώστε να διαφοροποιήσει της τοξικολογικές ιδιότητες ενός φαρμάκου. Οι υποκαταστάσεις με φθόριο είναι προτιμότερες σε θέσεις της μεταβολικής επίθεσης (*metabolic attack*), μιας και ο δεσμός άνθρακα-φθορίου είναι πολύ πιο ισχυρός στην επίθεση του κυτοχρώματος P450 σε σχέση με αυτόν του άνθρακα-υδρογόνου. Εντούτοις, σε πολλές περιπτώσεις, οι υποκαταστάσεις ακόμα και σε θέσεις απομακρυσμένες από αυτές της μεταβολικής επίθεσης, μπορούν να επηρεάσουν εξίσου τον μεταβολισμό του φαρμάκου, είτε με επαγωγικές / συντονισμού επιδράσεις (μέσω των δεσμών) ή μέσω της διαμόρφωσης και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (μέσα στο χώρο)<sup>51,52</sup>.

Οι φαρμακευτικές ενώσεις μεταξύ άλλων πρέπει διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να παραμείνουν σε σημαντικές συγκεντρώσεις ώστε να διατηρήσουν την δραστηριότητα τους. Για παράδειγμα, και στις τρεις κατηγορίες

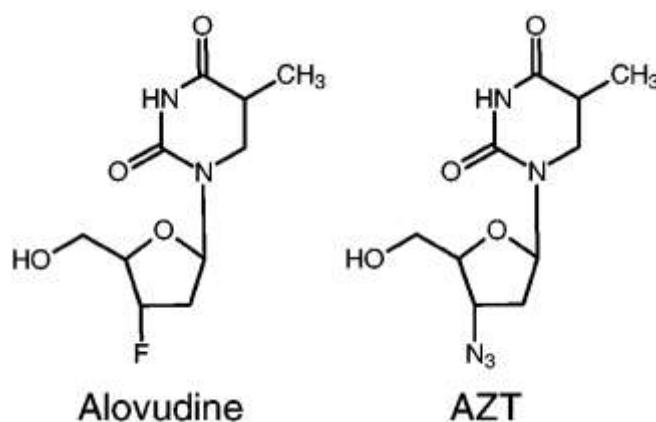


των αντιψυχωτικών φαρμάκων που μπλοκάρουν τους ντοπαμινικούς υποδοχείς του κεντρικού νευρικού συστήματος(CNS), υπάρχουν ενώσεις που περιέχουν μια ομάδα CF<sub>3</sub> ή μια φθορο-φαινυλομάδα. Αυτές οι ομάδες συμβάλλουν στην φαρμακολογική δραστηριότητα των ενώσεων αυτών ενισχύοντας την διείσδυση τους από το CNS και επιβραδύνοντας ταυτόχρονα την μεταβολική αποικοδόμηση τους.

Άλλη κατηγορία φθοριούχων ενώσεων αποτελούν τα φθοριούχα νουκλεοσίδια και νουκλεοτίδια, μια ιδιαίτερως σημαντική ομάδα φαρμακευτικών ενώσεων για την αντιμετώπιση του καρκίνου και του AIDS.

Ένα τέτοιο παράδειγμα ενώσης με υποκατάσταση φθορίου (στην πεντόζη) για την αντιμετώπιση του AIDS αποτελεί το Alovudine [3'-fluorothymidine (FLT)], άμεσο φθοριούχο ανάλογο του zidovudine [3-azidothymidine (AZT)] (**Εικόνα 3.2**). Από την οπτική του μεταβολισμού, έχει δειχθεί ότι το FLT φωσφορυλιώνεται σε σχετικές κυτταρικές σειρές για το 5'-τριφωσφορικό, που είναι ο ενεργός αναστολέας της HIV- αντίστροφης μεταγραφάσης<sup>53</sup>. Επιπλέον, το FLT, όπως και το AZT, μπορεί να δρα ως τερματιστής της σύνθεσης του DNA εξαιτίας της έλλειψης της 3'-υδροξυλικής ομάδας, και χωρίς να σχηματίζει όπως το AZT τοξικό 3'-αμινό μεταβολίτη. Το FLT βρέθηκε να έχει αντι-HIV δραστηριότητα παρόμοια με αυτή του AZT αλλά με περισσότερη επιλεκτικότητα και υψηλότερα ενδοκυτταρικά μεταβολικά επίπεδα<sup>54</sup>. Εντούτοις, το alovudine δεν βγήκε στην αγορά ως φαρμακευτικό σκεύασμα.

Τα διδεοξυπουρινικά ανάλογα 2',3'-διδεοξυαδενοσίνη and 2',3'-διδεοξυουοσίνη παρουσίασαν εμφανή κλινική αποτελεσματικότητα και in vivo ιική στατικότητα σε ασθενείς με AIDS. Εντούτοις, εξαιτίας της εξαιρετικά οξικής αστάθειας αυτών των γλυκοσιδικών δεσμών, αυτές οι ενώσεις απαιτούν κατά την χορήγηση τους την παρουσία αντι-όξινων.



**Εικόνα 3.2:** Alovudine [3'-fluorothymidine (FLT)], άμεσο φθοριούχο ανάλογο του zidovudine [3-azidothymidine (AZT)]

### 3.4.Φαρμακολογικές συνέπειες φθοριούχων φαρμάκων

Η επίδραση της υποκατάστασης φθορίου στο μεταβολισμό και την τοξικότητα των φαρμάκων και η χρήση των γνώσεων αυτών για την ανάπτυξη ασφαλέστερων θεραπευτικών σκευασμάτων απεικονίζεται για μια ομάδα γνωστών αναισθητικών (68) (Εικόνα 3.3). Το Μεθοξυφλουράνιο χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην κλινική αναισθησία κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1960, έως ότου ανακαλύφθηκε ότι υπήρχε συσχέτιση με νεφροτοξικότητα. Ένα σύνδρομο υψηλής αποβολής ούρων που οδηγεί σταδιακά σε αφυδάτωση, και σε ορισμένες θανατηφόρες περιπτώσεις και νεφρική ανεπάρκεια, η οποία σχετιζόταν με τον μεταβολισμό της μεθοξυφλουράνης (40%) και υψηλές συγκεντρώσεις του ορού σε ανόργανο φθόριο. Με αύξηση των υποκαταστάσεων με άτομα ελαχιστοποιήθηκε ο μεταβολισμός της ένωσης, και πιο συγκεκριμένα οι βιομετασχηματισμοί που οδηγούν σε αποφθορίωση.

	Metabolism (% dose)	Toxicity
$\begin{array}{c} \text{Cl} \quad \text{F} \quad \text{H} \\   \quad   \quad   \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\   \quad   \quad   \\ \text{Cl} \quad \text{F} \quad \text{H} \end{array}$ methoxyflurane	50%	nephrotoxicity
$\begin{array}{c} \text{F} \quad \text{Br} \\   \quad   \\ \text{F}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\   \quad   \\ \text{F} \quad \text{Cl} \end{array}$ halothane	20-50%	reversible and irreversible hepatotoxicity
$\begin{array}{c} \text{F} \quad \text{F} \quad \text{F} \\   \quad   \quad   \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\   \quad   \quad   \\ \text{Cl} \quad \text{F} \quad \text{F} \end{array}$ enflurane	3%	rare cases of hepatotoxicity
$\begin{array}{c} \text{F} \quad \text{H} \quad \text{F} \\   \quad   \quad   \\ \text{F}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\   \quad   \quad   \\ \text{F} \quad \text{Cl} \quad \text{F} \end{array}$ isoflurane	<1%	rare cases of hepatotoxicity
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{CF}_3 \\   \quad   \\ \text{F}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{CF}_3 \end{array}$ sevoflurane	3%	rare cases of hepatotoxicity
$\begin{array}{c} \text{F} \quad \text{F} \quad \text{F} \\   \quad   \quad   \\ \text{F}-\text{C}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{H} \\   \quad   \quad   \\ \text{F} \quad \text{F} \quad \text{F} \end{array}$ desflurane	<1%	none reported

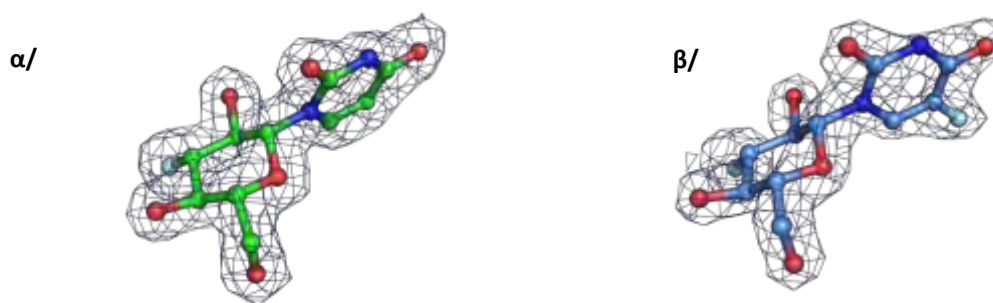
Εικόνα 3.3: Η τοξικότητα και ο μεταβολισμός των γενικών αναισθητικών.

## 4.1 Αντικείμενο μελέτης

Ο σχεδιασμός αναστολέων για τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) με στόχο τον Σακχαρώδη διαβήτη τύπου II αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική. Η μελέτη προσδετών για το καταλυτικό κέντρο της GP παρέχει πληροφορίες που μπορούν να οδηγήσουν στην πλήρης κατανόηση του μηχανισμού αναστολής του ενζύμου ενώ παράλληλα αποτελεί την βάση για το σχεδιασμό νέων με ισχυρότερη πρόσδεση.

Οι φθοριούχες ενώσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως για την αντιμετώπιση πολυάριθμων ασθενειών μιας και η ένταξη ενός ατόμου φθορίου σε ένα φάρμακο μπορεί να επηρεάσει τόσο τον μεταβολισμό και την αποβολή του φαρμάκου, όσο και την αλληλεπίδραση του φαρμάκου με τον μοριακό του στόχο.

Μιας και ο σχεδιασμός τροποποιημένων αναλόγων με υψηλότερη συγγένεια για το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται είναι ακόμα σε εξέλιξη επιλέχθηκε για την παρούσα μελέτη να εξετασθεί η αναστολή του καταλυτικού κέντρου της GPb για δύο δεοξυ-φλουρο-γλυκοζιτικά ανάλογα. Αυτοί οι αναστολείς διαθέτουν ένα φθόριο αντί για υδροξύλιο στην θέση 3' της γλυκόζης και διαφορετικές πυριμιδίνες στην θέση 1'(Εικόνα 4.1). Για να αποσαφηνίσουμε την αποτελεσματικότητα της αναστολής αυτών των ενώσεων πραγματοποιήθηκαν κινητικά πειράματα. Οι κινητικές παράμετροι αυτών των ενώσεων υπολογίσθηκαν για την μορφή b της φωσφορυλάσης, προς την κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου.<sup>19</sup>



**Εικόνα 4.1:** Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας  $2|Fo| - |Fc|$  για τους επιλεγμένους αναστολείς όπως υπολογίσθηκαν για το μοντέλο της GPb για 1.0 σ μετά το περάς της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

## 4.2 Αντιδραστήρια και Υλικά

- Ρυθμιστικά διαλύματα  
50mM β-φωσφογλυκερόλης, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA σε pH 6.8  
(Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης ενζύμου)  
β-φωσφογλυκερόλη,  $C_3H_7Na_2O_6$ , MB:306.12 g/mol(MERCK)  
β-μερκαπτοαιθανόλη,  $C_2H_6OS$ , MB:78.3 g/mol(SERVA)  
EDTA,  $C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot Na_2 \cdot H_2O$ , MB:372.5 g/mol(SERVA)  
200mM Imidazole, 400mM KCl, 4mM EDTA, 4mM DTT σε pH 6.8  
Ιμιδαζόλιο  
Χλωριούχο κάλιο, MB: 74.56 g/mol(SIGMA)  
EDTA,  $C_{10}H_{14}N_2O_8 \cdot Na_2 \cdot H_2O$ , MB:372.5 g/mol(SERVA)  
Διθειοθρεϊτόλη,  $C_2H_6OS$ , MB:78.3 g/mol(SERVA)
- Διάλυμα 400mM α-D-G-1-P  
α-D-1-φωσφορική γλυκόζη,  $C_6H_{10}N_2O_9PNa_2$ , MB:376.06 g/mol(SIGMA)
- Διάλυμα γλυκογόνου 10% (w/v)  
Γλυκογόνο (oyster glycogen) (SIGMA)  
Πιθανές προσμίξεις νουκλεοτιδίων απομακρύνθηκαν σύμφωνα με την μέθοδο των Helmreich & Cori (1964) που έχει ως εξής:
  1. Κατεργασία με ενεργό άνθρακα
  2. Φυγοκέντρωση στους 0-4 °C
  3. Διήθηση με φίλτρα Whatman No1
  4. Καταβύθιση με 1.5 όγκο απόλυτης αλκοόλης
  5. Διήθηση υπό κενό και λυοφίλιση στους -20 °C για 12-15 ώρεςΤο στερεό διαλυτοποιήθηκε στον κατάλληλο όγκο απιονισμένου ύδατος, ώστε η τελική συγκέντρωση του γλυκογόνου να είναι 10%w/v. Φύλαξη στους -20 °C.

- Διάλυμα 50mM AMP pH 6.8  
5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη, MB:347.2 g/mol(SIGMA)
- Διάλυμα SDS 1% (w/v)  
Δωδεκακυλοθειικό νάτριο,  $C_{12}H_{25}NaO_4S$  , MB:288.38 g/mol(SIGMA)
- Διάλυμα ενζύμου GPb
- Διάλυμα αναστολέα
- Αντιδραστήριο μολυβδαινίου pH 5.0  
Μολυβδαινικό αμμώνιο,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  , MB:1236.86 g/mol(MERCK)  
Οξικός ψευδάργυρος,  $Zn(CH_3COO)_2$  , MB:219.49 g/mol(SIGMA)
- Διάλυμα ασκορβικού οξέος 10% w/v, pH 5.0  
L(+)-ασκορβικό οξύ,  $C_6H_8O_6$ , MB:176.13 g/mol(MERCK)
- Απιονισμένο νερό

#### Όργανα

- Στερεοσκόπιο, Ceti Sonar (Ceti, Switzerland)
- Χρονόμετρο
- Πεχάμετρο, Metrohm 744
- Υδρόλουτρο (30°C)
- Φασματοφωτόμετρο, UV-visible spectrophotometer (CARY), Hitachi U-2000 (Hitachi, Tokio-Japan)
- Φασματοφωτόμετρο, Novaspec II spectrophotometer (CARY)
- Αναδευτήρας (Vortex)
- Πιπέτες, Gilson P1000-P10 (Gilson, France)
- Κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm

## 4.3 Κινητικές μελέτες

### 4.3.1 Παρασκευή διαλυμάτων πολλαπλών συγκεντρώσεων G1P

Παρασκευάζεται τελικό διάλυμα 90mM G1P, 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM DTT pH6.8 από τα αρχικά διαλύματα 200mM Imidazole, 400mM KCl, 4mM EDTA, 4mM DTT σε pH 6.8 και 400mM α-D-G-1-P.

Έπειτα, αραιώνεται το αρχικό ρυθμιστικό διάλυμα 200mM Imidazole, 400mM KCl, 4mM EDTA, 4mM DTT σε pH 6.8 προς τελική συγκέντρωση 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM EDTA, 2.7mM DTT σε pH 6.8

Τέλος, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του διαλύματος 90mM G1P, 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM DTT pH6.8 προς παρασκευή των ακολούθων διαλυμάτων:

- 67.5mM G1P, 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM DTT pH6.8
- 45mM G1P, 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM DTT pH6.8
- 40.5mM G1P, 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM DTT pH6.8
- 27mM G1P, 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM DTT pH6.8
- 18mM G1P, 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM DTT pH6.8
- 9mM G1P, 135mM Imidazole, 270mM KCl, 2.7mM DTT pH6.8

### 4.3.2 Παρασκευή διαλύματος γλυκογόνου

Το ένζυμο (φυλάσσεται σε 50% γλυκερόλη) αραιώνεται με το ρυθμιστικό διάλυμα 50mM β-φωσφογλυκερόλης, 50mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM EDTA σε pH 6.8 προς 1ml. Πραγματοποιούμε φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 280nm για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης του ενζύμου [ $C(\text{mg/ml})=a \cdot I/\epsilon$ ,  $\epsilon=1.32 (\text{ml} \cdot \text{cm})/\text{mg}$ ] με κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1cm έπειτα από μηδενισμό με τυφλό διάλυμα το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου.

Μετά το πέρας της μέτρησης του ενζύμου παρασκευάζεται το τελικό διάλυμα :

- 25μg/ml GPb, 1% (w/v) γλυκογόνο σε ρυθμιστικό διάλυμα 2.5mM β-φωσφογλυκερόλης, 2.5mM β-μερκαπτοαιθανόλης, 0.05mM EDTA σε pH 6.8

#### **4.3.3 Παρασκευή διαλυμάτων πολλαπλών συγκεντρώσεων G1P παρουσία AMP**

Αραιώνονται τα αρχικά διαλύματα της G1P παρουσία AMP με τελικό όγκο 720μl και συγκεντρώσεις που παραθέτονται παρακάτω:

- 25mM G1P, 1.25mM AMP
- 12.5mM G1P, 1.25mM AMP
- 7.5mM G1P, 1.25mM AMP
- 5mM G1P, 1.25mM AMP
- 3.75mM G1P, 1.25mM AMP
- 2.5mM G1P, 1.25mM AMP

#### **4.3.4 Προσδιορισμός φωσφόρου με τη μέθοδο του ασκορβικού οξέος**

Ο προσδιορισμός του φωσφόρου αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδο για τον προσδιορισμό δραστηριότητας ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν οργανοφωσφορικές ενώσεις. Στην περίπτωση της GP, η απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων κατά το σχηματισμό γλυκογόνου επιτρέπει την κινητική μελέτη του ενζύμου.

Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό έγχρωμου συμπλόκου υπό ήπιες οξικές συνθήκες (pH5.0) παρουσία οξικού ψευδαργύρου και αναγωγή με ασκορβικό οξύ<sup>55</sup>. Φωτομέτρηση πραγματοποιείται σε μήκος κύματος 850nm και παρουσιάζεται αξιοπιστία για 0.05-0.4μmol φωσφόρου. Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται όπως φαίνονται ακολούθως:

- 15mM μολυβδαινικού αμμωνίου, 100mM οξικού ψευδαργύρου pH5.0 (ρύθμιση με HCl). Απαραίτητη η φύλαξη του διαλύματος σε δοχείο πολυαιθυλαίνιου υπό συνθήκες σκότους.
- 10% (w/v) ασκορβικού οξέος pH5.0 (ρύθμιση με NaOH). Παρασκευή διαλύματος ακρίβως πριν την έναρξη του πειράματος (ταχεία οξείδωση ασκορβικού οξέος).

Ανάμειξη των προαναφερθέντων διαλυμάτων σε αναλογία 4:1, αντιστοίχως. Το διάλυμα φυλάσσεται μακριά από φως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί 15 λεπτά μετά τη παρασκευή του και διατηρείται έως και 4 ώρες.

#### 4.3.5 Παρασκευή τυφλών διαλυμάτων

Η μέθοδος προσδιορισμού της σταθεράς συγγένειας ( $K_m$ ) του ενζύμου όπως έχει ήδη αναφερθεί βασίζεται στον προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων που προκύπτουν κατά την σύνθεση γλυκογόνου, που καταλύεται από την GPb. Τυχόν απορρόφηση φωσφορικών ιόντων που προκύπτουν χωρίς την δράση του ενζύμου αφαιρείται μέσω των παρακάτω τυφλών:

- Τυφλό νερού για την αρχική μηδένιση.
- Τυφλό με τη μέγιστη συγκέντρωση G1P και αναγωγή της τιμής της απορρόφησης που προκύπτει λόγω της φυσικής υδρόλυσης της G1P και για τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις.
- Τυφλό γνωστού πρότυπου διαλύματος φωσφορικών από όπου προσδιορίζεται η τιμή της απορρόφησης του κάθε  $\mu\text{mol Pi}$ .
- Τυφλό γλυκογόνου λόγω πιθανής παρουσίας φωσφορικών ιόντων.

Παρασκευάζονται δύο δείγματα για κάθε τυφλό και λαμβάνεται υπόψη ο μέσος όρος των τιμών τους.

#### 4.3.6 Προσδιορισμός των αρχικών ταχυτήτων ( $v$ )

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity,  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ) αποτελεί έκφραση της ποσότητας και της δραστηριότητας ενός ένζυμου κατά τη μετατροπή 1  $\mu\text{mol}$  υποστρώματος (αλλιώς παρασκευή 1  $\mu\text{mol}$  προϊόντος) ανά λεπτό. Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε μέσω του προγράμματος Grafit<sup>56</sup> εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι κάθε πειραματική τιμή εμπεριέχει τυχαίο σφάλμα, δηλαδή η τυπική απόκλιση ( $\sigma^2$ ) είναι σταθερή (simple weighting)<sup>56</sup>. Ακολουθεί η μαθηματική εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των αρχικών ταχυτήτων:

$$v = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{\text{όριο}}{\text{όριο} - \mu\text{mol Pi}} \right) \text{όριο}/\text{mg}_{\text{ενζύμου}}$$



όπου  $v$ : η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης

$t$ : ο χρόνος της αντίδρασης

όριο: προκύπτει από το γινόμενο της συγκέντρωσης της Glc-1-P που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια του πειράματος επί τον όγκο του δείγματος επί τη μέγιστη υδρόλυση της Glc-1-P στην ισορροπία της αντίδρασης (78%).

#### 4.3.7 Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων $V_{max}$ και σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ )

Η σταθερά Michaelis-Menten ( $K_m$ ) αποτελεί την σταθερά συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα και ορίζεται ως η συγκέντρωση του υποστρώματος (G1P) που αντιστοιχεί στο ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ( $V_{max}$ ). Ο προσδιορισμός απαιτεί την κινητική μελέτη του ένζυμου παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος (G1P).

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων Michaelis-Menten, οι ενζυμικές ταχύτητες επεξεργάζονται εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση και δίδοντας τις τυπικές αποκλίσεις των ταχυτήτων.

Για τον υπολογισμό της σταθεράς Michaelis-Menten ( $K_m$ ) χρησιμοποιείται η εξίσωση Michaelis-Menten με την προϋπόθεση σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου ενζύμου- υποστρώματος :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]}$$



Όπου  $v$ : η ταχύτητα της καταλυόμενης αντίδρασης

$V_{max}$ : η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης

[S]: η συγκέντρωση του υποστρώματος

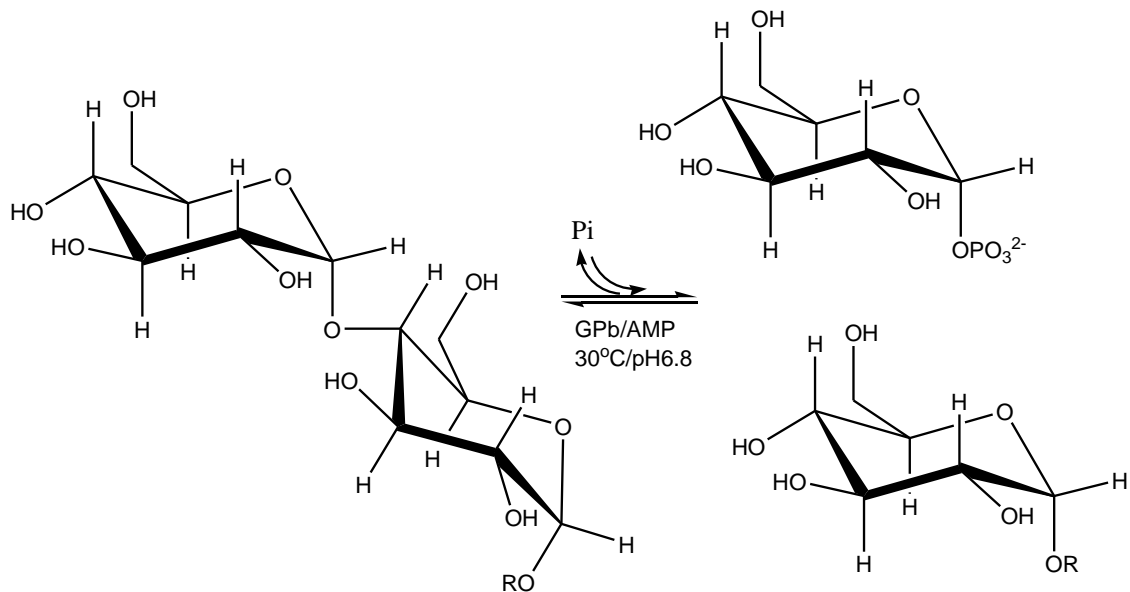
E: το ένζυμο

S: το υπόστρωμα

ES: το σύμπλοκο ενζύμου- υποστρώματος

P: το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης

Η κινητική μελέτη της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b (GPb) βασίζεται στην παρακάτω αντίδραση:



Η λιγότερο ενεργή μορφή του ενζύμου (T διαμόρφωση), μετά από ενεργοποίηση με AMP, δρα αντίστροφα, προς σχηματισμό γλυκογόνου, παρουσία G1P ( $\alpha$ -D-1-φωσφορικής γλυκόζης), προς απελευθέρωση ορθοφωσφορικών ιόντων (Pi)<sup>57</sup>. Η καταλυόμενη αντίδραση σε συνθήκες κορεσμού για τα AMP και γλυκογόνο (1.0mM και 1.0% αντίστοιχα) ακολουθεί την κινητική Michaelis Menten, σύμφωνα με την οποία η καμπύλη της ταχύτητας ως προς το υπόστρωμα (G1P), είναι υπερβολή. Σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος η ταχύτητα εξαρτάται από την ποσότητα του ενζύμου ενώ σε συγκεντρώσεις όπου επέρχεται κορεσμός, η ταχύτητα εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από την ποσότητα του ενζύμου στο μίγμα της αντίδρασης<sup>58</sup>.

Η  $V_{max}$  δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια και κατά συνέπεια ούτε η  $K_m$ . Έτσι, οι τιμές  $V_{max}$  και  $K_m$  προσδιορίζονται γραφικά με χρήση του προγράμματος Grafit<sup>59</sup>. Για τον προσδιορισμό της σταθεράς  $K_m$  της GPb πραγματοποιείται κινητική μελέτη παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων υποστρώματος G-1-P.

Το ένζυμο επωάζεται στους 30°C για 15 λεπτά και τα διαλύματα της G1P για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο. Μετά την επώαση, 180μl από το ένζυμο (5.0μg ένζυμο/mL) προστίθενται τα διαλύματα της G1P όγκου 720μl για να ξεκινήσει η αντίδραση. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 30°C στο διάλυμα:

- 1.0mM AMP, 0.2%(w/v) γλυκογόνο, 30mM Imidazole, 60mM KCl, 0.6mM EDTA, 0.1 β-GP, 0.1mM β-Merc, 0.6mM DTT pH 6.8

Για 20mM, 10mM, 6mM, 4mM, 3mM, 2mM  $\alpha$ -D-G-1-P

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (20'') λαμβάνονται δείγματα των 200  $\mu$ l από το

μείγμα της αντίδρασης και προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 50μl 1.0% (w/v) SDS (αδρανοποίηση του ενζύμου).

Στη συνέχεια προστίθεται στα δείγματα που έχουν ληφθεί 2.5ml ασκορβικού οξέος – μολυβδαινικού αμμωνίου σε αναλογία 1/4 ανά δοκιμαστικό σωλήνα, σε ίσα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα επωάζονται στους 30°C για 15min και ακολουθεί φωτομέτρησή τους στα 850nm. Από τα αποτελέσματα της φωτομέτρησης υπολογίζεται ο αριθμός των P<sub>i</sub> που έχουν απελευθερωθεί από την κάθε αντίδραση. Ακολουθεί η επεξεργασία των δεδομένων με το πρόγραμμα Grafit για τον προσδιορισμό της K<sub>m</sub>.

#### **4.3.8 Διαλυτοποίηση και ρύθμιση pH των υποψήφιων αναστολέων**

Η παρουσία των αρωματικών ομάδων στους υποψήφιους αναστολείς της παρούσας μελέτης θα μπορούσε να οδηγήσει σε μειωμένη διαλυτότητα. Σε αυτές τις περιπτώσεις επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί συνήθως κάποιο ποσοστό από τον οργανικό διαλυτή διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Η παρουσία του DMSO κατά την διάρκεια της κινητικής μελέτης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας της φωσφορυλάσης. Εντούτοις ήταν εφικτό να διαλυτοποιηθούν σε ρυθμιστικό διάλυμα 100mM BES pH6.8. Το pH ρυθμίστηκε με αραιά διαλύματα καυστικού νατρίου και υδροχλωρικού οξέος (1N).

#### **4.3.9 Προσδιορισμός IC<sub>50</sub> αναστολέα**

Η παρουσία του αναστολέα οδηγεί σε μείωση της ταχύτητας σχηματισμού του γλυκογόνου καθώς και της απελευθέρωσης ορθοφωσφορικών ιόντων. Οι αναστολείς του καταλυτικού κέντρου της GP εμφανίζουν συναγωνιστική αναστολή. Η παρουσία τους στο καταλυτικό κέντρο παρεμποδίζει τη πρόσδεση του υποστρώματος και κατ' επέκταση τη δράση του ενζύμου. Σύμφωνα με το μοντέλο της συναγωνιστικής αναστολής, ο αναστολέας συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου 'μιμούμενος' το υπόστρωμα εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο το σχηματισμό συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Η σταθερά IC<sub>50</sub> ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία προκαλείται 50% μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου. Για την κινητική μελέτη και τον προσδιορισμό της IC<sub>50</sub> οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων G1P και γλυκογόνου παραμένουν σταθερές, ενώ η συγκέντρωση αναστολέα μεταβάλλεται. Για το κινητικό πείραμα παρουσία αναστολέα ακολουθείται η ίδια διαδικασία όπως για τον προσδιορισμό δραστηριότητας της GPb.

Έπειτα, υπολογίζονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για τις διάφορες συγκεντρώσεις αναστολέα και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{s.a._{\text{control}} - s.a._i}{s.a._{\text{control}}} \times 100\%$$

Όπου:

$s.a._{\text{control}}$  : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

$s.a._i$ : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία  $i$  συγκέντρωσης αναστολέα

Εν συνεχεία, εκτιμάται η περιοχή συγκεντρώσεων για την  $IC_{50}$  και επιλέγονται συγκεντρώσεις γύρω από αυτή. Η τιμή της  $IC_{50}$  προκύπτει από το διάγραμμα %αναστολή ως προς συγκέντρωση του αναστολέα.

Από την τιμή της  $IC_{50}$  προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής  $K_i$  που αποτελεί όπως και η  $K_m$  έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υποστρώμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάσει του τύπου:

$$IC_{50} = \left( 1 + \frac{[S]}{K_m} \right) K_i$$

Όπου  $[S]$  η συγκέντρωση του υποστρώματος G1P ως προς το οποίο εξετάζεται η GPb. Όσο μικρότερη η τιμή του  $[S]$  τόσο τείνουν προς ταύτιση η τιμή της  $IC_{50}$  με αυτήν της  $K_i$ , με άλλα λόγια  $\lim_{[S] \rightarrow 0} IC_{50} = K_i$ . Γι' αυτό το λόγο επιλέγονται οι μικρότερες δυνατές συγκεντρώσεις για την G1P. Η συγκέντρωση της G1P συνήθως είναι 2mM στην αντίδραση του προσδιορισμού της  $IC_{50}$ .

#### 4.3.10 Υπολογισμός της φαινόμενης $K_m$ ( $K_{m,app}$ ) και της $K_i$ – Μοντέλο Συναγωνιστικής αναστολής

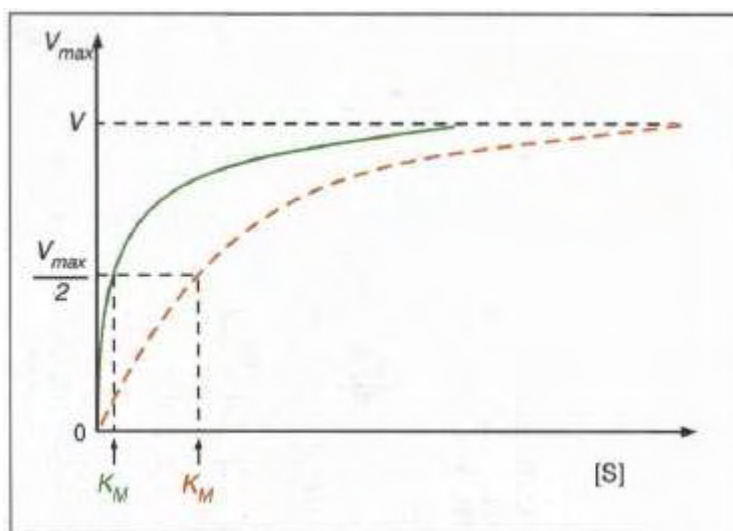
Ο συναγωνιστικός αναστολέας προσδένεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και εμποδίζει την πρόσδεση του υποστρώματος. Η δομή του συναγωνιστικού αναστολέα συνήθως μοιάζει με τη δομή του υποστρώματος. Η έκταση της συναγωνιστικής αναστολής εξαρτάται από:

- τη συγκέντρωση του υποστρώματος
- τη συγκέντρωση του αναστολέα

- τη συγγένεια του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα και ως προς τον αναστολέα

Κατά τη συναγωνιστική αναστολή ο αναστολέας, επειδή μοιάζει με το υπόστρωμα, το συναγωνίζεται για την κατάληψη θέσεων του ενεργού κέντρου με αποτέλεσμα να αυξάνεται η φαινόμενη  $K_m$  του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα (μειώνεται η συγγένειά τους εξαιτίας της παρέμβασης του αναστολέα) με άμεση συνέπεια την αύξηση της φαινόμενης σταθεράς διάστασης  $K_d$ . Η  $V_{max}$  παραμένει αμετάβλητη (Εικόνα 4.2). Η φαινόμενη  $K_m$  υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$K_{m, app} = K_m \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$



**Εικόνα 4.2:** Διάγραμμα συναγωνιστικής αναστολής. Η πράσινη καμπύλη αντιστοιχεί σε αντίδραση απουσία αναστολέα, ενώ η κόκκινη παρουσία συναγωνιστικού αναστολέα.

## Αποτελέσματα & Συζήτηση

### 5.1 Αποτελέσματα κινητικών πειραμάτων

Το ήπαρ είναι ένα όργανο που έχει ως σκοπό να αποκαθιστά της ενεργειακές ανάγκες των άλλων ιστών. Η ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (LGP, Liver GP), ένζυμο υπεύθυνο για την κινητοποίηση του γλυκογόνου στο ήπαρ, αποτελεί έναν από της μοριακούς στόχους για το σχεδιασμό νέων υπογλυκαιμικών φαρμάκων. Η αναστολή του ενζύμου αυτού έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της κινητοποίησης του γλυκογόνου και τη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των ασθενών. Η φωσφορυλάση και η γλυκοκινάση, κατά κύριο λόγο ελέγχουν τη ρύθμιση της γλυκόζης, η οποία απελευθερώνεται από τα ηπατικά κύτταρα.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου της μυϊκής φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b απομονωμένης από μυς κουνελιού. Για αυτό τον σκοπό επιλέχθησαν ανάλογα γλυκόζης ως πιθανοί αναστολείς μιας και η γλυκόζη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποτελεί τον φυσικό αναστολέα του ενζύμου. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δύο δεοξυ-φλουρο-γλυκοζιτικά ανάλογα, ώστε να αποσαφηνιστεί η αποτελεσματικότητα αναστολής της μυϊκή φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b κουνελιού. Αυτοί οι αναστολείς διαθέτουν ένα φθόριο αντί για υδροξύλιο στην θέση 3' της γλυκόζης και διαφορετικές πυριμιδίνες στην θέση 1'.

Η επιλογή του μυϊκού ισοενζύμου της GP κουνελιού έγινε λόγω της υψηλής ομολογίας μεταξύ του ηπατικού και του μυϊκού ενζύμου (80% στην αμινοξική αλληλουχία των μορίων και 100% για τα αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου). Τα ισοένζυμα του ανθρώπου: 'ηπατικό', 'μυϊκό' και 'εγκεφάλου', έχουν ομολογία 80-83%, ενώ για το καταλυτικό κέντρο η ομολογία είναι 100%. Μελέτες μοντελισμού έχουν δείξει ότι το καταλυτικό κέντρο της ηπατικής ανθρώπινης φωσφορυλάσης και της μυϊκής φωσφορυλάσης κουνελιού δεν διαφέρουν ούτε στην αλληλουχία αλλά ούτε και στη δομή.

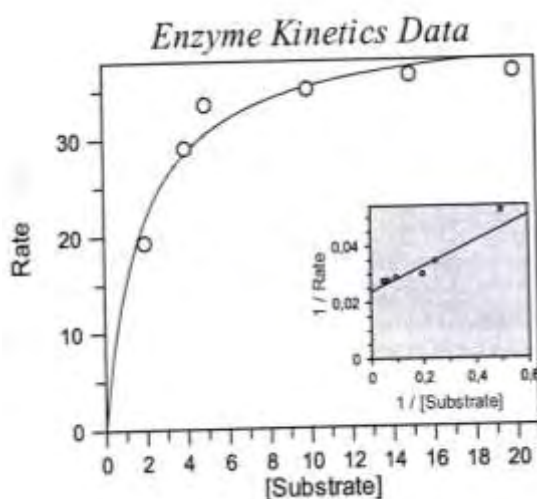
Η σειρά ενώσεων με την ονομασία 'DK' σχεδιάστηκε και συντέθηκε στο εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας του Καθηγητή Δημήτριου Κομιώτη του Πανεπιστημίου Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στην Λάρισα, στο πλαίσιο της συνεργασίας του εργαστηρίου αυτού με την ομάδα Δομικής βιολογίας και Χημείας του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Οι κινητικές μελέτες έλαβαν χώρα στην κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου

σε pH=6.8, 30 °C, παρουσία σταθερής συγκέντρωσης γλυκογόνου (0.2% w/v), G-1-P (2 mM), AMP (1 mM), DMSO (1%) ενώ το εύρος των συγκεντρώσεων των αναστολέων που μελετήθηκαν ήταν 2-7mM.

### 5.1.2 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης γλυκογόνου

Η σταθερά  $K_m$  (σταθερά Michaelis) αποτελεί το μέτρο της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υποστρώμα (G-1-P για το ένζυμο GPb) και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η  $K_m$  ορίζεται ως η συγκέντρωση του ενζύμου που επιτρέπει στην καταλυτική αντίδραση να προχωρά με ρυθμό μισό εκείνου της μέγιστης ταχύτητας ( $V_{max}$ ). Η σταθερά αυτή για τη μυϊκή φωσφορυλάση του κουνελιού κυμαίνεται μεταξύ 1.0 και 2.5mM. Με στόχο τον χαρακτηρισμό του ενζύμου που απομονώθηκε έγινε προσδιορισμός της  $K_m$ .



Parameter	Value	Std. Error
$V_{max}$	41,9280	2,4130
$K_m$	1,8681	0,3612

**Εικόνα 5.1:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου b σε διάφορες συγκεντρώσεις του υποστρώματος, της 1-φωσφορικής γλυκόζης (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης του γλυκογόνου, υπό σταθερή συγκέντρωση AMP (1.0mM) και γλυκογόνου (1% w/v). Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι:  $K_m=1.87 \pm 0.36\text{mM}$  και  $V_{max}=41.9 \pm 2.4 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ . Στην **Εικόνα 4.2** παρουσιάζεται η καμπύλη της ταχύτητας (ειδική δραστηριότητα, specific activity, sa,  $\mu\text{mol}$  φωσφορικών /  $\text{min}\cdot\text{mg}$  ενζύμου) ως προς την συγκέντρωση του υποστρώματος (G-1-P).

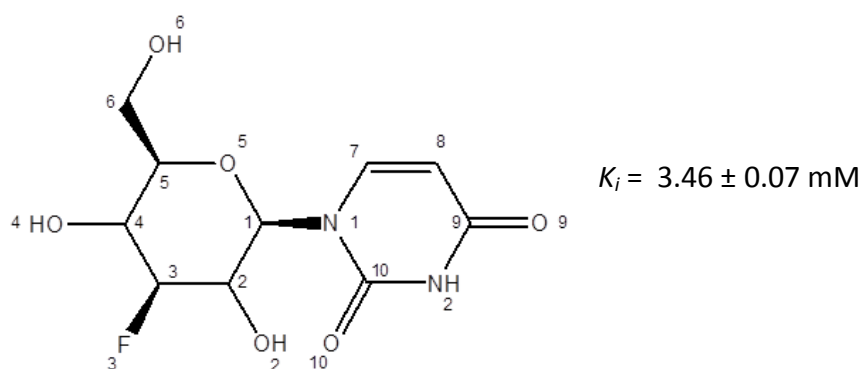
### 5.1.3 Κινητική μελέτη των DK ενώσεων

Για το σκοπό της παρούσας εργασίας, μετά την απομόνωση της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου μελετήθηκαν οι ενώσεις DK, ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης καθώς και ο χημικός τύπος των ενώσεων παρουσιάζονται παρακάτω.

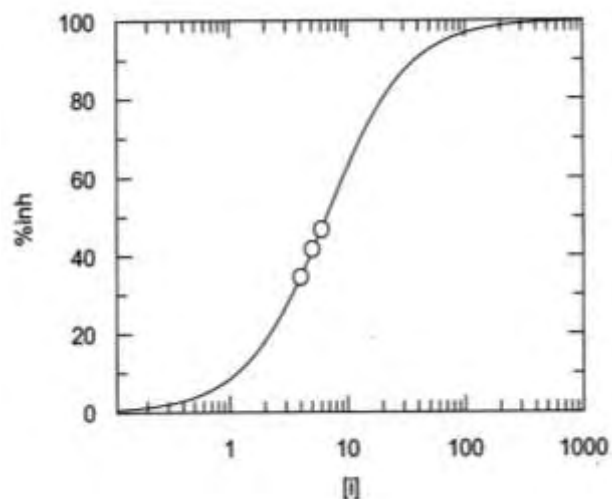
Ακολουθούν τα αποτελέσματα των κινητικών πειραμάτων και οι γραφικές παραστάσεις που προέκυψαν από το πρόγραμμα Grafit<sup>56</sup>.

#### DK 1

Η  $IC_{50}$  υπολογίστηκε σε  $6.6 \pm 0.1\text{mM}$ .





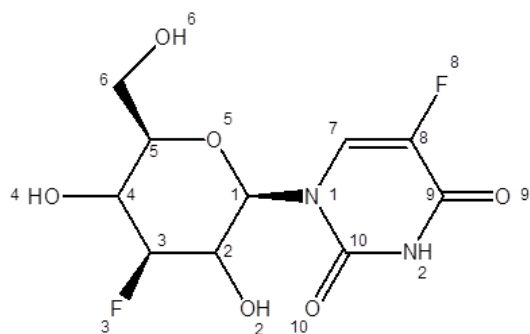


Variable	Value	Std. Err.
IC 50	6,6018	0,1316

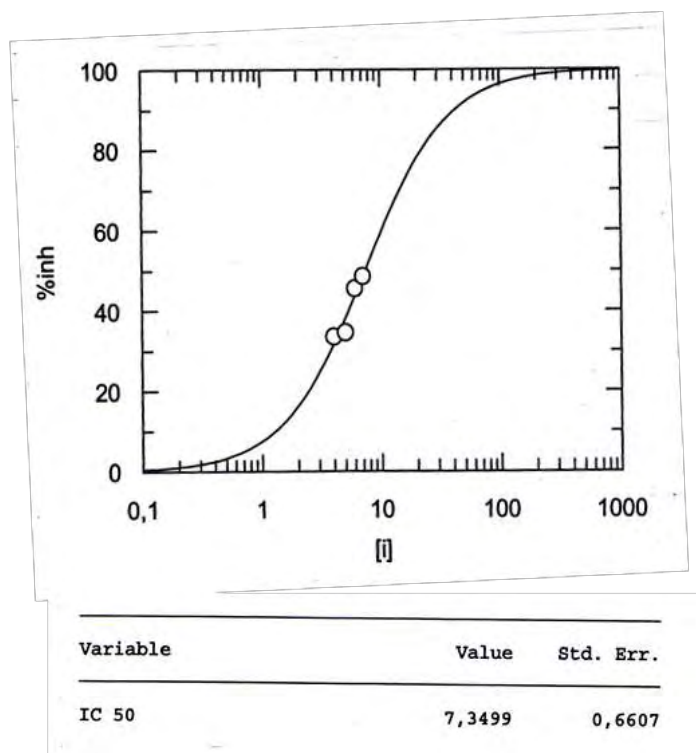
**Εικόνα 5.2:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της ένωσης DK1, όπου [I] η συγκέντρωση του αναστολέα.

#### DK 4

Η  $IC_{50}$  υπολογίζεται σε  $7.5 \pm 0.7$  mM.



$$K_i = 3.67 \pm 0.30 \text{ mM}$$



**Εικόνα 5.3:** Διάγραμμα κινητικής μελέτης της ένωσης DK4, όπου [I] η συγκέντρωση του αναστολέα.

Οι αναστολείς έχουν πανομοιότυπη δομή, με μόνη διαφορά την προσθήκη ενός επιπλέον ατόμου φθορίου στην θέση 8' της πυριμιδίνης. Έτσι εξηγούνται και οι παρόμοιες τιμές στις σταθερές αναστολής  $K_i$ .

## 5.2 Συζήτηση

Παρά τις εκτενείς έρευνες, οι διάφοροι τύποι των υπογλυκαιμικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του Σακχαρώδη διαβήτη τύπου II προσφέρουν λύση μόνο στην αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της ασθένειας ενώ ταυτόχρονα η δράση τους συνοδεύεται από μια σειρά σημαντικών παρενεργειών. Η αναζήτηση νέων θεραπευτικών μέσων που θα παρουσιάζουν λιγότερες παρενέργειες και θα οδηγούν σε αποτελεσματικότερο γλυκαιμικό έλεγχο καθίσταται αναγκαία.

Το ένζυμο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, ένα ένζυμο 'κλειδί' για τη διάσπαση του γλυκογόνου, αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της αναζήτησης. Συνεπώς, ο σχεδιασμός αναστολέων για τον συγκεκριμένο στόχο αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη στρατηγική.

Η ενσωμάτωση του φθορίου σε αναστολείς έχει φανεί να είναι μείζονος σημασίας μιας και η προσθήκη του σε μια ένωση μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τις χημικές ιδιότητες του φαρμάκου, την κατανομή, την απέκκριση και τον μεταβολισμό του. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν ιδιαίτερος δελεαστικές τις φθοριούχες ενώσεις με άμεσο αποτέλεσμα την ευρεία χρήση τους στις μέρες μας για την αντιμετώπιση ασθενειών.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έχοντας ως γνώμονα τον σημαντικό ρόλο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στην ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης και από την άλλη την θετική επιρροή της προσθήκης ατόμων φθορίου επιλέξαμε να σχεδιάσουμε και να μελετήσουμε μικρές ενώσεις αυτού του τύπου για το καταλυτικό κέντρο της GPb. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν δύο δεοξυ-φλουρο-γλυκοζιτικά ανάλογα. Αυτοί οι αναστολείς διαθέτουν ένα φθόριο αντί για υδροξύλιο στην θέση 3' της γλυκόζης και διαφορετικές πυριμιδίνες στην θέση 1'.

Για να αποσαφηνίσουμε την αποτελεσματικότητα της αναστολής αυτών των ενώσεων πραγματοποιήσαμε κινητικά πειράματα. Οι κινητικές παράμετροι αυτών των ενώσεων υπολογίσθηκαν για την μορφή b της φωσφορυλάσης, προς την κατεύθυνση της σύνθεσης του γλυκογόνου. Οι προσδέτες παρουσίασαν αναστολή της τάξεως των mM ( $K_i$ 's =  $3.67 \pm 0.30$  mM and  $3.46 \pm 0.07$  mM). Η υποκατάσταση με φθόριο στην 3' θέση της γλυκόζης επηρέασε σημαντικά την ισχύ της πρόσδεσης. Οι αναστολείς έχουν σχεδόν πανομοιότυπη δομή, με μόνη διαφορά την προσθήκη ενός επιπλέον ατόμου φθορίου στην θέση 8' της πυριμιδίνης για των έναν εν των δύο αναστολέων. Έτσι εξηγούνται και οι παρόμοιες τιμές στις σταθερές αναστολής  $K_i$ .

Η παρούσα εργασία δείχνει πως τα καινοτόμα αυτά ανάλογα είναι συναγωνιστικοί αναστολείς της μυϊκής GP. Ο σχεδιασμός τροποποιημένων αναλόγων με υψηλότερη συγγένεια για το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται σε εξέλιξη.

## Βιβλιογραφία

---

- 1 Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (<http://www.who.int/>).
- 2 Moller, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414, 821-827, doi:10.1038/414821a (2001).
- 3 Stryer, L. Βιοχημεία, (Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2005).
- 4 Somsak, L. *et al.* New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Current medicinal chemistry* 15, 2933-2983 (2008).
- 5 Gardner, D., Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology, Ninth Edition (LANGE Clinical Medicine)
- 6 Οικονομάκος, Ν.Γ., Χημικά Χρονικά, 63, 258-261 (2001).
- 7 Bell, G. I. *et al.* Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes care* 13, 198-208 (1990).
- 8 Maratou, E. *et al.* Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *European journal of clinical investigation* 37, 282-290, doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x (2007).
- 9 Shepherd, P. R. & Kahn, B. B. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 341, 248-257, doi:10.1056/NEJM199907223410406 (1999).
- 10 Hayes, J. M. & Leonidas, D. D. Computation as a tool for glycogen phosphorylase inhibitor design. *Mini reviews in medicinal chemistry* 10, 1156-1174 (2010).
- 11 Sprang, S. R. *et al.* Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature* 336, 215-221, doi:10.1038/336215a0 (1988).
- 12 Barford, D. & Johnson, L. N. The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature* 340, 609-616, doi:10.1038/340609a0 (1989).
- 13 Sprang, S. R., Withers, S. G., Goldsmith, E. J., Fletterick, R. J. & Madsen, N. B. Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate. *Science* 254, 1367-1371 (1991).
- 14 Oikonomakos, N. G. & Somsak, L. Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Current opinion in investigational drugs* 9, 379-395 (2008).
- 15 Oikonomakos, N. G. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. *Current protein & peptide science* 3, 561-586 (2002).
- 16 Bentifa, M. *et al.* Glucose-based spiro-isoxazolines: a new family of potent glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17, 7368-7380, doi:10.1016/j.bmc.2009.08.060 (2009).
- 17 Watson, K. A. *et al.* Glucose analogue inhibitors of glycogen phosphorylase: from crystallographic analysis to drug prediction using GRID force-field and GOLPE variable selection. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 51, 458-472, doi:10.1107/S090744499401348X (1995).
- 18 Onda, K. *et al.* Synthesis of 5-chloro-N-aryl-1H-indole-2-carboxamide derivatives as inhibitors of human liver glycogen phosphorylase a. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16, 5452-5464, doi:10.1016/j.bmc.2008.04.010 (2008).
- 19 Tsirkone, V. G. *et al.* 1-(3-Deoxy-3-fluoro-beta-d-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorganic & medicinal chemistry* 18, 3413-3425, doi:10.1016/j.bmc.2010.04.004 (2010).
- 20 Murray, G. R. The Life-History of the First Case of Myxoedema Treated by Thyroid Extract. *British medical journal* 1, 359-360 (1920).
- 21 Wolf, G. The discovery of vitamin D: the contribution of Adolf Windaus. *The Journal of nutrition* 134, 1299-1302 (2004).

- 22 Hansen, S. E. [The development of adrenal cortical hormones into drugs]. *Dansk medicinhistorisk arbog* 36, 109-132 (2008).
- 23 Ingle, D. J. The biologic properties of cortisone: a review. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 10, 1312-1354, doi:10.1210/jcem-10-10-1312 (1950).
- 24 Stouch, T. R. The errors of our ways: taking account of error in computer-aided drug design to build confidence intervals for our next 25 years. *Journal of computer-aided molecular design* 26, 125-134, doi:10.1007/s10822-012-9541-6 (2012).
- 25 Marshall, G. R. Limiting assumptions in structure-based design: binding entropy. *Journal of computer-aided molecular design* 26, 3-8, doi:10.1007/s10822-011-9494-1 (2012).
- 26 Craig, A. Astronomers count the stars. <http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/3085885.stm> (2003).
- 27 Reymond, J. L., Blum, L. C. & van Deursen, R. Exploring the chemical space of known and unknown organic small molecules at [www.gdb.unibe.ch](http://www.gdb.unibe.ch). *Chimia* 65, 863-867, doi:10.2533/chimia.2011.863 (2011).
- 28 Gorse, A. D. Diversity in medicinal chemistry space. *Current topics in medicinal chemistry* 6, 3-18 (2006).
- 29 Rubenstein K, C. C. Hight throughput screening: Redefining the Mission. [http://pharmalicensing.com/public/articles/view/1005568086\\_3befc0562a952/](http://pharmalicensing.com/public/articles/view/1005568086_3befc0562a952/).
- 30 Hopkins, A. L., Groom, C. R. & Alex, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug discovery today* 9, 430-431, doi:10.1016/S1359-6446(04)03069-7 (2004).
- 31 Foloppe, N. *et al.* Identification of chemically diverse Chk1 inhibitors by receptor-based virtual screening. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14, 4792-4802, doi:10.1016/j.bmc.2006.03.021 (2006).
- 32 Klebe, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug discovery today* 11, 580-594, doi:10.1016/j.drudis.2006.05.012 (2006).
- 33 Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews. Drug discovery* 3, 935-949, doi:10.1038/nrd1549 (2004).
- 34 Seddon, G. *et al.* Drug design for ever, from hype to hope. *Journal of computer-aided molecular design* 26, 137-150, doi:10.1007/s10822-011-9519-9 (2012).
- 35 Hartshorn, M. J. *et al.* Fragment-based lead discovery using X-ray crystallography. *Journal of medicinal chemistry* 48, 403-413, doi:10.1021/jm0495778 (2005).
- 36 Davies, N. G. *et al.* Targeting conserved water molecules: design of 4-aryl-5-cyanopyrrolo[2,3-d]pyrimidine Hsp90 inhibitors using fragment-based screening and structure-based optimization. *Bioorganic & medicinal chemistry* 20, 6770-6789, doi:10.1016/j.bmc.2012.08.050 (2012).
- 37 Jeppsson, F. *et al.* Discovery of AZD3839, a potent and selective BACE1 inhibitor clinical candidate for the treatment of Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* 287, 41245-41257, doi:10.1074/jbc.M112.409110 (2012).
- 38 Knehans, T. *et al.* Structure-guided fragment-based in silico drug design of dengue protease inhibitors. *Journal of computer-aided molecular design* 25, 263-274, doi:10.1007/s10822-011-9418-0 (2011).
- 39 C., D. *Therapeutic Drugs. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone* (1999).
- 40 KL, K. Recent advances

in the biomedical chemistry of fluorinecontaining  
compounds. *In Biomedical*

41 O'Hagan, D. Some influences of fluorine in bioorganic chemistry.

42 Resnati, G. Aspects of the medicinal chemistry of fluoroorganic compounds. Part II. *Farmaco* 45, 1137-1167 (1990).

43 Resnati, G. Aspects of the medicinal chemistry of fluoroorganic compounds. Part I. *Farmaco* 45, 1043-1066 (1990).

44 Scarfe, G. B. *et al.* Quantitative studies on the urinary metabolic fate of 2-chloro-4-trifluoromethylaniline in the rat using <sup>19</sup>F-NMR spectroscopy and directly coupled HPLC-NMR-MS. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 29, 77-91, doi:10.1080/004982599238821 (1999).

45 Wolf, W., Presant, C. A. & Waluch, V. <sup>19</sup>F-MRS studies of fluorinated drugs in humans. *Advanced drug delivery reviews* 41, 55-74 (2000).

46 Saleem, A. *et al.* Modulation of fluorouracil tissue pharmacokinetics by eniluracil: in-vivo imaging of drug action. *Lancet* 355, 2125-2131 (2000).

47 Bravo, P. *et al.* Synthesis and pharmacological evaluation of enantiomerically pure 4-deoxy-4-fluoromuscarnes. *Journal of medicinal chemistry* 35, 3102-3110 (1992).

48 Lu, S. F. *et al.* Syntheses of (R)- and (S)-2- and 6-fluoronorepinephrine and (R)- and (S)-2- and 6-fluoroepinephrine: effect of stereochemistry on fluorine-induced adrenergic selectivities. *Journal of medicinal chemistry* 43, 1611-1619 (2000).

49 Tewson, T. J. Synthesis and biodistribution of R- and S-isomers of [<sup>18</sup>F]-fluoropropranolol, a lipophilic ligand for the beta-adrenergic receptor. . *Nucl. Med.*

50 Qiu, J. 2,6-Difluorophenol as a bioisostere of a carboxylic acid: bioisosteric analogues of gamma-aminobutyric

51 KL, K. Synthesis and adrenergic activity of ringfluorinated phenylephrines. *J. Med. Chem.*

52 Morgan, P. Oxidative dehalogenation of 2-fluoro-17<sup>®</sup>-ethynyloestradiol in vivo. A distal structuremetabolism relationship of 17<sup>®</sup>-ethynylation. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1717-1724 (1992).

53 Matthes, E. Phosphorylation, antiHIV activity and cyto-toxicity of 30-fluorothymidine. . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153, 825-831 (1988).

54 Kong, X. B. Comparisons of antihuman-immunodeficiencyvirus activities, cellular-transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. . *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 808-818 (1992).

55 Saheki, S., Takeda, A. & Shimazu, T. Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Analytical biochemistry* 148, 277-281 (1985).

56 Leatherbarrow, R. J. Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *TIBS* 15, 455-458 (1990).

- 57 Oikonomakos, N. G., Zographos, S. E., Johnson, L. N., Papageorgiou, A. C. & Acharya, K. R. The binding of 2-deoxy-D-glucose 6-phosphate to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies. *Journal of molecular biology* 254, 900-917, doi:10.1006/jmbi.1995.0665 (1995).
- 58 Segel, L. H. Enzyme kinetics. *Wiley interscience, New York.* (1975).
- 59 Leatherbarrow, R. J. Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. *TIBS* 15, 455-458 ( 1990).