

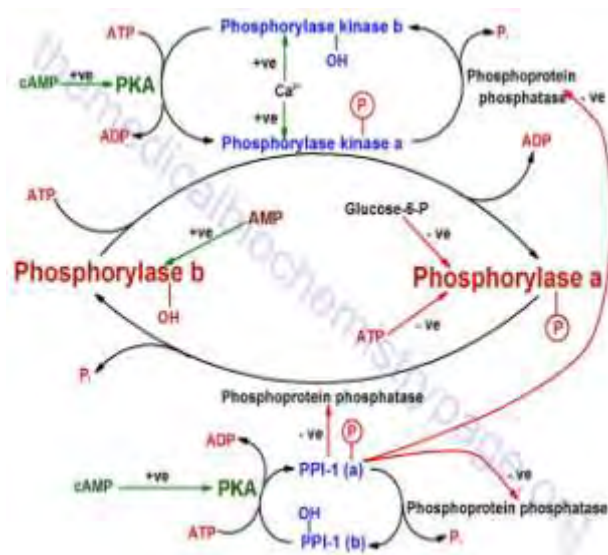
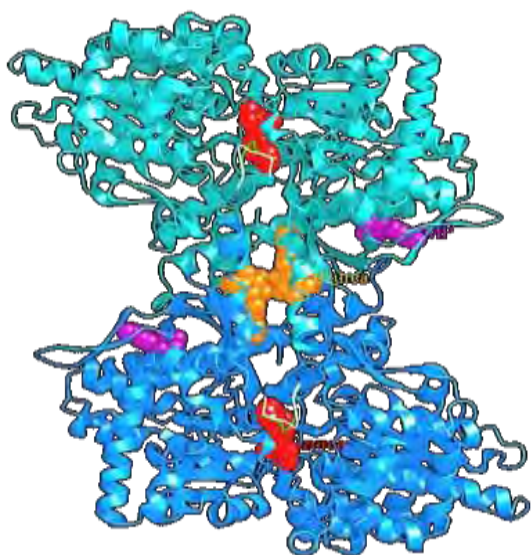


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΩΣ
ΕΝ ΔΥΝΑΜΕΙ ΦΑΡΜΑΚΑ ΜΕ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ
ASSESSMENT OF GLYCOGEN PHOSPHORYLASE INHIBITORS FOR THEIR
DRUGABILITY WITH COMPUTATIONAL METHODS



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΙΚΟΛΕΟΥΣΑΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Γ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ

ΛΕΚΤΟΡΑΣ Τ.Β.Β.

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ

ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Τ.Β.Β.

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ:

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Μ. ΚΟΝΤΟΥ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ:

ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ
ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια των σπουδών μου στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστίες οφείλω πρωτίστως στον κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο, λέκτορα του τμήματος στον τομέα της Βιοφυσικής και επιβλέποντα της εργασίας μου για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, καθώς και τη συμβολή και συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα θερμά να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτριο Λεωνίδα, αναπληρωτή καθηγητή Βιοχημείας του τμήματος για την ανάθεση του πειραματικού μέρους της εργασίας που εκτελέστηκε εξολοκλήρου στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών στην Αθήνα, υπό την καθοδήγηση του Dr. Joseph M. Hayes, καθώς και για την ενθάρρυνσή του και την πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησής της, αλλά και για τη γενικότερη συμβολή του στη μελλοντική μου επαγγελματική σταδιοδρομία. Επί τη ευκαιρία, θα ήθελα να εκφράσω ιδιαίτερα τις ευχαριστίες μου και προς τον Dr. Joseph M. Hayes, καθοδηγητή και συνεργάτη μου σε όλη τη διάρκεια των εργαστηριακών ερευνών της εργασίας, για την πλήρη υποστήριξή του, τον ενθουσιασμό του, τις πολύτιμες συμβουλές του, και γενικά για το άριστο κλίμα συνεργασίας μας και για κάθε βοήθεια που πρόθυμα μου προσέφερε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Κοντού επίκουρο καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, που δέχτηκε να οριστεί μέλος της επιτροπής έγκρισης της εργασίας, καθώς και τους φίλους μου και την οικογένειά μου που με στήριζαν και με συμβούλευαν σε κάθε βήμα της φοιτητικής μου ζωής.

Λάρισα, Φεβρουάριος 2013

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή	1
1.1 Διαβήτης - διαβήτης τύπου 2 (T2D)	1
1.2 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) ως στόχος για τον T2D:	2
1.3 Θέσεις δέσμευσης επί της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP binding sites):	5
1.3.1 Καταλυτικό κέντρο (Catalytic Site)	5
1.3.2 Αλλοστερικό κέντρο (Allosteric site)	7
1.3.3 Κέντρο αναστολής (Inhibitor site)	8
1.3.4 Νέο αλλοστερικό κέντρο	9
1.3.5 Αποθήκευτικό κέντρο (Glycogen Storage Site)	10
1.4 Δυνατότητα παρασκευής φαρμάκων από γνωστούς αναστολείς:	10
Κεφάλαιο 2: Μέθοδοι πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων ADME(T)	14
2.1 Εισαγωγή	14
2.2 Διαλυτότητα των φαρμάκων, διαπερατότητα του εντέρου και τοξικότητα	16
2.3 Ανάπτυξη υπολογιστικών μοντέλων για τις ιδιότητες ADME(T)	17
2.3.1 Εισαγωγή	17
2.3.2 Στατιστικά εργαλεία και γενικές εκτιμήσεις για τις προβλέψεις των ιδιοτήτων ADME(T)	18
2.3.3 Πόροι για προβλέψεις των ιδιοτήτων ADME(T)	20
Κεφάλαιο 3 : Προγράμματα/ Διακομιστές για προβλέψεις των ιδιοτήτων ADME(T) που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εργασία	22
3.1. Πρόγραμμα QikProp	22
3.1.1 Προβλέψεις ADME χρησιμοποιώντας το QikProp	22
3.1.2 Μεθοδολογία του QikProp	25
3.1.3 Ποιότητα των αποτελεσμάτων	25
3.1.4 Περιορισμοί του QikProp	29
3.2 Το πρόγραμμα/διακομιστής AlogPS	29

3.3 Το πρόγραμμα/ διακομιστής FAF-Drugs2	31
Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι Μοντελισμού.....	31
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	31
4.2 Προετοιμασία των προσδετών για τις προβλέψεις των ιδιοτήτων ADMET	31
4.3 Οι υπολογισμοί του Qikprop	31
4.4 Οι υπολογισμοί του ALOGPS	34
4.5 Οι υπολογισμοί του FAF-Drugs2	31
4.6 Αξιολόγηση Κανόνων για την «από του στόματος» βιοδιαθεσιμότητα	31
4.6.1 Ο Κανόνας των Πέντε του Lipinski (Lipinski’s Rule of Five).....	31
4.6.2 Ο κανόνας των τριών του Jorgensen (Jorgensen’s Rule of Three) και Μέθοδοι Μοντελισμού	31
4.6.3 Οι κανόνες του Veber (Veber’s Rules).....	38
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα πρόβλεψης ιδιοτήτων ADME(T) - Προσδέτες στο κέντρο Αναστολής.....	38
5.1 Εισαγωγή	38
5.2 Αποτελέσματα.....	39
5.2.1 Βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα	39
5.2.2 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός.	40
5.2.3 Δέσμευση πρωτεϊνών πλάσματος.....	40
5.2.4 Τοξικότητα.	40
5.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	43
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα των προβλέψεων των ιδιοτήτων ADME(T) – Προσδέτες στο Νέο αλλοστερικό κέντρο.	43
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	43
6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
6.2.1 Προσδέτες των Ομάδων I και II.....	45
6.2.2 Προσδέτες της Ομάδας III:.....	52
6.2.3 Ομάδα συνδέτες IV - Παράγωγα Βενζαμιδίου.....	45

6.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	58
Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα προβλέψεων των ιδιοτήτων ADME(T) – Προσδέτες στο αλλοστερικό κέντρο.	58
7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	58
7.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	60
7.2.1. Προσδέτες ακυλο-ουρίας	60
7.2.2. Παράγωγα Φθαλικού οξέος ομάδας I & ομάδας II.....	65
7.2.3. Παράγωγα διοξυ-διυδροπυριδίνης.....	69
7.2.4 Πεντακυκλικά τριτερπένια.....	73
7.2.5 Άλλοι αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου	79
7.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84

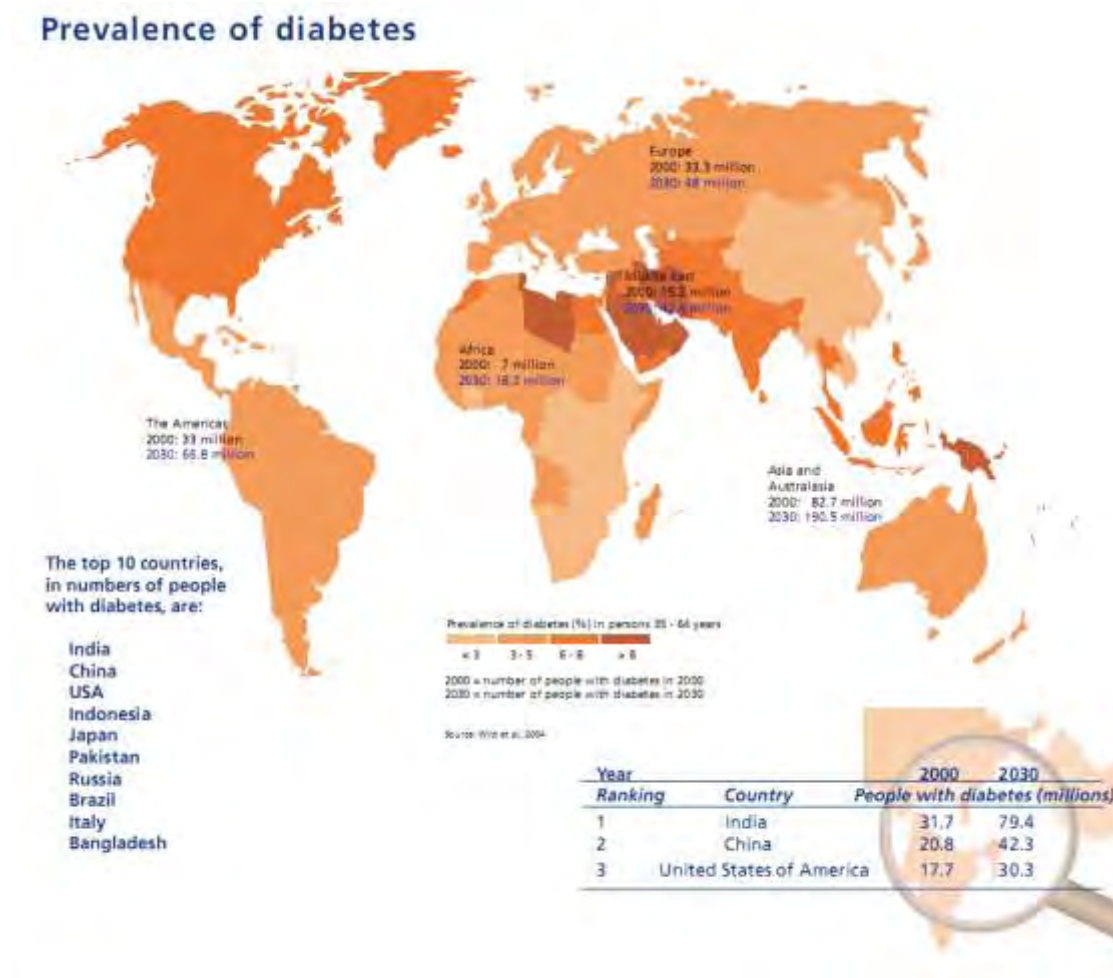
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Διαβήτης - διαβήτης τύπου 2 (T2D)

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια συνήθης ασθένεια οφειλόμενη σε ορμονική ανεπάρκεια. Χαρακτηρίζεται από χρόνια αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, κυρίως λόγω δυσλειτουργίας της ινσουλίνης στο ήπαρ η οποία οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ. Υπάρχουν δύο μορφές διαβήτη, ο διαβήτης τύπου 1 ή ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης και ο διαβήτης τύπου 2 (T2D), που αφορά 90-95% των περιπτώσεων, και χαρακτηρίζεται από αντίσταση στην ινσουλίνη και / ή μη φυσιολογική έκκριση ινσουλίνης στους ιστούς-στόχους, καθώς και ενεργοποίηση της οδού παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ (γλυκογονόλυση- γλυκονεογένεση) [1]. Σήμερα, έχουν πληγεί περίπου 220 εκατομμύρια άνθρωποι σε όλο τον κόσμο, όμως ο αριθμός αυτός αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς [1, 2]. Η νόσος αποτελεί βασική απειλή για την ανθρώπινη υγεία, καθώς τα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα της είναι αγγειακές βλάβες που οδηγούν σε τύφλωση, νεφρική ανεπάρκεια και ισχαιμική καρδιακή νόσο, ενώ είναι πιθανόν να οδηγήσει επίσης και σε περιφερική νευροπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια [3]. Προς το παρόν, η θεραπεία για το διαβήτη τύπου 2 βασίζεται σε κατάλληλη διαίτα (τροφές με χαμηλά επίπεδα υδατανθράκων), άσκηση και υπογλυκαιμικά φαρμάκα που στοχεύουν στη μείωση της υπεργλυκαιμίας, ενώ σαν ύστατη λύση σε προχωρημένα στάδια της ασθένειας γίνεται χορήγηση ινσουλίνης [4]. Αυτές οι φαρμακευτικές αγωγές έχουν περιορισμένη αποτελεσματικότητα και ανοχή (είναι ανεπαρκείς για το 30-40% των ασθενών), καθώς και ανεπιθύμητες παρενέργειες [5] όπως τη δυνατότητα να προκαλέσουν υπογλυκαιμία (σοβαρό υπογλυκαιμικό σοκ για παρατεταμένο χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει τον ασθενή σε κώμα ή και θάνατο).

Η γλυκογονόλυση (δηλαδή ο καταβολισμός του γλυκογόνου σε γλυκόζη) μπορεί να είναι υπεύθυνη για περισσότερο από 70% της παραγωγής γλυκόζης από το ήπαρ, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό της γλυκόζης που σχηματίζεται από τη γλυκονεογένεση (δηλαδή τη σύνθεση γλυκόζης από μη-υδατανθρακικά πρόδρομα μόρια) δημιουργείται μέσω της "δεξαμενής" του γλυκογόνου. Επιπλέον, η ηπατική αντίσταση στην ινσουλίνη επηρεάζεται και από την έλλειψη της καταστολής της

γλυκογονόλυσης. Έτσι, θεωρείται ότι η αναστολή της γλυκογονόλυσης από αναστολείς μπορεί να είναι ωφέλιμη για τη θεραπεία της T2D [1, 6].



Εικόνα 1.1: Ο πληθυσμός που υπολογίζεται ότι έχει προσβληθεί από T2D παγκοσμίως [2].

1.2 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP) ως στόχος για τον T2D:

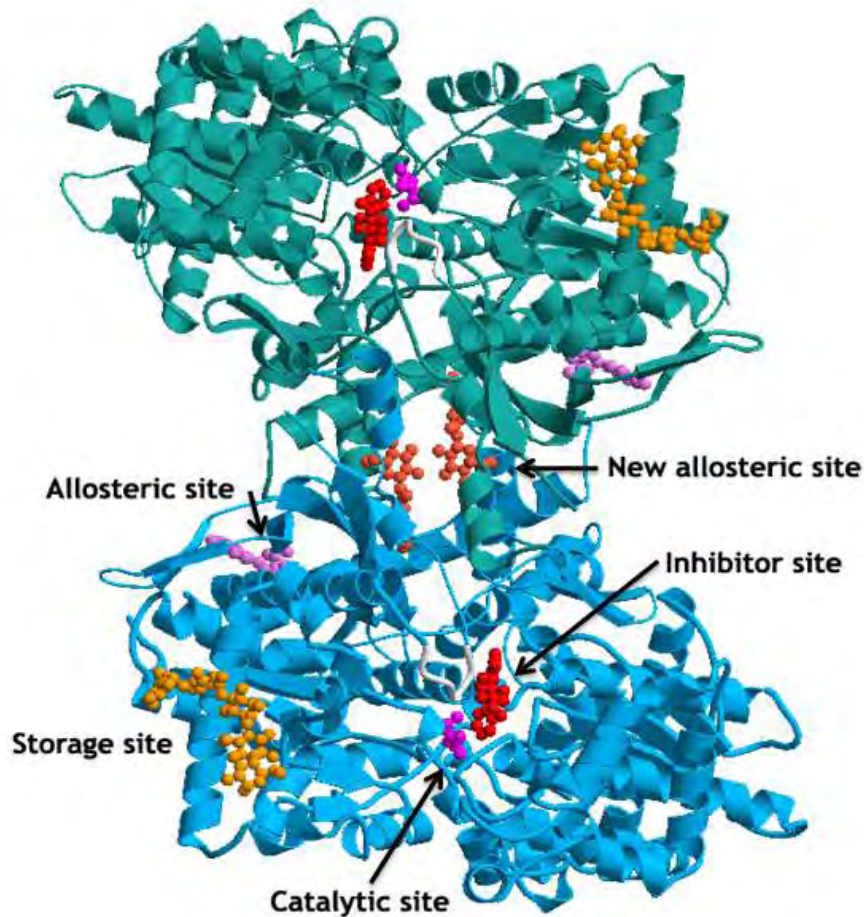
Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (GP-Glycogen Phosphorylase) αποτελεί βασικό ένζυμο του ανθρώπινου μεταβολισμού των υδατανθράκων και το κύριο ρυθμιστικό ένζυμο της γλυκογονόλυσης [1]. Η GP είναι ένα διμερές αποτελούμενο από δυο

ταυτόσημες υπομονάδες μοριακού βάρους περίπου 97.500 Da που αποτελούνται από 841 αμινοξικά κατάλοιπα (ανθρώπινη μυϊκή GPb- HMGPb) ή 846 (ανθρώπινη ηπατική GPa- HLGPa) και ένα μόριο φωσφορικής πυριδοξάλης. Και οι δύο ισομορφές του ενζύμου είναι αρκετά όμοιες και συντηρημένες σε σύγκριση με την μυϊκή GPb του κουνελιού (RMGPb). Στον μυ η GP βρίσκεται σε δύο μορφές:

- GPb (η μη-φωσφορυλιωμένη μορφή, με χαμηλή δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα, και η οποία βρίσκεται κυρίως στην αδρανή κατάσταση T). Η διαμόρφωση T σταθεροποιείται από τη δέσμευση ATP, της 6-φωσφορικής γλυκόζης, και από υποστρώματα όπως η γλυκόζη, η καφεΐνη, και την ένωση Bayer W1807.
- GPa (φωσφορυλιωμένη μορφή, με υψηλή δραστηριότητα και συγγένεια για το υπόστρωμα, βρίσκεται κυρίως στην ενεργή κατάσταση R). Η κατάσταση R σταθεροποιείται από AMP (ή IMP), κάποια υποστρώματα ή ορισμένα ανάλογα υποστρωμάτων, και φωσφορυλίωση. Η GP καταλύει τη διάσπαση του γλυκογόνου σε 1-φωσφορική γλυκόζη (GLC-1-P), η οποία στους μυς, μετατρέπεται μέσω γλυκόλυσης σε μεταβολική ενέργεια. Στο ήπαρ όμως, η γλυκόζη-1-P μετατρέπεται ως επί το πλείστον από τη φωσφογλυκομουτάση (phosphoglucosmutase) και τη φωσφατάση της 6-γλυκόζης (glucose-6-phosphatase) σε γλυκόζη, ώστε να απελευθερωθεί προς όφελος άλλων ιστών, ιδίως του κεντρικού νευρικού συστήματος, το οποίο βασίζεται στη γλυκόζη ως βασική πηγή καυσίμων [1, 6].

Η γλυκόζη είναι ένας φυσιολογικός ρυθμιστής του ηπατικού μεταβολισμού του γλυκογόνου που προάγει την αδρανοποίηση της GPa και δρα συνεργιστικά με την ινσουλίνη οδηγώντας σε μειωμένη αποικοδόμηση του γλυκογόνου και ενίσχυση της σύνθεσής του. Ως απάντηση σε νευρικά ή ορμονικά σήματα, η GPb μετατρέπεται σε GPa μέσω της κινάσης της φωσφορυλάσης που καταλύει την προσθήκη μιας φωσφορικής ομάδας στην υδροξυλική ομάδα μιας συγκεκριμένης σερίνης (Ser14). Η αντίστροφη αντίδραση της αποφωσφορυλίωσης που αδρανοποιεί το ένζυμο, καταλύεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (protein phosphatase 1, PP1), ένα ένζυμο του οποίου η δράση ρυθμίζεται από την έκκριση ινσουλίνης. Η μετατροπή της GPa σε GPb σταματά την αλλοστερική αναστολή που ασκεί η GPa στην PP1, και η

οποία με τη σειρά της μετατρέπει τη συνθάση του γλυκογόνου D (ανενεργή μορφή) στη μορφή I (ενεργή μορφή), επιτρέποντας έτσι τη σύνθεση του γλυκογόνου [1].



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση της GP με τις θέσεις δέσμευσης προσδετών.

Έτσι, η GP_a είναι ένας αναστολέας της δράσης της φωσφατάσης επί της συνθάσης του γλυκογόνου και μόνο όταν η GP έχει αποφωσφορυλιωθεί (μετατρέπόμενη σε GP_b) η φωσφατάση είναι ελεύθερη να ενεργοποιήσει τη συνθάση του γλυκογόνου, το "περιοριστικό" ένζυμο που εμπλέκεται στη σύνθεση του γλυκογόνου.

Η αναστολή της ηπατικής GP θα μπορούσε να καταστείλει την παραγωγή γλυκόζης που προκύπτει τόσο από γλυκογονόλυση όσο και από γλυκονεογένεση, θέτοντάς την ως πιθανό θεραπευτικό στόχο για τη θεραπεία της T2D. Το ένζυμο GP είναι μια τυπική αλλοστερική πρωτεΐνη με πέντε διαφορετικές θέσεις (περιοχές) δέσμευσης-σύνδεσης προσδέτη (Εικόνα 1.2), προσφέροντας έτσι την ευκαιρία να

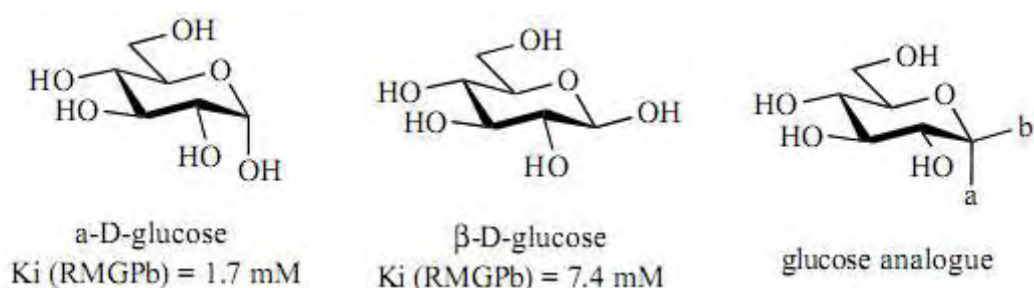
χρησιμοποιηθούν διαφορετικές προσεγγίσεις για την τροποποίηση της δραστικότητας του ενζύμου. Ωστόσο, οι θέσεις δέσμευσης έχουν τα δικά τους μοναδικά χαρακτηριστικά, και απαιτούνται διαφορετικές τεχνικές μοντελοποίησης για κάθε μία. Οι κύριες θέσεις δέσμευσης που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα είναι οι εξής: καταλυτικό κέντρο, κέντρο αναστολής, αλλοστερικό κέντρο, νέο αλλοστερικό κέντρο και αποθηκευτικό κέντρο γλυκογόνου (catalytic, inhibitor, allosteric, new allosteric and glycogen storage sites). Η πρόοδος όσον αφορά την πρόβλεψη και τον σχεδιασμό νέων αναστολέων GP (GPIs) που να δεσμεύονται σε αυτές τις περιοχές έχει επιταχυνθεί από τη διαθεσιμότητα πολλών υψηλής ευκρίνειας δομών των συμπλόκων GP-GPI. Η γνώση της τριδιάστατης (3D) δομής των συμπλόκων "πρωτεΐνη-προσδέτης" αποκαλύπτει τις αλληλεπιδράσεις "υποδοχέα-προσδέτη", που είναι απαραίτητες για την αναγνώριση του προσδέτη σε κάθε σημείο δέσμευσης (η γνώση χαρακτηριστικών όπως κατάλοιπα -"κλειδιά" για κάθε θέση δέσμευσης, η ευελιξία της κάθε περιοχής, ο βαθμός έκθεσης σε διαλύτες και η υδροφοβικότητά τους είναι πολύ σημαντικά), και έτσι διευκολύνεται ο σχεδιασμός φαρμάκων (αναστολέων) με βάση τη δομή. Η υπολογιστική (computation) παρέχει ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την αξιοποίηση των γνωστών στοιχείων των δομών στον σχεδιασμό και στην πρόταση νέων αναστολέων για πειραματική αξιολόγηση [6].

1.3 Θέσεις δέσμευσης επί της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (GP binding sites):

1.3.1 Καταλυτικό κέντρο (Catalytic Site)

Το καταλυτικό κέντρο είναι μια βαθιά κοιλότητα που βρίσκεται στο κέντρο της μονομερούς υπομονάδας GP, 15 Å από την επιφάνεια της πρωτεΐνης, κοντά στον συμπάραγοντα 5'-φωσφορική πυριδοξάλη (PLP). Οι αναστολείς στη θέση αυτή, προάγουν την T διαμόρφωση (λιγότερο δραστική) μέσω σταθεροποίησης της κλειστής θέσης του 280s βρόχου (κατάλοιπα 282 έως 287) εμποδίζοντας την πρόσβαση του υποστρώματος γλυκογόνου στο καταλυτικό κέντρο. Η α-D-γλυκόζη ($K_i=1.7$ mM για GPb, $K_i=2.0$ mM για GPa) [1, 6] είναι ο φυσιολογικός αναστολέας

του κέντρου αυτού, στο οποίο επίσης συνδέεται και η β-D-γλυκόζη ($K_i=7.4$ M για GPb) [1]. Ως εκ τούτου, ο σχεδιασμός αναστολέων για αυτό το κέντρο έχει επικεντρωθεί κυρίως σε παράγωγα της γλυκόζης με α- και β- υποκαταστάσεις στο άτομο άνθρακα C1, με τις β- υποκαταστάσεις να έχουν στόχο την εκμετάλλευση μίας εσωτερικής κοιλότητας του καταλυτικού κέντρου (β-cavity), που είναι κενή και καλύπτεται από πολικές και μη-πολικές ομάδες.



Σχήμα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των α-D-γλυκόζης και β-D-γλυκόζης καθώς και των αναλόγων της γλυκόζης. [6]

Η σύνδεση στο καταλυτικό κέντρο με προσδέτες όπως συνθετικά ανάλογα της β-D-γλυκόζης, παράγωγα του α- και β-ανυδρογλυκοεπτονικού οξέος, υδαντοσιδίνες, N-ακετυλ-β-D-γλυκοπυρανοζιλαμίνες, ανάλογα θειογλυκόζης, παράγωγα ανοιχτής αλυσίδας σπιρουδαντοΐνης και τριαζόλης, ανάλογα γλυκερόλης και ιμινοσάκχαρα έχει μελετηθεί διεξοδικά [7]. Κατά τη διάρκεια των μελετών με ανάλογα της β-D-γλυκόζης και τα α- και β- ανυδρογλυκοεπτονικά οξέα αποσαφηνίστηκαν [7] σημαντικά θέματα σε σχέση με:

- 1) τη φύση των ατόμων που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου αλλά και η κατεύθυνση των δεσμών υδρογόνου,
- 2) την απώλεια της εντροπίας διαμόρφωσης, είτε με τη μορφή της ευελιξίας, είτε με τη μορφή ασυνήθιστης διαμόρφωσης του προσδέτη κατά τη σύνδεσή του στο ένζυμο,
- 3) τη συμπληρωματικότητα των αλληλεπιδράσεων van der Waals, και

4) τις επιπτώσεις της ενέργειας απομάκρυνσης συνδεδεμένων μορίων του διαλύτη είτε από την πρωτεΐνη είτε από τον προσδέτη στην συνολική ενέργεια δέσμευσης του προσδέτη.

Για τον σχεδιασμό των αναστολέων έχει επιβληθεί ο περιορισμός ότι ο αναστολέας πρέπει να σταθεροποιεί την T διαμόρφωση του ενζύμου και αυτός να μιμείται τις επαφές της γλυκόζης που οριοθετούν την κλειστή θέση του βρόχου 280s. Εν τούτοις, μερικοί προσδέτες κατά τη δέσμευση στο καταλυτικό κέντρο, προκαλούν διάφορες μεταβολές στη διαμόρφωση του βρόχου 280s οι οποίες απαιτούν περαιτέρω εξέταση σε μελέτες μοντελισμού, ανάλογα με τον βαθμό της μεταβολής [1].

1.3.2 Αλλοστερικό κέντρο (Allosteric site)

Οι δύο υπομονάδες της διμερούς λειτουργικής GP συνδέονται σε δύο θέσεις που εντοπίζονται σε αντίθετες πλευρές του ενζυμικού μορίου. Η μια επαφή είναι η διεπαφή cap/a2 και η δεύτερη επαφή υπομονάδας - υπομονάδας περιλαμβάνει τη διεπαφή του πύργου (tower interface) [2]. Το αλλοστερικό κέντρο (κέντρο σύνδεσης AMP) εντοπίζεται στην διεπαφή υπομονάδας - υπομονάδας, περίπου 30 Å μακριά από το καταλυτικό κέντρο και είναι μερικώς εκτεθειμένο στον διαλύτη. Αυτή η περιοχή αναγνωρίζει μια πληθώρα φωσφορυλιωμένων ενώσεων, όπως IMP (αδύναμος ενεργοποιητής), ATP, γλυκόζη-6-P (GLC-6-P), NADH, UDP-γλυκόζη, 2-δεοξυ-γλυκόζη-6-P, β-γλυκεροφωσφορικό άλας, και ανόργανα φωσφορικά αλάτια. Δεσμεύει επίσης αλλοστερικούς αναστολείς, όπως η ένωση Bayer W1807, ακυλουρίες, τριτερπένια και τη σειρά της GlaxoSmithKline από ανθρανιμιδικούς αναστολείς της φωσφορυλάσης (anthranilimide GPIs).

Η σύνδεση των αναστολέων σε αυτή τη θέση αναστέλει τη σύνδεση του AMP ή / και τη σύνδεση υποστρώματος μέσω σταθεροποίησης της διαμόρφωσης T ή της διαμόρφωσης T' της συμμετρικής υπομονάδας. Παρ' όλα αυτά, αλλοστερικοί ενεργοποιητές, όπως το AMP ή αλλοστερικοί αναστολείς, όπως το ATP και η Glc-6-P (6-φωσφορική γλυκόζη), μπορούν να μεταβάλουν την ισορροπία ανάμεσα σε μια λιγότερο ενεργή κατάσταση T και μια πιο ενεργή κατάσταση R ή και το αντίστροφο.

Η χημική ένωση "Bayer W1807", η οποία έχει ελάχιστη χημική ομοιότητα με οποιοδήποτε από τα γνωστά φυσιολογικά ρυθμιστικά μόρια της GP, αποτελεί σήμερα τον πιο ισχυρό γνωστό αναστολέα της GP ($K_i = 1.6 \text{ nM}$ για GPb, $K_i = 10.8 \text{ nM}$ για GPa) [6], ο οποίος δρα συνεργατικά με τη γλυκόζη και την καφεΐνη. Εμφανίζει υπογλυκαιμική δράση (μείωση της γλυκόζης του αίματος) σε ποντίκια και μειώνει την γλυκογονόλυση, τόσο με αδρανοποίηση όσο και με αναστολή της υπολειμματικής GPa. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του W1807 και της GPb είναι κυρίως αλληλεπιδράσεις φορτίου-φορτίου μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων και των καταλοίπων αργινίνης, καθώς και αλληλεπιδράσεις τριών μεγάλων ομάδων μη-πολικών επαφών [1]. Η σύνδεση του W1807 στην T διαμόρφωση στον κρύσταλλο συνοδεύεται από σημαντικές δομικές μεταβολές. Υπάρχουν όμως σημαντικές διαφορές ως προς το είδος των επαφών που πραγματοποιούνται από την GLC-6-P και το W1807 στο αλλοστερικό κέντρο. Οι αλληλεπιδράσεις της GLC-6-P με το ένζυμο είναι κυρίως αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου ενώ υπάρχουν και λίγες σχετικά αλληλεπιδράσεις van der Waals. Αντίθετα, στις αλληλεπιδράσεις W1807 με την GPb κυριαρχούν οι μη-πολικές αλληλεπιδράσεις van der Waals και οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις λόγω φορτίου με κατάλοιπα αργινίνης.

Η ικανότητα της GP να αναγνωρίζει ανόμοιες ενώσεις χρησιμοποιώντας τα ίδια κατάλοιπα {δηλ. η δυνατότητα να διακρίνει μεταξύ των AMP (ή ATP), 6-φωσφορικής γλυκόζης (ή 2-δεοξυ-6-φωσφορικής γλυκόζης) και W1807} φαίνεται να προέρχεται από την ευελιξία της πρωτεΐνης σε αυτή την περιοχή που οδηγεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει σημαντικός βαθμός προσαρμοστικότητας στο αλλοστερικό κέντρο [1].

1.3.3 Κέντρο αναστολής (Inhibitor site)

Το κέντρο αναστολής βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου ($\sim 12 \text{ \AA}$) και απαρτίζεται από αμινοξέα με υδροφοβικά χαρακτηριστικά (Phe285 από τον βρόχο 280s και Tyr613) (εδώ π.χ. συνδέεται η φλαβοπριδόλη-επιστοιβάζεται μεταξύ των 2 αρωματικών αμινοξέων) και εμποδίζει την είσοδο στο καταλυτικό κέντρο. Η αναστολή στην θέση αναστολέα έχει γενικά συνεργιστική δράση με τη γλυκόζη.

Στη διαμόρφωση T, ο φαινυλικός δακτύλιος του καταλοίπου Phe285 στοιβάζεται κοντά σε αυτόν του Tyr613 και αυτά τα δύο αρωματικά κατάλοιπα αποτελούν τον πυρήνα της θέσης αναστολέα. Στο κέντρο αναστολής, οι GPIs δρουν μέσω της σταθεροποίησης της T διαμόρφωσης του ενζύμου και εμποδίζουν την πρόσβαση του υποστρώματος γλυκογόνου στο καταλυτικό κέντρο. Προσδέτες με μεγάλη ποικιλομορφία, όπως ενώσεις πουρίνης σαν τις πουρίνες καφεΐνης (π.χ. αδενίνη και καφεΐνη), νουκλεοσίδια (π.χ. αδενοσίνη και ινοσίνη) και νουκλεοτίδια (π.χ. AMP, IMP και ATP) δεσμεύονται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σε μυϊκή GPb και GPa, το NADH και ορισμένες συναφείς ετεροκυκλικές ενώσεις όπως FMN (Φλαβινο- μονο-νουκλεοτίδιο), FAD (Φλαβινο-αδενινο δινουκλεοτίδιο), και η ριβοφλαβίνη έχει βρεθεί ότι συνδέονται σε αυτή τη θέση, ενώ στο ήπαρ, η GPa δείχνει μια μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τους αναστολείς. Οι αλληλεπιδράσεις σε αυτή τη θέση είναι κυρίως υδρόφοβες, με τους ισχυρούς GPIs να έχουν αρωματικούς δακτυλίους που μπορούν να συμμετέχουν σε π-π επιστοιβάξεις μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των Tyr613 και Phe285 σχηματίζοντας σύμπλοκα τύπου "σάντουιτς" (sandwich type complexes).

1.3.4 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Το νέο αλλοστερικό κέντρο ή κέντρο σύνδεσης indole-2-carboxamides βρίσκεται στην περιοχή της κεντρικής κοιλότητας του διμερούς και απέχει ~15 Å από το αλλοστερικό, ~33 Å από το καταλυτικό και ~37 Å από το κέντρο αναστολής και περιβάλλεται σε κάθε πλευρά από κατάλοιπα από τα N-τελικά άκρα και των δύο υπομονάδων. Η κοιλότητα έχει περίπου 30 Å μήκος με ακτίνα 4-8 Å και καταλαμβάνει όγκο 1300 Å³ στην T διαμόρφωση της GPb. Η θέση σύνδεσης της ένωσης CP320626 (και άλλων αναστολέων) βρίσκεται περίπου 15 Å από το αλλοστερικό κέντρο, 33 Å από το καταλυτικό κέντρο και 37 Å από το κέντρο αναστολής. Η CP320626 (IC₅₀ = 0.2 μM για HLGPa, IC₅₀ = 0.083 μM για HMGPa), που σχεδιάστηκε από μελέτες με την ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ηπατική GPa (HLGPa), είναι ένας ισχυρός αναστολέας της φυσικής ανθρώπινης ηπατικής GPa που προάγει τη μείωση της γλυκόζης σε διαβητικά ποντίκια χωρίς να μεταβάλλει το επίπεδο της ινσουλίνης στο πλάσμα [6, 7]. Είναι επίσης ένας ισχυρός αναστολέας της

μυϊκής GPb (HMGPb) που δρα συνεργιστικά με τη γλυκόζη, ένα σημαντικό φυσιολογικό χαρακτηριστικό για έναν αναστολέα ηπατικής GPa, αφού η δραστηριότητα του αναστολέα μειώνεται καθώς μειώνεται η συγκέντρωση της γλυκόζης *in vivo*, ελαχιστοποιώντας έτσι τον κίνδυνο υπογλυκαιμίας. Η δομή του συμπλόκου GP-CP320626 αποκάλυψε ότι συγκεκριμένες αρωματικές-αρωματικές και αμινο-αρωματικές αλληλεπιδράσεις είναι υπεύθυνες για την υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα του ενζύμου για την CP320626 [8, 9].

Αναστολείς που δεσμεύονται σε αυτό το κέντρο σταθεροποιούν την διαμόρφωση T του ενζύμου και ως εκ τούτου παρεμποδίζουν τη δράση της GPb κλειδώνοντας το ένζυμο σε μία ανενεργή διαμόρφωση. Καθώς το κέντρο είναι προσβάσιμο στον διαλύτη, υπάρχει μια σειρά από μόρια ύδατος που μεσολαβούν στις επαφές υποδοχέα-προσδέτη. Η σύνδεση γίνεται με μικρές μόνο δομικές μεταβολές και την εκτόπιση εννέα μορίων ύδατος, προκαλώντας αύξηση στην εντροπία. Υδρόφοβες σχισμές όπως αυτές που διαμορφώνονται από λιπόφιλες πλευρικές αλυσίδες αμινοξέων (Leu63, Val64 και Trp67) αν και είναι εκτεθειμένες στο διαλύτη, μπορούν να συμβάλουν στη σύνδεση. Αν και οι υδρόφιλες και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν τη λιγότερο ενεργή διαμόρφωση T του ενζύμου, υπολογίζεται από μελέτες ότι η υδρόφοβη συμβολή στην πρόσδεση είναι κοντά στο 95% [10].

1.3.5 Αποθήκευτικό κέντρο (Glycogen Storage Site)

Το κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου (μέσω του οποίου η φωσφορυλάση συνδέεται στα σωμάτια γλυκογόνου *in vivo*) βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου, ~30 Å από το καταλυτικό, ~40 Å από το αλλοστερικό κέντρο και 50 Å από το νέο αλλοστερικό κέντρο. Αυτή η θέση δέσμευσης του ενζύμου GP έχει τύχει μειωμένης προσοχής ως πιθανός στόχος στην τροποποίηση της δραστηριότητας της GP και δεν έχει αναφερθεί καμία αξιολογη υπολογιστική μελέτη. Ωστόσο, έχει μελετηθεί κινητικά και κρυσταλλογραφικά η σύνδεση των α-, β - και γ- κυκλοδεξτρινών (κυκλο-ολιγοσακχαρίτες με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς, 6, 7, ή 8 D-γλυκοπυρανοζυλικών μονάδων αντίστοιχα) [6].

1.4 Δυνατότητα παρασκευής φαρμάκων από γνωστούς αναστολείς:

Ο σχεδιασμός αναστολέων της GP και η επιλογή των καλύτερων υποψηφίων φαρμακευτικών σκευασμάτων για περαιτέρω επεξεργασία, είναι μια σύνθετη διαδικασία. Πολλοί από αυτούς έχουν δημιουργηθεί με σύγκριση προς τους "φυσιολογικούς" προσδέτες καθενός συγκεκριμένου κέντρου και μερικοί προέκυψαν μετά από μη εστιασμένες μελέτες, δεδομένου του κόστους. Οι υπολογιστικές μέθοδοι είναι σήμερα ευρέως διαδεδομένες, έτσι ώστε να κατευθύνουν την πειραματική διαδικασία. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός GPIs (χημικές ενώσεις και παράγωγα) που έχουν πρόσφατα ανακαλυφθεί και μελετηθεί σε μοριακό επίπεδο, χρησιμοποιώντας κινητικές και κρυσταλλογραφικές μεθόδους για τα διάφορα κέντρα σύνδεσης της GP, όπως αυτά αναφέρονται στο προηγούμενο μέρος αυτής της εισαγωγής [7, 11, 12, 13]. Ωστόσο, λίγα πειράματα έχουν διεξαχθεί *ex vivo* (σε ηπατοκύτταρα) και ακόμη λιγότερα *in vivo* (π.χ. σε ποντίκια). Αναστολείς για τους οποίους έχουν διεξαχθεί τέτοιες μελέτες είναι για παράδειγμα το μονοφωσφορικό AICAR, σύμπλοκο A στη [14], 1-GlcNAc, 1-GlcNAc 6-P, F2-Glc, ισοφαγομίνη, DAB, BAY3401, BAY1807, 6-{2,6-διχλωρο-4-[3-(2-χλωρο-βενζοϋλ)-ουρεΐδο]-φαινοξυ}-εξανοϊκό οξύ, S1048, παράγωγα του φθαλικού οξέος, CP-91149, CP-320626, φλαβοπυριδόλη, κ.α. [1, 6, 11, 12, 13, 15].

Συχνά ενώσεις οι οποίες είναι αποτελεσματικοί αναστολείς για την καθαρή μορφή του ενζύμου, βρίσκονται να είναι αναποτελεσματικοί στην αναστολή της γλυκογονόλυσης σε ηπατοκύτταρα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε χαμηλά ποσοστά απορρόφησης των ενώσεων (κάτι που μπορεί να επιβεβαιωθεί μόνο από μελέτες απορρόφησης με ραδιοσημασμένες ενώσεις) ή, εναλλακτικά, σε πιο πολύπλοκους μηχανισμούς, όπως δείχθηκε για το 1-GlcNAc [15, 16]. Το DAB είναι ένας ισχυρός αναστολέας της ηπατικής GP ($K_i=0.4 \mu\text{M}$) [15] (καλύτερος από ό,τι το NAG για το ήπαρ, το NAG αναστέλλει την RMGPb με $K_i=32 \mu\text{M}$) [6, 17] και έχει μελετηθεί εκτενώς *in vitro* και *in vivo*. Αναστέλλει τη γλυκογονόλυση σε ηπατοκύτταρα ($IC_{50}=1 \mu\text{M}$), απουσία ή παρουσία γλυκαγόνης και συνδέεται στο καταλυτικό κέντρο. Επίσης, δεν εμφανίζει συνεργιστική δράση με την καφεΐνη

(αναστολέας της T διαμόρφωσης με $K_i=0.1-0.2$ mM) σε αντίθεση με τη γλυκόζη με την οποία έχει παρόμοια δομή [1].

Παραδοσιακά, οι επιστημονικές προσπάθειες (μετά την ανακάλυψη αναστολέων) επικεντρώνονται γενικά στην τροποποίηση της δομής των προσδετών για τη βελτίωση της δραστικότητάς τους, και ακολουθούν μελέτες για τις φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες τους ADME(T) (Απορρόφηση, Διάθεση, Μεταβολισμός, Απέκκριση) σε μεταγενέστερα στάδια. Η μεθοδολογία αυτή οδηγεί στην αποτυχία του 50% περίπου των υποψήφιων φαρμάκων [18, 19], καθώς η βελτιστοποίηση της δραστικότητας μπορεί να αποδώσει ενώσεις για τις οποίες η βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων ADME(T) γίνεται δύσκολη ή και αδύνατη. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, γίνονται μετρήσεις *in vitro* ή *in vivo* όσο το δυνατόν νωρίτερα στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων. Η εύρεση και παρακολούθηση αυτών των ιδιοτήτων στα αρχικά στάδια της διαδικασίας σχεδιασμού αναστολέων/ φαρμάκων μπορεί να αποτελεί μια πιο αποτελεσματική και χαμηλότερου κόστους στρατηγική συνδυάζοντας τόσο πειραματικές όσο και τεχνολογίες *in silico* [20]. Η βελτιστοποίηση της χημικής δομής λαμβάνοντας υπόψην τόσο την ανασταλτική ισχύ όσο και τις ιδιότητες ADME(T) ταυτόχρονα, αναμένεται να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας ανακάλυψης φαρμάκων [21].

Πρόσφατα, για παράδειγμα, η εταιρεία GlaxoSmithKline (GSK) κυκλοφόρησε μια σειρά από άρθρα για τη βελτιστοποίηση GPIs βασισμένων σε ανθρανιλιμίδη (anthranilimide) που συνδέονται στο αλλοστερικό κέντρο [22, 23, 24, 25]. Παρά το γεγονός ότι μια σειρά από GPIs έχουν παρεμφερείς δραστικότητες *in vitro*, ο "GSK anthranilimide" με IC_{50} (HLGPa) = 3 nM [22] θα μπορούσε να προβλεφθεί από τη διαδικασία SAR (structure activity relationship = σχέση δομής δραστικότητας) ως ο πλέον δραστικός όπως και ήταν. Επιπλέον, η Astellas Pharma A.E. διεξήγαγε έρευνα για τα παράγωγα του N-δικυκλο-5-χλωρο-1H-ινδολο-2-καρβοξαμιδίου (N-bicyclo-5-chloro-1H- indole-2-carboxamide) [26], κατά τον σχεδιασμό GPIs που συνδέονται στο νέο αλλοστερικό κέντρο, χρησιμοποιώντας την CP-320626 ως σημείο αναφοράς για περαιτέρω σχεδιασμό. Αξιοποιώντας τα δεδομένα του SAR από τα παράγωγα, σχεδίασαν το οπτικά ενεργό σύμπλοκο 30e [6] R εναντιομερές {30ea, IC_{50} = 20 nM (HLGPa) [27] Astellas Pharma (παράγωγο του N-δικυκλο-5-χλωρο-1H-ινδολο-2-

καρβοξαμίδιο)} το οποίο εμπόδισε την παραγωγή της γλυκόζης από τα ηπατοκύτταρα (IC_{50} των 690 nM) και την υπογλυκαιμική δράση σε διαβητικά db/db ποντίκια. Αποκάλυψε επίσης, εντυπωσιακά φαρμακοκινητικά αποτελέσματα σε αρσενικά SD ποντίκια με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα ($F = 100\%$) και μεγάλο χρόνο ημιζωής ($t_{1/2} = 12$ ώρες). Και στις δύο μελέτες χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη ηπατική φωσφορυλάση του γλυκογόνου (HLGPa), ενώ η τελευταία έκλεισε με τη δημιουργία ενός απλού «προσδεμένου» ("docked") μοντέλου, σε συνδυασμό με τα δεδομένα τοποθέτησης στον χώρο της χημικής ένωσης 22 [6] Astellas Pharma ($IC_{50} = 0,90 \mu M$ (HLGPa)) [28].

Τέτοιες ενδεδειγμένες *in vivo* ή/ και φαρμακοκινητικές (αλλά ακόμη και *in vitro* δοκιμασίες κυττάρων) αναλύσεις υπερβαίνουν τους πόρους πολλών ερευνητών που εργάζονται έξω από τη φαρμακευτική βιομηχανία, κάτι που επαληθεύεται από τις σχετικά λίγες πρόσφατες δημοσιεύσεις [22, 26, 28, 29, 30]. Ωστόσο, η υπολογιστική πρόβλεψη των ιδιοτήτων ADME(T) προσφέρει μια βιώσιμη εναλλακτική λύση για τη σχεδίαση αναστολέων με φαρμακευτικές ιδιότητες [31, 32, 33] και υπάρχει μια σειρά από ελεύθερα (δωρεάν) εργαλεία που διατίθενται για τον σκοπό αυτό [34, 35]. Μια πρόσφατη ανασκόπηση επισημαίνει ορισμένα από τα διαθέσιμα λογισμικά για πρόβλεψη της τοξικότητας προσδετών [36]. Ακόμη, λογισμικά όπως το QikProp [37, 38] (προβλέψεις ιδιοτήτων ADME) από την εταιρία Schrödinger, είναι επίσης διαθέσιμα μέσω των εμπορικών πακέτων λογισμικού για ανακάλυψη φαρμάκων. Η χρήση τέτοιων πακέτων, ακολουθώντας (ή μη) απλούς κανόνες (λεπτομέρειες πιο κάτω), όπως τον "κανόνα των πέντε" του Lipinski [39, 40] και [41] τις προτεινόμενες από τον Veber και τους συνεργάτες του ιδιότητες για την βιοδιαθεσιμότητα (F) με από του στόματος χορήγηση μιας ουσίας, μπορεί να βοηθήσει στην παρακολούθηση της φαρμακευτικής δυναμικής των GPIs στα πρώτα στάδια της διαδικασίας σχεδιασμού φαρμάκων. Με άλλα λόγια, φαίνεται να είναι σχετικά πιο εύκολο να αποφύγει κανείς προβλήματα που μπορεί να προκληθούν, για παράδειγμα, από την υδατοδιαλυτότητα (water Solubility) ή την λιποφιλικότητα (lipophilicity) των χημικών ενώσεων σε δοκιμασίες με GP *in vivo*, χρησιμοποιώντας απλούς υπολογισμούς για τη διαλυτότητα ($\log S$) και την λιποφιλικότητα ($\log P$) [42, 43] ώστε να ελέγξει τις ενώσεις πριν την έναρξη χρονοβόρων πειραματικών διαδικασιών, όπως η ίδια η εργαστηριακή σύνθεσή τους (η ίδια μορφή ελέγχου ισχύει βέβαια και για άλλες φυσικές ιδιότητες, αναλόγως ποιο υπολογιστικό πρόγραμμα χρησιμοποιείται

κάθε φορά, ποιές ιδιότητες υπολογίζει και τι ποσοστό επιτυχίας έχει). Δεδομένων των "ασαφειών" που σχετίζονται με τον μεγάλο αριθμό των πρόσφατα αναφερομένων αναστολέων της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, για τους οποίους υπάρχουν δεδομένα της δράσης τους μόνο για το καθαρό ένζυμο, ο βασικός στόχος αυτής της εργασίας είναι η διερεύνηση της δυνατότητας "φαρμακοποίησης" κάποιων εκ των αναστολέων αυτών (αναστολείς της GP με IC_{50} της τάξης των μM) σε σχέση με την πρόβλεψη των ιδιοτήτων ADME(T). Για το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας, έχει αξιοποιηθεί το πρόγραμμα QikProp από την Schrodinger.

Κεφάλαιο 2: Μέθοδοι πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων ADME(T)

2.1 Εισαγωγή

Ο προσδιορισμός και η επιβεβαίωση της πρωτεΐνης-στόχου με χρήση της γενωμικής, της πρωτεωμικής και της βιοπληροφορικής ακολουθούνται από την ανακάλυψη μορίων/ δομών-οδηγών (την αναζήτηση ενός φαρμακοφόρου, δηλ. ενός δομικού τμήματος που συνδέεται με έναν στόχο, ασκώντας μια συγκεκριμένη δράση με αποδεκτή θεραπευτική δραστηριότητα) και τη βελτιστοποίηση των δομών αυτών. Υπολογιστική χημεία (computational chemistry- CC) και υψηλής απόδοσης ελέγχος (high- throughput screening- HTS) χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση νέων ενώσεων και τη βελτιστοποίηση τους ως προς την αύξηση της δραστηριότητάς τους. Η διαδικασία της βελτιστοποίησης των δομών-οδηγών γίνεται σε κύκλους. Η χημική βιβλιοθήκη που λαμβάνεται μπορεί να αποτελείται από αρκετές χιλιάδες νέες δομές και στο τέλος της διαδικασίας, η δυνατότητα ανάπτυξης των ενώσεων ερευνάται συνήθως με χρήση ταχέων πειραματικών τεχνικών που προσμετρούν παράγοντες όπως η σταθερότητα, η διαλυτότητα, η διαπερατότητα και η τοξικότητα. Μετά από τα παραπάνω συμπεράσματα, μερικά "υποψήφια" φαρμάκα (candidate drugs- CD) επιλέγονται από τη βιβλιοθήκη για περαιτέρω ανάπτυξη.

Η αύξηση του αριθμού νέων δομών που δημιουργούνται κάθε χρόνο δεν οδήγησε στην (αναμενόμενη) αύξηση του αριθμού νέων φαρμάκων στην αγορά, κάτι που

αποδίδεται κυρίως στην κακή φαρμακοκινητική (pharmacokinetic-PK) των ιδιοτήτων των CDs [44]. Ως εκ τούτου, καθίστανται απαραίτητα αξιόπιστα φίλτρα ελέγχου/διαλογής για τις ιδιότητες ADME(T) [45, 46, 47]. Όσον αφορά στην καθυστέρηση στην ανάπτυξη φαρμάκων κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, μια σειρά από λόγους, όπως η κλινική ασφάλεια, η αποτελεσματικότητα, η χημική δομή (formulation), η βιοδιαθεσιμότητα, η εμπορικότητα, η τοξικολογία, το κόστος των εμπορευμάτων κ.α, έχουν προταθεί, με τη χημική δομή (formulation) και το κόστος των αγαθών να παρατηρούνται μόνο τον τελευταίο καιρό, ενώ και εμπορικοί λόγοι αποκτούν πολύ πιο σημαντική θέση στην κατάταξη. Παρ' όλα αυτά μια μεγάλη βελτίωση στις φαρμακοκινητικές ιδιότητες και στη βιοδιαθεσιμότητα των νέων φαρμάκων έχει παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια αυτής της δεκαετίας [48], με βάση την ανακάλυψη φίλτρων απορρόφησης για τον προσδιορισμό της διαπερατότητας [49, 50] και μεθόδων για μετρήσεις της διαλυτότητας [40].

Δυστυχώς, για να καταστεί δυνατή μια ανάλυση ADME(T) για υπολογιστικά σχεδιασμένα φαρμακευτικά μόρια πριν από τη χημική τους σύνθεση, φίλτρα βασισμένα σε υπολογιστές είναι απαραίτητα για την πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.

Στην φαρμακευτική έρευνα του σήμερα νέες προκλήσεις έχουν προστεθεί. Γι' αυτό πρέπει να ληφθούν συμπληρωματικές παράμετροι σε σχέση με τοξικολογικά αποτελέσματα, αποφεύγοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις με τους πρόσφατα ανακοινωμένους φυσιολογικούς μηχανισμούς και οδούς. Επιπλέον, μεγαλύτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στον τρόπο με τον οποίο μια ένωση αλληλεπιδρά *in vivo*, καθώς ακόμα και αρκετά όμοιες ενώσεις μπορεί να ασκούν την τοξικότητά τους με διαφορετικούς μηχανισμούς μιας και διαφορετικοί μηχανισμοί μπορεί να προκαλέσουν το ίδιο παρατηρούμενο φαινόμενο σε σύνδεση με περισσότερες ενώσεις.

Τέλος, από αναπτυξιακή σκοπιά, μια από τις πρώτες ιδιότητες προς αξιολόγηση είναι η απορρόφηση από το γαστρεντερικό σύστημα, καθώς ο βαθμός στον οποίο ένα φάρμακο απορροφάται από το έντερο θα καθορίσει εάν είναι δυνατή η χορήγηση του σε δόσεις δια της στοματικής οδού, επιτρέποντας έτσι στον ασθενή να λαμβάνει τη φαρμακευτική αγωγή ανεξάρτητα.

2.2 Διαλυτότητα των φαρμάκων, διαπερατότητα του εντέρου και τοξικότητα

Εξετάζοντας τις ιδιότητες ADME(T) είναι πιθανό να καταφέρουμε να βελτιώσουμε τις προβλέψεις για την διαλυτότητα, την διαπερατότητα και την τοξικότητα μιας χημικής ένωσης, όμως αυτό δεν είναι ένα εύκολο έργο [39]. Η υδατοδιαλυτότητα της ένωσης εξαρτάται τόσο από τις ενδομοριακές δυνάμεις στην στερεά κατάσταση όσο και από τις διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των μορίων του φαρμάκου και του περιβάλλοντος εντερικού υγρού, πράγμα που σημαίνει ότι το είδος και η ποιότητα των δεσμών έχουν μεγάλη σημασία, επειδή οδηγούν σε διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και ανάλογη συμπεριφορά του μορίου στο νερό. Η ανάλυση του σημείου τήξης, έχει δείξει ότι τα μόρια που έχουν αποδειχθεί ότι σχηματίζουν σταθερούς κρυστάλλους, είναι σε γενικές γραμμές μικρά, άκαμπτα, και πολικά [51], ενώ ενώσεις που είναι υδρόφοβες, ευέλικτες και μεγάλες, απαιτούν τον σχηματισμό μιας μεγαλύτερης κοιλότητας στο υδατικό περιβάλλον προκειμένου να διαλυθούν και είναι δυνατόν να έχουν περιορισμένη διαλυτότητα ως αποτέλεσμα αυτών των ιδιοτήτων, κάτι που δείχνει ότι η πρόβλεψη της διαλυτότητας δεν είναι απλή.

Η υδροφοβικότητα (ή λιποφιλικότητα) ωστόσο, είναι μία από τις κύριες ιδιότητες που περιορίζουν τη διαλυτότητα και αποτελεί κινητήρια δύναμη για τη διακυτταρική διαπερατότητα. Εξάλλου, όσον αφορά τη διαπερατότητα, είναι αποδεδειγμένο ότι η διακυτταρική διαδρομή χρησιμοποιείται από μη-πολικές, μεσαίου μεγέθους (MW <500), αφόρτιστες ενώσεις, ενώ η παρακυτταρική διαδρομή χρησιμοποιείται από πολικές, μικρές (MW <180) και φορτισμένες ενώσεις. Οι ενεργο- εξαρτώμενες ενεργητικές διαδικασίες μεταφοράς (transport efflux and influx proteins- μεταφορικές πρωτεΐνες εκροής και εισροής) χρησιμοποιούνται από ενώσεις, με μέσο ως και μεγάλο μέγεθος, πολικές και μη-πολικές, ενώ όλες οι ενώσεις μπορεί να είναι φορτισμένες ή αφόρτιστες. Η λιποφιλικότητα και η υδροφιλικότητα αποτελούν επίσης σημαντικούς παράγοντες αυτής της ιδιότητας (διαπερατότητας). Σημειώνεται όμως, ότι η διαλυτότητα και η εντερική διαπερατότητα εξαρτώνται από αντίθετες φυσικοχημικές ιδιότητες, γεγονός που καθιστά δύσκολη την εύρεση εύκολα ερμηνεύσιμων μοντέλων για την πρόβλεψη της διαδικασίας απορρόφησης των φαρμάκων, ενώ επισημαίνεται και η ανάγκη για σύνολα δεδομένων που πρέπει να

καλύπτουν έναν μεγάλο όγκο στο χώρο δημιουργίας φαρμακευτικών προϊόντων, όπως συνηθίζεται κατά την ανάπτυξη μοντέλων απορρόφησης που εφαρμόζονται στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων.

Τέλος, αναφορικά με την τοξικότητα, οι σχέσεις δομής-δραστικότητας στηρίζονται στην υπόθεση ότι μια επαρκής εκπροσώπηση, δηλαδή, γεωμετρική και ηλεκτρονιακή, των ερευνούμενων δομών θα επιτρέψει την παραγωγή ενός ποσοτικού στατιστικού μοντέλου, μια αξίωση κοινή για όλα τα μοντέλα ADME. Το γεγονός όμως ότι οι τοξικολογικές επιδράσεις μπορεί να προκύψουν από πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς, περιπλέκει την κατάσταση. Η τοξικολογική δράση εν τούτοις περιγράφεται από μοντέλα που περιέχουν υδροφοβικούς, ηλεκτρονιακούς και στερικούς παράγοντες σε μελετημένες χημικές ενώσεις [52].

2.3 Ανάπτυξη υπολογιστικών μοντέλων για τις ιδιότητες ADME(T)

2.3.1 Εισαγωγή

Το εφαρμοζόμενο περιβάλλον (σύστημα) ανακάλυψης φαρμάκων ως προς την επιλογή φαρμακευτικών υποψηφίων (CD), ήταν παραδοσιακά μια σειριακή πειραματική (πειράματα το ένα μετά το άλλο) δοκιμή φαρμακολογίας (P), ακολουθούμενη από τις διάφορες ιδιότητες ADME(T) όπως η διαλυτότητα, η διαπερατότητα, η σταθερότητα, ο μεταβολισμός, η κατανομή, η αποβολή και η τοξικότητα, με συνέπεια παρατεταμένους χρόνους ανάπτυξης και δυσκολίες στην εύρεση της βέλτιστης ένωσης. Σήμερα η βιομηχανία φαρμάκων εφαρμόζει ένα παράλληλο περιβάλλον (όλες οι ιδιότητες προβάλλονται και εξετάζονται μαζί) και μετακινείται προς ένα σύστημα βασισμένο σε συσσωρευμένες γνώσεις, ώστε να μειώσει περαιτέρω τον χρόνο και τις δαπάνες. Στο παράλληλο σύστημα-περιβάλλον, τόσο η φαρμακολογία όσο και οι ιδιότητες ADME(T) αξιολογούνται πειραματικά ταυτόχρονα, και το πλήρες σχεδιάγραμμα πληροφοριών που συλλέγονται ("profile") μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά την επιλογή του CD. Στο περιβάλλον αυτό μάλιστα, μια εικονική βιβλιοθήκη χημικών ενώσεων που δημιουργείται στον υπολογιστή εξετάζεται πρωταρχικά μέσω εικονικής πρόσδεσης (docking) σε στόχους και

αξιολογείται μέσω διαφόρων *in silico* προτύπων ως προς τις φαρμακολογικές της ιδιότητες και τις ιδιότητες ADME(T). Μια προνομιούχος βιβλιοθήκη σχεδιασμένη να έχει ένα ευνοϊκό φαρμακευτικό προφίλ και αποδεκτή φαρμακολογική δυναμική συντίθεται, βασισμένη στα αποτελέσματα από την εικονική διαλογή, και έπειτα οι επιλεγμένες ενώσεις διερευνώνται και επιβεβαιώνονται πειραματικά.

2.3.2 Στατιστικά εργαλεία και γενικές εκτιμήσεις για τις προβλέψεις των ιδιοτήτων ADME(T)

Οι Schultz και Cronin [53] έχουν προτείνει κάποιες μάλλον στοιχειώδεις απαιτήσεις προκειμένου να προκύψουν στατιστικά ορθά μοντέλα (πρότυπα):

1. Ένας καλά καθορισμένος και μετρήσιμος στόχος
2. Ένα χημικά και βιολογικά ποικίλο σύνολο δεδομένων
3. Φυσικοχημικοί περιγραφείς που είναι συνεπείς (κατάλληλοι) με τον στόχο του μοντέλου
4. Χρήση μιας κατάλληλης στατιστικής τεχνικής
5. Όπου είναι δυνατόν, μια ισχυρή μηχανιστική βάση.

Σήμερα, πολλές ταχείες μέθοδοι έχουν επινοηθεί για την υπολογιστική εξέταση/ διαλογή αρκετών από τις ιδιότητες ADME(T) που παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες, εις βάρος όμως της αξιοπιστίας [40, 54], με αποτέλεσμα έναν μεγάλο αριθμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στις οθόνες. Έτσι, όταν γίνεται προσπάθεια να αναπτυχθούν *in silico* μοντέλα για την πρόβλεψη των ιδιοτήτων ADME(T) υπάρχει, στις περισσότερες περιπτώσεις, ένας συμβιβασμός μεταξύ της ακρίβειας, της ταχύτητας και, ενδεχομένως, της διαφάνειας των παράγωγων μοντέλων· 1D- (κυρίως μοριακές / ατομικές σταθερές, περιγραφείς δεσμών και υπολογιστικά δεδομένα μεταξύ αυτών), 2D- (ως επί το πλείστον τοπολογικοί ή ηλεκτροτοπολογικοί περιγραφείς με απλές μαθηματικές εκφράσεις), και 3D- (δεδομένα από σύνθετες μαθηματικές σχέσεις που καθορίζουν σημαντικές πληροφορίες) υπολογιστικά ελεγμένες χημικές ιδιότητες

έχουν βρεθεί να είναι χρήσιμες για την εξαγωγή στατιστικά ορθών μοντέλων ADME(T), με ικανοποιητικές προβλέψεις για τις ιδιότητες. Η επιλογή του σωστού τύπου περιγραφέων ή συνδυασμών μεταξύ αυτών γίνεται ως επι το πλείστον σύμφωνα με τον τελικό στόχο και την αρχική ανάγκη δημιουργίας αυτού του μοντέλου.

Ένα ακόμα ζήτημα που χρήζει εξίσου μεγάλης προσοχής στη "μοντελοποίηση" (δηλ. δημιουργία προτύπων κατάλληλων για προβλέψεις κάποιων ιδιοτήτων) των ADME(T) είναι η διαθεσιμότητα σχετικών και αξιόπιστων συνόλων δεδομένων (datasets). Γενικά, υπάρχει ένας σχετικά μικρός αριθμός από αυτά, ιδίως δημόσιων συνόλων, με την επιθυμητή ποιότητα των δεδομένων, ποικιλία των ερευνούμενων δομών, και που είναι αρκετά μεγάλα ώστε να επιτρέπουν επαρκή επικύρωση του παράγωγου μοντέλου. Η προεπεξεργασία του συνόλου δεδομένων είναι επίσης πολύ σημαντική, δίνοντας στις μεταβλητές που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του μοντέλου ίσες ευκαιρίες να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της ανάλυσης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την κλιμακωτή διαβάθμιση (scaling) των μεταβλητών με ένα κατάλληλο τρόπο. Μια δημοφιλής μέθοδος για την διαβάθμιση μεταβλητών είναι η αυτόματη διαβάθμιση-κλιμάκωση (auto-scaling).

Στη βιβλιογραφία των ιδιοτήτων ADME(T), ειδικά στους τομείς της διαλυτότητας, της απορρόφησης και της διαπερατότητας, είναι κοινό τα μοντέλα να προκύπτουν από σχετικά λίγες ενώσεις (λιγότερες από 50), και να έχουν περιορισμένο πεδίο εφαρμογής σε σχέση με την προβλεπτική τους ικανότητα. Έτσι, καθίσταται απαραίτητο για ένα μοντέλο:

- να επικυρωθεί, καθώς σε αντίθετη περίπτωση, η προβλεπτική ικανότητά του δεν μπορεί να εκτιμηθεί. Τεχνικές όπως η εσωτερική διασταυρούμενη επαλήθευση ("internal crossvalidation", επικύρωση από το ίδιο το σύνολο χημ. ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή του), η εξωτερική επιβεβαίωση και άλλες έχουν χρησιμοποιηθεί.
- να αξιολογηθεί τελικά, και να εκτιμηθεί το πεδίο εφαρμογής του (δηλαδή το πόσες και πόσο συγγενικές χημικές ενώσεις περιλαμβάνει ή "ταιριάζουν" για το μοντέλο), έτσι ώστε να μην συμπεριληφθούν σε μελέτες με το συγκεκριμένο μοντέλο, ενώσεις που δεν υποστηρίζονται σωστά (ή η χρήση

τους να γίνεται εν γνώσει των μελετητών). Θα ήταν επίσης μεγάλης σημασίας να έχουμε μια ένδειξη επιπλέον της πρόβλεψης, για το αν (ή αν όχι) η ουσία θεωρείται ότι εμπίπτει εντός ή εκτός του πεδίου αυτού, δηλαδή αν η ένωση αποτελεί ή όχι μια ακραία τιμή, και υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό αυτό (όπως η απόσταση Mahalanobis (Mahalanobis distance), και μια μέθοδος που συνδέεται στενά με την μέθοδο PLS.

Πέραν αυτών, τόσο η επιλογή των συνόλων (set) εκπαίδευσης του μοντέλου (training set) όσο και των συνόλων ελέγχου (test set) είναι επίσης ένα σημαντικό κομμάτι της διαδικασίας. Είναι δυνατό να επιλεγθεί ένα "training set" τυχαία, και τελικά να παράγει ένα στατιστικά ορθό μοντέλο πρόβλεψης. Ωστόσο, συχνά η επιλογή των ενώσεων για το στάδιο εκπαίδευσης είναι κάπως "ασύμμετρη", κάτι που πιθανώς σημαίνει ότι πολλές από τις υπόλοιπες ενώσεις, το "εξωτερικό" σύνολο ελέγχου (external test set), θα βρίσκονται εκτός του πεδίου εφαρμογής του μοντέλου και θα αποτελούν ακραίες τιμές για το παρόν μοντέλο. Για να δείξει ένα μοντέλο καλή προβλεπτική ικανότητα και για να καλύψει αρκετά τον χώρο των υπό μελέτη περιγραφέων, το "training set" πρέπει να επιλέγεται με κάποια προσοχή. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι διαθέσιμες για την επιλογή τέτοιων καλά κατανεμημένων συνόλων, όπως πειραματικές μέθοδοι σχεδιασμού με την κατάλληλη πολυπλοκότητα και μέθοδοι Maximum (Maximum methods) [33].

2.3.3 Πόροι για προβλέψεις των ιδιοτήτων ADME(T)

Στον πίνακα 1, εμφανίζονται αρκετά παραδείγματα εμπορικών λογισμικών που διατίθενται για την πρόβλεψη των ιδιοτήτων σχετικών με τις ADME(T) [a], μαζί με τους κατασκευαστές τους και τα αποτελέσματα των προβλέψεων για κάποιους παράγοντες ADME(T).

Πίνακας 1. παραδείγματα εμπορικών λογισμικών που διατίθενται για την πρόβλεψη των ιδιοτήτων σχετικών με τις ADME(T)

Software	Company	Dis [b]	Sol [c]	Per [d]	Tps [e]	OB [f]	HIA [g]	BBB [h]	Mtb [i]	Other PK [j]	Tox [k]
AbSolv			p	p							
ACD Solubility DB	ACD Labs		p								
ADME batches	Pharma Algorithms		p				p				p
ADME boxes	Pharma Algorithms		p	p	p	p					
Cerius ²	AccelRys		p				p	p	p	p	p
Cloe PK	Cyprotex			p			p		p		
GastroPlus	Simulations Plus	p	p	p		p	p		p	p	
iDEA PKexpress	Lion Biosciences			p			p		p	p	
KnowItAll ADME/Tox	Bio-Rad Laboratories		p			p	p	p	p		p
OraSpotter	ZyxBio		p		p		p				
PK-sim	Bayer Technology Services			p	p	p	p		p	p	
QikProp	Schrödinger		p	p				p			
QMPRPlus	Simulations Plus		p	p			p	p		p	p
SLIPPER	TimeTec		p				p				

[a] p: Δείχνει την ιδιότητα που προβλέπεται με χρήση του αναφερόμενου λογισμικού. [b] Διάλυση. [c] Διαλυτότητα. [d] Εντερική διαπερατότητα. [e] Μεταφορείς. [f] Βιοδιαθεσιμότητα. [g] Ανθρώπινη εντερική απορρόφηση. [h] Διαπερατότητα στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. [i] Μεταβολισμός. [j] Άλλες φαρμακοκινητικές ιδιότητες. [k] Τοξικότητα.

Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν και ανεπτυγμένα (ή ακόμα και υπό ανάπτυξη) τμήματα δωρεάν λογισμικών προγραμμάτων [34, 35, 36], όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 1.

Κεφάλαιο 3 : Προγράμματα/ Διακομιστές για προβλέψεις των ιδιοτήτων ADME(T) που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εργασία

3.1. Πρόγραμμα QikProp

3.1.1 Προβλέψεις ADME χρησιμοποιώντας το QikProp

Το QikProp από την εταιρεία Schrödinger είναι ένα γρήγορο, αρκετά ακριβές και εύκολο στη χρήση πρόγραμμα προβλέψεων ADME που σχεδιάστηκε από τον καθηγητή William L. Jorgensen. Το QikProp προβλέπει σημαντικούς από την σκοπιά της Φυσικής περιγραφείς και φαρμακευτικά σχετικές ιδιότητες οργανικών μορίων, όπως τους $\log P$ οκτανόλης / νερού ($\log P_{o/w}$) και νερού / αερίου ($\log P_{w/g}$), $\log S$, $\log BB$, τη συνολική δραστηριότητα του ΚΝΣ, τις Caco-2 και MDCK (είναι 2 διαφορετικοί τύποι κυττάρων) κυτταρικές διαπερατότητες, την ανθρώπινη απορρόφηση (με χορήγηση της ουσίας) από το στόμα, τον $\log K_{hsa}$ για την σύνδεση της λευκωματίνης του ανθρώπινου ορού, και την $\log IC_{50}$ για την HERG K^+ απόφραξη καναλιών (HERG K^+ -channel blockage), είτε για μεμονωμένα μόρια ή σε ομάδες, ούτως ώστε οι αποφάσεις για την καταλληλότητα ενός μορίου να γίνονται με βάση μια διεξοδική ανάλυση.

Εκτός από την πρόβλεψη μοριακών ιδιοτήτων, το QikProp παρέχει ένα εύρος τιμών για τη σύγκριση των ιδιοτήτων ενός συγκεκριμένου μορίου με εκείνες του 95% των γνωστών φαρμάκων και επισημαίνει 30 είδη δραστικών λειτουργικών ομάδων που μπορεί να προκαλέσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε διαλογή υψηλής απόδοσης (high-throughput screening-HTS). Το εύρος των τιμών που οδηγεί ένα μόριο να επισημανθεί ως ανόμοιο με άλλα γνωστά φάρμακα μπορεί να τροποποιηθεί στο αρχείο QPlimits (που περιγράφεται στην ενότητα 3.6 του εγχειριδίου [38]). Το QikProp μπορεί να εκτελεστεί είτε από το Maestro GUI ή από την γραμμή εντολών και έχει δύο καταστάσεις λειτουργίας: την κανονική λειτουργία και την γρήγορη

λειτουργία {ο βοηθός εκμάθησης (tutorial) στο τμήμα 2 του εγχειριδίου [38] είναι ένας γρήγορος οδηγός εξοικείωσης οποιουδήποτε με τις δυνατότητες του προγράμματος}. Στη γρήγορη λειτουργία, κατά την οποία ορισμένοι χρονοβόροι υπολογισμοί παραλείπονται, με την ταχύτητα της διαδικασίας να αυξάνει μέχρι και 250.000 ενώσεις ανά ώρα, δεν γίνεται πρόβλεψη για μερικές ιδιότητες, ενώ κάποιες άλλες έχουν διαφορετικές τιμές (πληροφορίες σχετικά με την εκτέλεση του προγράμματος υπάρχουν στο Κεφάλαιο 3 του εγχειριδίου [38]). Το πρόγραμμα περιλαμβάνει επίσης λειτουργίες όπως το QikSim, ένα εργαλείο που συγκρίνει κάθε μόριο με μια ένωση-στόχο με απλά "Ευκλείδεια" και "Tanimoto" μέτρα για την ομοιότητα, και το QikFit, μια μονάδα που παράγει εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression equations), για να περιγράψει τη σχέση μεταξύ μιας νέας, καθορισμένης από τον χρήστη, πειραματικής ιδιότητας και των περιγραφών και ιδιοτήτων του QikProp.

Οι ιδιότητες και οι περιγραφές του QikProp μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εισαγωγικά αρχεία στο Strike, που είναι μια συλλογή από χημικά στατιστικά εργαλεία για την εξέταση των συσχετισμών μεταξύ των δεδομένων. Το QikProp μπορεί επίσης να αναπτύξει και να χρησιμοποιήσει μοντέλα QSAR/ QSPR χρησιμοποιώντας την μέθοδο των επιμέρους ελαχίστων τετραγώνων (partial least squares), την ανάλυση κυρίων συνιστωσών (principal component analysis- CPA), και την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (multiple linear regression). ακόμα να παράγει μονομεταβλητά και διμεταβλητά στατιστικά στοιχεία, καθώς και να εκτελεί ανάλυση ομοιότητας/ ποικιλομορφίας στον περιγραφέα και στην 2D- (διδιάστατη) δομή στο χώρο. Το Strike μπορεί να εκτελεστεί από το Maestro (περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το Strike βρίσκονται στο εγχειρίδιο χρήσης Strike - *Strike User Manual*).

Για κάθε επιτυχώς επεξεργασμένο μόριο, το QikProp παράγει κάποιους περιγραφείς και ιδιότητες, μερικοί από τους οποίους, όπως ήδη αναφέρθηκε, διαφέρουν στις δύο λειτουργικές καταστάσεις (ταχεία και κανονική λειτουργία, περισσότερες πληροφορίες σχετικά με συγκεκριμένους περιγραφείς και τις ιδιότητές τους περιγράφονται στον πίνακα 1.1 του εγχειριδίου [38]).

Άλλα χαρακτηριστικά του QikProp περιλαμβάνουν:

- Το QikProp βασίζει τις προβλέψεις του στην πλήρη 3D (τριδιάστατη) μοριακή δομή. Σε αντίθεση με προσεγγίσεις που βασίζονται σε τμήματα των μορίων, το QikProp διατείνεται ότι παρέχει εξίσου ακριβή αποτελέσματα στην πρόβλεψη ιδιοτήτων μορίων δημιουργημένων σε νέα βάση, όσο και για ανάλογα (παρασκευάσματα) γνωστών φαρμάκων.
- Το QikProp επιτρέπει τον έλεγχο για παραβιάσεις των κανόνων του Lipinski (rule-of-five) και του Jorgensen (rule-of-three) ώστε να παρέχει ένα μέτρο με βάση κάποιους "κανόνες" για το αν μια χημική ένωση μπορεί να είναι μια πιθανή φαρμακευτική ουσία.
- Το QikProp αναγνωρίζει μόρια με υπολογισμένες ιδιότητες που βρίσκονται έξω από τα φυσιολογικά όρια των γνωστών φαρμάκων, καθιστώντας απλή τη διαλογή ("φιλτράρισμα") και απομάκρυνση των υποψήφιων μορίων με ακατάλληλες ιδιότητες ADME.
- Το QikProp μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της βελτιστοποίησης των αρχικών "οδηγών" (δηλ. ενώσεις από τις οποίες μπορεί να προκύψουν με μετατροπές υποψήφια φάρμακα) αναλύοντας τις ομοιότητες μέσα σε μια κατηγορία ενώσεων, καθώς και προσδιορίζοντας ενώσεις που πρέπει να αποφευχθούν επειδή εμφανίζουν ακραίες τιμές των προβλεπόμενων ιδιοτήτων.
- Το QikProp δέχεται μια ευρεία γκάμα αρχείων σε διάφορες μορφές ως εισαγωγικά αρχεία στο πρόγραμμα (input formats), συμπεριλαμβανομένων των αρχείων Maestro, αρχεία MDL SD, και αρχεία PDB. Οι υπολογισμοί είναι εύκολο να ξεκινήσουν και να πραγματοποιηθούν, και τα αποτελέσματα μπορούν να μελετηθούν και να αναλυθούν χρησιμοποιώντας το περιβάλλον εργασίας του Maestro.
- Οι υδρόφοβες ενώσεις έχουν σχετικά χαμηλή διαλυτότητα, υψηλό logP, και υψηλή σύνδεση με τις πρωτεΐνες του ορού, αλλά καλή διαπερατότητα των κυττάρων· από την άλλη πλευρά, το αντίθετο ισχύει για τις υδρόφιλες ενώσεις. Η διαφορά αυτή είναι υπεύθυνη για την προσπάθεια να βρεθεί ένα ικανοποιητικό μέτρο ανάμεσα στη διαλυτότητα και τη διαπερατότητα κατά τη βελτιστοποίηση των ενώσεων (οι δύο ιδιότητες είναι αντίστροφες ως προς τον τρόπο δράσης των ουσιών στον οργανισμό,

και οι υπό διερεύνηση ουσίες είναι απαραίτητο να ελέγχονται προσεχτικά γι' αυτές). Το QikProp μπορεί να είναι εξαιρετικά χρήσιμο σε αυτήν τη διαδικασία, κάνοντας προβλέψεις για μια προτεινόμενη σειρά αναλόγων, εντοπίζοντας πιθανά προβλήματα αρκετά νωρίς.

3.1.2 Μεθοδολογία του QikProp

Το QikProp αναπτύχθηκε με την ακόλουθη διαδικασία. Το πρόγραμμα BOSS και το force field OPLS-AA χρησιμοποιήθηκαν για την εκτέλεση προσομοιώσεων στατιστικής μηχανικής με την μέθοδο Monte Carlo για βιολογικούς διαλύτες [55] σε περιοδικά κελιά με άμεση διαλύτη. Η διαδικασία αυτή κατέληξε σε μέσες τιμές επί των μοριακών διατάξεων για διάφορους περιγραφείς, όπως τον αριθμό των δεσμών υδρογόνου και το ποσοστό της επιφάνειας της διαλυμένης ουσίας που είναι προσβάσιμη στον διαλύτη [solvent-accessible surface area (SASA)]. Εξετάστηκε ο βαθμός συσχέτισης αυτών των περιγραφέων με πειραματικά καθορισμένες ιδιότητες και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν αλγόριθμοι που μιμούνται πλήρως την συμπεριφορά στις προσομοιώσεις Monte Carlo και παράγουν συγκρίσιμα αποτελέσματα.

Κατά την εκτέλεση μιας αξιολόγησης, το QikProp αναλύει γρήγορα είδη ατόμων και φορτία, αριθμήσεις στροφών καθώς επίσης όγκο μορίου και εμβαδόν της επιφάνειας του. Το QikProp στη συνέχεια χρησιμοποιεί τις πληροφορίες αυτές, μαζί με τους φυσικούς περιγραφείς που έχουν υπολογιστεί σύμφωνα με ορισμένους ειδικούς αλγόριθμους, σε εξισώσεις παλινδρόμησης. Το αποτέλεσμα είναι μια ακριβής πρόβλεψη των σχετικών φαρμακολογικών ιδιοτήτων ενός μορίου.

Το QikProp χρησιμοποιεί ομοιότητα στον χώρο των ιδιοτήτων προκειμένου να βελτιώσει τις προβλέψεις των ιδιοτήτων «κλειδιά», και να αλιεύσει όμοια μόρια από μια βάση δεδομένων. Κατά τον υπολογισμό της ομοιότητας χρησιμοποιείται μια κανονικοποιημένη Ευκλείδεια συναρτησιακή μορφή με ένα σύνολο βαρυτήτων κατοχυρωμένης ιδιοκτησίας ανά ιδιότητα. Οι ομοιότητες κυμαίνονται από μια τιμή: 0,0 (καμία ομοιότητα) έως 1,0 (πανομοιότητες).

(* Ο όρος "force-field", ορίζει στα πλαίσια της μοριακής μοντελοποίησης, τη μορφή και τις παραμέτρους των μαθηματικών συναρτήσεων που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν την δυναμική ενέργεια ενός συστήματος σωματιδίων, μορίων ή ατόμων, ενώ η λειτουργικότητα του βασίζεται σε πειραματικές τιμές και υψηλού επιπέδου υπολογισμούς κβαντικής μηχανικής)

3.1.3 Ποιότητα των αποτελεσμάτων

Τα πειραματικά αποτελέσματα για περισσότερες από 710 ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων περίπου 500 φαρμάκων και σχετικών ετεροκυκλικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του QikProp. Ο ακόλουθος πίνακας συνοψίζει τις προσαρμογές για το QikProp 2.2.

Πίνακας 2: Στατιστικά στοιχεία για τις προσαρμογές του QikProp 2.2 σε πειραματικά δεδομένα.

Property	N	R ²	RMS	MW range
polarizability (Å ³)	78	0.97	1.05	20–200
log P (hexadecane/gas)	392	0.93	0.37	20–200
log P (octanol/gas)	117	0.91	0.61	20–250
log P (water/gas)	421	0.93	0.58	20–250
log P (octanol/water)	448	0.93	0.50	20–735
log S (water/solid)	389	0.91	0.63	20–823
log K _{hsa} (serum protein binding)	90	0.82	0.25	130–765
log IC ₅₀ for HERG blockage	47	0.76	0.80	275–750
log BB (brain/blood)	104	0.80	0.35	20–525
log P Caco-2	126	0.72	0.61	60–520
log P MDCK	52	0.73	0.57	130–430
log K _p (skin permeability)	58	0.78	0.68	20–600

N είναι ο αριθμός των ενώσεων που χρησιμοποιούνται για την ιδιότητα, το R^2 (μεταξύ 0 και 1,0) είναι ένας συντελεστής προσδιορισμού που χρησιμοποιείται σε στατιστικά μοντέλα για την πρόβλεψη μελλοντικών αποτελεσμάτων με βάση άλλες σχετικές πληροφορίες και το πόσο ταιριάζουν μεταξύ τους αυτές, *RMS* είναι η ρίζα του μέσου σφάλματος του τετραγώνου (RMSE) ή ρίζα της μέσης τετραγωνικής απόκλισης (RMSD)

Στο εξαγόμενο αρχείο του QikProp για το log P (οκτανόλη / νερό), το log S και το log BB, εάν η τιμή για έναν χρησιμοποιούμενο περιγραφέα υπερβαίνει το εύρος τιμών

του πειραματικού συνόλου εκπαίδευσης (training set), σημειώνεται. Διαφορετικά, τα εύρη τιμών του μοριακού βάρους στον Πίνακα 2 δείχνουν την περιοχή της επικυρωμένης δυνατότητας εφαρμογής των παλινδρομικών εξισώσεων (regression equations).

Τα αποτελέσματα του συνόλου ελέγχου (test set) για το QikProp 3.3 έχουν επίσης εξαχθεί και για μόρια που δεν περιλαμβάνονταν στο 2.2 QikProp σύνολο εκπαίδευσης (training set). Οι 3D δομές ελήφθησαν απευθείας από το SciFinder, και έπειτα για να προσμετρηθεί η επίδραση της βελτιστοποίησης, βελτιστοποιήθηκαν με το πρόγραμμα BOSS χρησιμοποιώντας το force field OPLS-AA και τα φορτία CM1P. Και τα δύο σύνολα δομών επεξεργάστηκαν από το QikProp 2.2 [38]. Επιπλέον, υπάρχουν μερικά ζητήματα ακρίβειας καθώς οι προβλέψεις του QikProp εκτελούνται για τις συγκεκριμένες συνθήκες (pH 7, κλπ), και για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με το πείραμα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι τυχόν διαφορές σε αυτές τις συνθήκες. Τα ακόλουθα ζητήματα μπορεί να επηρεάσουν την ακρίβεια της σύγκρισης:

- μηχανισμοί ενεργητικής έναντι παθητικής μεταφοράς
- μηχανισμοί αντλιών εκροής (efflux pump mechanisms)
- μικρότερος αριθμός χημικών ενώσεων στα σύνολα εκπαίδευσης
- διαφορετικές πειραματικές συνθήκες από αυτές που χρησιμοποιούνται κατά την παλινδρόμηση
- ο "θόρυβος" (noise) σε πειραματικά δεδομένα, λόγω της εγγενούς πολυπλοκότητας των χημικών συστημάτων που αλληλεπιδρούν με τα βιολογικά συστήματα.

Τέλος, εξάρτηση των αποτελεσμάτων του QikProp από τη διαμόρφωση των μορίων έχει μελετηθεί με την εκτέλεση διαμορφωτικών αναζητήσεων (conformational searches) σε πολλά μόρια χρησιμοποιώντας το BOSS με το force field OPLS-AA, και ακολούθως από υπολογισμούς του QikProp για κάθε διαμόρφωση. Τα αποτελέσματα δείχνουν γενικά ότι υπάρχει μικρή διαφορά στις προβλέψεις του QikProp για εναλλακτικές διαμορφώσεις. Όταν υπάρχουν διαφορές, οι πιο εκτεταμένες στον χώρο διαμορφώσεις δομών δίνουν αποτελέσματα πιο κοντά στα πειραματικά δεδομένα,

ενώ υποδεικνύεται ότι η στάθμιση Boltzmann των αποτελεσμάτων του QikProp, χρησιμοποιώντας είτε τις ενέργειες των ισομερών εκ περιστροφής στην αέρια φάση, είτε τις ενέργειές τους στην υδατική φάση, δεν είναι απαραίτητη, αν και θεωρητικά είναι επιθυμητή [38].

3.1.4 Περιορισμοί του QikProp

Μια μεγάλη μελέτη δημοσιεύτηκε πρόσφατα όσον αφορά την ακρίβεια των αποτελεσμάτων του QikProp [56]. Η αξιοπιστία του προγράμματος QikProp ερευνήθηκε με τη σύγκριση των προβλέψεών του για τις φυσικο-χημικές ιδιότητες με γνωστές μετρημένες τιμές και, στην περίπτωση των ιδιοτήτων ADME, με φαρμακευτικές ενώσεις που βρίσκονται στην αγορά και έχουν μια καθιερωμένη θεραπευτική επίδραση. Καλός συσχετισμός με τα πειραματικά αποτελέσματα βρέθηκε για τον συντελεστή διαχωρισμού οκτανόλης - νερού ($\log P$), την υδατική διαλυτότητα ($\log S$), τις αδιαβατικές και κάθετες IPs και τις διπολικές ροπές. Επιπλέον, όταν αυτές οι ιδιότητες υπολογίστηκαν για περίπου 470 εμπορικά διαθέσιμες φαρμακευτικές ουσίες, που χορηγούνται από το στόμα, παρατηρείται μια σαφής Γκαουσιανή κατανομή (Gaussian distribution), καθορίζοντας το χημικό πεδίο που προσφέρεται για φαρμακευτική έρευνα και επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματα των υπεύθυνων για την ανάπτυξη του QikProp. Μπορεί, επομένως, να θεωρηθεί ότι αυτοί οι μοριακοί περιγραφείς μπορούν να εφαρμοστούν στα πλαίσια των προγραμμάτων για την ανακάλυψη φαρμάκων. Στην περίπτωση της EA, ελάχιστος συσχετισμός παρατηρήθηκε μεταξύ των πειραματικών δεδομένων που συγκεντρώθηκαν και των προβλεφθεισών τιμών. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στην σπανιότητα εύρεσης στοιχείων της EA έναντι των άλλων φυσικο-χημικών ιδιοτήτων που ερευνώνται ή/και στην ασυνέπεια μέσα στα διαθέσιμα δημοσιευμένα στοιχεία. Κατά τη σύγκριση με τις τιμές που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο DFT ελήφθη μια καλύτερη συσχέτιση αλλά υπάρχει και πολύ μεγάλο περιθώριο βελτίωσης. Για να εξεταστούν οι πιο φιλόδοξες λειτουργικές μονάδες (modules) για τις ADME, χρησιμοποιήθηκαν συλλογές από γνωστές και διαθέσιμες στην αγορά φαρμακευτικές ενώσεις, όπου ευρείες υποθέσεις έγιναν σχετικά με τις ιδιότητές τους. Μια αρχική ιδέα για την αξιοπιστία των μονάδων αυτών δημιουργήθηκε με την παρατήρηση των

ποιοτικών τάσεων παρά με τις ποσοτικές συσχετίσεις. Για τη διαπερατότητα των κυττάρων, με βάση τα στοιχεία για τα Caco-2 και MDCK, αναμενόμενες τάσεις παρατηρήθηκαν για τις ενώσεις που χορηγούνται από του στόματος, κάτι που ενθάρρυνε τους ερευνητές για περαιτέρω μελέτες πάνω στις λειτουργικές μονάδες. Το ίδιο πράγμα μπορεί να ειπωθεί για την μονάδα πρόβλεψης του αιματο-εγκεφαλικού φραγμού (blood brain barrier- BBB), όπου μια συλλογή φαρμακευτικών μορίων, γνωστών για την ενεργότητά τους στον εγκέφαλο, προκαταλήφθηκαν θετικά έναντι μιας μείξης ενώσεων με μη αναμενόμενη δυνατότητα να διαπερνούν τον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό. Τέλος, οι μονάδες HERG K⁺ και CNS δεν παρήγαγαν πειστικά αποτελέσματα και γι αυτό θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν με προσοχή (δεν περιλαμβάνονται στα αποτελέσματά μας).

3.2 Το πρόγραμμα/διακομιστής AlogPS

Το AlogPS είναι μια μικροεφαρμογή και μέρος του «Εικονικού Υπολογιστικού Εργαστηρίου Χημείας (Virtual Computational Chemistry Laboratory - VCCLAB)» [57]. Ο γενικός στόχος των υπεύθυνων για την ανάπτυξη και των συνεργατών αυτού του προγράμματος είναι να δημιουργήσουν ένα πολυ-πλατφορμικό (multi-platform) λογισμικό επιτρέποντας στον υπολογιστικό χημικό να εκτελέσει μια περιεκτική σειρά υπολογισμών μοριακών ιδιοτήτων και ανάλυση στοιχείων στο διαδίκτυο. Το λογισμικό είναι βασισμένο σε αρχιτεκτονική «τριών επιπέδων» (three-tier) που διαδίδεται γρήγορα παρέχοντας υπηρεσίες «πελατών-διακομιστών» (client-server) σε όλον τον κόσμο. Το αναπτυγμένο λογισμικό είναι φιλικό προς τον χρήστη και επιτρέπει μια απλή ενσωμάτωση νέων λειτουργικών μονάδων (modules) (συμπεριλαμβανομένων και ιδιόκτητων λογισμικών) που αναπτύσσονται από άλλες έρευνες. Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτού του συστήματος θα επιτρέψει σε τέτοιες λειτουργικές μονάδες να «τρέξουν» σε υπολογιστές όπου αναπτύχθηκε το λογισμικό, ενώ τα αποτελέσματα των υπολογισμών θα είναι διαθέσιμα παγκοσμίως [58].

Το ALOGPS 2.1, όντας ένα πολύ ακριβές πρόγραμμα ως προς την πρόβλεψη της λιποφιλικότητας και της υδατοδιαλυτότητας των μορίων, παρέχει διαδραστική διαδικτυακή πρόβλεψη της logP, της υδατοδιαλυτότητας και των pKa των ενώσεων

για τον σχεδιασμό φαρμάκων (ADME/T και HTS) και τις μελέτες περιβαλλοντικής Χημείας.

Εκτός από τα logP και logW, εμφανίζει επίσης τιμές που υπολογίζονται με τα προγράμματα Pharma Algorithms για LogP, LogS και pKa, Actelion για LogP & LogS, Molinspiration για logP, KOWWIN για logP, ALOGP [59], MLOGP [60] που εκτελούνται μέσω των προγραμμάτων DragonX, XLOGP2 και XLOGP3, καθώς και με το πρόγραμμα «ChemAxon logP calculator» της ChemAxon. Τα αιτήματα στέλνονται στους αντίστοιχους κεντρικούς διακομιστές και τα αποτελέσματα εμφανίζονται στη μικροεφαρμογή. Κατά συνέπεια, καθίσταται εύκολη η σύγκριση διαφόρων προγραμμάτων με ένα «κλικ».

Η μικροεφαρμογή μπορεί να χρησιμοποιηθεί με δύο μορφές, μια από τις οποίες υποβοηθούμενη από τη δημοφιλή διεπαφή «Java» (<http://www.java.com>) (Java-based Interface), ενώ η άλλη είναι η τυπική μορφή που μπορεί να εγκατασταθεί ή όχι, και χρησιμοποιείται χωρίς την διεπαφή «Java» (Non-Java Interface). Η βασισμένη στη διεπαφή Java είναι η αποτελεσματικότερη και πιο ισχυρή μορφή, δεδομένου ότι παρουσιάζει σε δευτερόλεπτα όλα τα αποτελέσματα για το logP και το logS ενός μορίου που υπολογίζονται από διαφορετικά προγράμματα.

- Υπολογισμός 1-οκτανόλη/νερό (1-octanol/water): Το ALOGPs αναπτύχθηκε με 12908 μόρια από τη βάση δεδομένων PHYSPROP. Χρησιμοποιώντας 75 αλγόριθμους εκπαίδευσης Ε εκπαιδεύτηκαν 64 νευρονικά δίκτυα χρησιμοποιώντας 50% των μορίων που επιλέχτηκαν κατά τύχη από ολόκληρο το σύνολο. Η ακρίβεια πρόβλεψης του logP είναι η τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (root mean squared error) rms=0.35 και το τυπικό μέσο σφάλμα s=0.26 [61, 62].
- Υπολογισμός υδατοδιαλυτότητας: Το ALOGpS αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας 1291 μόρια και προσέφερε καλύτερη πρόβλεψη για την υδατοδιαλυτότητα (rms=0.49, s=0.38) έναντι της προηγούμενης ανάλυσής μας [63]. Τα μόρια που χρησιμοποιούνται σε αυτήν την μελέτη είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο.

Το ALOGPS 2.1 μπορεί να αυξήσει την πρόβλεψή του για τα μόρια του χρήστη μέχρι 5 φορές [61] στην λειτουργία «BIBΛΙΟΘΗΚΗΣ» (LIBRARY mode), δεδομένου ότι καθένας μπορεί να δημιουργήσει και να χρησιμοποιήσει τη δική του BIBΛΙΟΘΗΚΗ χημικών ενώσεων/ μορίων. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει τις τιμές του logD [64, 65].

3.3 Το πρόγραμμα/ διακομιστής FAF-Drugs2

Το FAF-Drugs2 [34] είναι ένα δωρεάν προσαρμόσιμο εργαλείο με σκοπό το φιλτράρισμα ηλεκτρονικών συλογών χημικών ενώσεων ως προς τις ιδιότητες ADME. Το FAF-Drugs2 είναι ένα βοηθητικό πρόγραμμα μέσω γραμμής εντολών (π.χ., γραμμένο σε Python) που βασίζεται στην ανοιχτού κώδικα εργαλειοθήκη χημείας (open source chemistry toolkit) OpenBabel, το οποίο εκτελεί διάφορους φυσικοχημικούς υπολογισμούς, προσδιορίζει τις βασικές λειτουργικές ομάδες, ορισμένα τοξικά και ασταθή μόρια / λειτουργικές ομάδες. Σε αυτή τη μελέτη, έχουμε εφαρμόσει το FAF-Drugs2 απλά για την ανίχνευση πιθανών προειδοποιήσεων τοξικότητας λόγω της δομής των αναστολέων που μελετάμε.

Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι Μοντελισμού

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι δυσμενείς ιδιότητες ADME (T) μπορούν σε πολλές περιπτώσεις να οδηγήσουν στην αποτυχία κατά τις κλινικές δοκιμές αρκετών κατά τ'άλλα πιθανών επιτυχόντων υποψηφίων φαρμάκων. Η αξιολόγησή τους, επομένως, είναι επιθυμητή σε ένα πιο αρχικό στάδιο στη διαδικασία σχεδιασμού φαρμάκων. Ο κύριος σκοπός αυτής της μελέτης είναι να προβλεφθούν οι ιδιότητες ADME (T) για γνωστούς αναστολείς της

φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, η πλειοψηφία των οποίων έχει εξεταστεί μόνο για την παρεμπόδιση στο καθαρό ένζυμο [7, 15]. Μια μόνο προηγούμενη μελέτη έχει εκτελέσει προβλέψεις για τις ADME στους αναστολείς της GP, και αυτό ήταν για ένα σύνολο πολύ όμοιων παραγώγων [66]. Για τους υπολογισμούς μας, οι τελευταίοι πιο ισχυροί αναστολείς για τις διαφορετικές θέσεις δέσμησης εξήχθησαν από τις αναφορές [6, 7, 67, 68, 69, 70, 71, 72].

Οι ιδιότητες ADME των αναστολέων υπολογίστηκαν κυρίως χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα QikProp [37, 38] που υπολογίζει και τους σημαντικούς φυσικά περιγραφείς και τις σχετικές φαρμακευτικές ιδιότητες. Το ALOGPS [57, 58] χρησιμοποιήθηκε για να συμπληρώσει και να συγκρίνει τις προβλέψεις διαλυτότητας/λιποφιλικότητας από το QikProp, ενώ το FAF-Drugs2 [34] χρησιμοποιήθηκε για να εξάγει τυχόν προειδοποιήσεις λόγω τοξικότητας εξαιτίας της δομής των προσδετών. Ασχέτως αν υπακούουν ή όχι, στον «κανόνα των πέντε» του Lipinski (Lipinski's rule of five) και στον «κανόνα των τριών» του Jorgensen (Jorgensen's rule of three) [39, 40], οι προτεινόμενες ιδιότητες του Veber και των συνεργάτων του για την από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα [41] εξετάστηκαν για μελετημένους προσδέτες.

4.2 Προετοιμασία των προσδετών για τις προβλέψεις των ιδιοτήτων ADMET

Προκειμένου να αξιολογηθούν οι επιλεγμένοι αναστολείς του ενζύμου GP για τη φαρμακολογική επίδραση, δημιουργήσαμε σε εικονικό περιβάλλον τους επιλεγμένους προσδέτες από τις αναφορές [7, 68]. Οι προσδέτες δημιουργήθηκαν αρχικά χρησιμοποιώντας την μονάδα BUILD στο πρόγραμμα (περιβάλλον εργασίας) Maestro του Schrodinger. Περαιτέρω προετοιμασία όπως η τριδιάστατη-δόμηση και η ελαχιστοποίηση ενέργειας (3D-structuring and minimization) εκτελέστηκαν χρησιμοποιώντας την έκδοση 2.1 του LigPrep [73]. Για άκαμπτους προσδέτες, οι ελαχιστοποιημένες από το LigPrep δομές λήφθηκαν ως τελικές δομές για την εισαγωγή στους υπολογισμούς ADME(T). Το QikProp παρουσιάζει κάποια εξάρτηση από τη διαμόρφωση της εισαγόμενης δομής, με την πιο εκτεταμένη διαμόρφωση να

παράγει τα καλύτερα αποτελέσματα. Επομένως, για τους πιο εύκαμπτους προσδέτες, οι εισαγόμενες διαμορφώσεις καθορίστηκαν ως εξής: 500 βήματα μιας διαμορφωτικής αναζήτησης Monte Carlo (Monte Carlo conformational search) εκτελέστηκαν χρησιμοποιώντας έναν μικτό αλγόριθμο δειγματοληψίας με μεταβλητές την στρέψη και τους χαμηλής τάξης κανονικούς τρόπους δόνησης (mixed torsional/low-mode sampling) [74] του MacroModel 9.8. Για την χρήση του συνεχούς μοντέλου διαλύτη GB/SA ελήφθη υπόψη η επίδραση του κυρίως όγκου του νερού [75]. Χρησιμοποιήθηκε επίσης το force field OPLS-AA (2005) [76, 77]. Για αποθήκευση επελέγησαν διαμορφώσεις με ενέργειες εντός ενός πλαισίου έως ~5 kcal/mol πάνω από τη διαμόρφωση ολικού ενεργειακού ελαχίστου. Σε περιπτώσεις, όπου η διαμόρφωση ελάχιστης ενέργειας δεν αντιστοιχούσε σε μια εκτεταμένη δομή, οι σωζόμενες διαμορφώσεις ομαδοποιήθηκαν σε 10 συστάδες χρησιμοποιώντας από το Schrodinger το «σκριπτ» «Conformer Cluster» γραμμένο σε python χρησιμοποιώντας μήτρες RMSD (ατομικές), και έπειτα η πιο εκτεταμένη δομή επιλεγόταν με χρήση του «σκριπτ» «conformer_geom_extent.py».

Οι ίδιες διαμορφώσεις προς εισαγωγή χρησιμοποιήθηκαν και για τα τρία προγράμματα: QikProp, ALOGPS και FAF-Drugs2.

4.3 Οι υπολογισμοί του Qikprop

Μετά το προπαρασκευαστικό στάδιο, χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα QikProp έκδοσης 3.3 – μια ρύθμιση/επιλογή στο πρόγραμμα Maestro - στην Κανονική λειτουργία (Normal mode), για να προβλέψουμε τις ιδιότητες ADME των ανάλογων προσδετών (Η Γρήγορη λειτουργία «Fast mode» αποκλείει μερικές ιδιότητες). Όλοι οι προσδέτες προετοιμάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν αναγκαστικά σε ουδέτερη μορφή για τη χρήση με το QikProp. Από όλους τους περιγραφείς/ιδιότητες που προέβλεψε το QikProp για κάθε προσδέτη [38], αναφέρονται και αναλύονται οι ακόλουθες ιδιότητες:

1. «rotor», ο αριθμός των μη συνηθισμένων (όχι CX3), μη-εμποδιζόμενων (όχι αλκάνιο, αμίδιο, μικρός δακτύλιος) περιστρέψιμων δεσμών του προσδέτη.
2. «mol_MW», το μοριακό βάρος του προσδέτη.

3. «donorHB», ο εκτιμώμενος αριθμός δοτών δεσμών υδρογόνου της διαλυμένης ουσίας με τα μόρια του νερού σε ένα υδατικό διάλυμα.
4. «accrptHB», ο εκτιμώμενος αριθμός δεκτών δεσμών υδρογόνου της διαλυμένης ουσία με τα μόρια νερού σε ένα υδατικό διάλυμα.

(Οι τιμές και για τα donorHB και accrptHB είναι μέσοι όροι που λαμβάνονται μέσα από διάφορες διαρρυθμίσεις και έτσι μπορούν να είναι μη-ακέραιοι αριθμοί)

5. «QPlogP_{oct/wat}», ο λογάριθμος του συντελεστή διαχωρισμού του προσδέτη σε ένα μίγμα οκτανόλης/νερού.
6. «QPlogS», ο λογάριθμος της υδατοδιαλυτότητας του προσδέτη, το logS, όπου S σε mol dm⁻³ είναι η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας σε ένα κορεσμένο διάλυμα που βρίσκεται σε ισορροπία με το κρυσταλλικό στερεό.
7. «QPPCaco», η εμφανής διαπερατότητα του προσδέτη σε κύτταρα Caco-2 σε nm/sec {Τα Caco-2 κύτταρα είναι ένα πρότυπα αναφοράς για το γαστρεντερο-αιματική παρεμπόδιση, και οι προβλέψεις του QikProp αναφέρονται για τη μη ενεργητική μεταφορά (non-active transport)}.
8. «QPlogBB», ο λογάριθμος του συντελεστή διαχωρισμού του προσδέτη για τη ροή του αίματος στον εγκέφαλο {οι προβλέψεις του QikProp είναι για τα από στόματος χορηγούμενα φάρμακα, έτσι παραδείγματος χάριν, η ντοπαμίνη και η σεροτονίνη είναι αρνητικές για το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (Κ.Ν.Σ ή CNS) επειδή είναι πάρα πολύ πολικές για να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό}.
9. «metab», ο αριθμός των πιθανών μεταβολικών αντιδράσεων (είναι ο ίδιος αριθμός με την ιδιότητα «Primary Metabolites» που χρησιμοποιείται για τα αποτελέσματά μας).
10. «QPlogKhsa», η πρόβλεψη για τη δέσμευση του προσδέτη στην λευκοματίνη του ανθρώπινου ορού
11. «PSA», εμβαδόν πολικής επιφάνειας (polar surface area) κυρίως των πολικών ατόμων αζώτου και οξυγόνου με βάση τις ακτίνες Van der Waals.

4.4 Οι υπολογισμοί του ALOGPS

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το ξεχωριστό διαδικτυακό πρόγραμμα ALOGPS [57-65] χρησιμοποιήθηκε επίσης για να υπολογίσει τις τιμές των $\log P_{\text{oct/wat}}$ και $\log S$ δεδομένης της πρόσφατα αναφερόμενης ακρίβειας του προγράμματος σε μια εκτενή μελέτη των προβλέψεων που παράγει [43, 56, 66, 78]. Χρησιμοποιώντας το τυπικό περιβάλλον εργασίας του προγράμματος Java και επιλέγοντας «sdf- MDL Isis SDF file» ως εισαγωγικά αρχεία, τα μόρια, σε ουδέτερη μορφή, «φορτώθηκαν» στο πρόγραμμα σε μορφή (τύπο αρχείου) .sdf (τα αρχεία αυτά είχαν δημιουργηθεί μέσω Maestro). Από τα αποτελέσματα, μόνο η μέση τιμή («consensus») του $\log P_{\text{oct/wat}}$ ελήφθη, ενώ στην περίπτωση του $\log S$, εξήχθη η τιμή που υπολογίστηκε άμεσα χρησιμοποιώντας το ALOGpS.

4.5 Οι υπολογισμοί του FAF-Drugs2

Τέλος, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής για τους προσδέτες ελήφθησαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα FAF-Drugs2. Χρησιμοποιώντας τη διαδικτυακή διεύθυνση: <http://mobyale.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=admetox>, επιλέξαμε την λειτουργία FAF-Drugs2 με όλες τις επιλογές στην προεπιλογή, εκτός από την επιλογή της εξαγωγής αρχείου με ονομασία «Groups», το οποίο επιλέξαμε να παραχθεί. Το αρχείο (μορφή συντεταγμένων του προσδέτη - ligand coordinate format) που φορτώθηκε για αυτό το πρόγραμμα ήταν πάλι σε τύπο .sdf. Από τα εξαγόμενα αρχεία, σώσαμε το «groups.csv» (το προαναφερθέν αρχείο «Groups») που περιελάμβανε τις πιθανές τοξικές ομάδες για κάθε ένωση και μπορεί να διαβαστεί με πρόγραμμα του OpenOffice. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι στις περιπτώσεις που το πρόγραμμα FAF-Drugs2 έδινε ελλωματοματικά ή καθόλου αποτελέσματα πριν από την επανάληψή του χρησιμοποιήσαμε τη διεπαφή «Bank-Formatter», που φορτώνει το ίδιο *FILE.sdf*, ώστε να το καταστήσει συμβατό με το πρόγραμμα FAF-Drugs2. Αυτό το πρόγραμμα είναι ευαίσθητο στα στοιχεία που γράφονται μέσα στο αρχείο, και παίρνει πολύ συγκεκριμένες πληροφορίες, παρόμοιες με αυτές που περιλαμβάνονται σε ένα αρχείο «SMILES». Μετά από αυτό, χρησιμοποιήσαμε μόνο την επιλογή

«further analysis» ώστε να συνεχίσουμε με το πρόγραμμα FAF-Drugs2, ακολουθώντας τις προηγουμένως περιγραφείσες παραμέτρους.

4.6 Αξιολόγηση Κανόνων για την «από του στόματος» βιοδιαθεσιμότητα

4.6.1 Ο Κανόνας των Πέντε του Lipinski (Lipinski's Rule of Five)

Για να αξιολογηθούν οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες, έχουν προταθεί μερικοί τυποποιημένοι «κανόνες». Σαν πρώτη δοκιμή της «φαρμακο-ομοιότητας» (drug-likeness) των προσδετών, εφαρμόστηκε ο Κανόνας των Πέντε του Lipinski, απαιτώντας γενικά, ένα από του στόματος χορηγούμενο, ενεργό φάρμακο να έχει το περισσότερο μία μόνο παραβίαση από τα ακόλουθα κριτήρια:

- Όχι περισσότεροι από 5 δότες δεσμών υδρογόνου (άτομα αζώτου ή οξυγόνου με ένα ή περισσότερα άτομα υδρογόνου)
- Όχι περισσότεροι από 10 δέκτες δεσμών υδρογόνου (άτομα αζώτου ή οξυγόνου)
- Μοριακό βάρος ως 500 daltons
- Έναν συντελεστή διαχωρισμού οκτανόλης-νερού $\log P$, όχι μεγαλύτερο από 5

(Σημειώνουμε ότι όλοι οι αριθμοί είναι πολλαπλάσια του «πέντε», εξού και η προέλευση του ονόματος του κανόνα. Επιπλέον, για να αξιολογηθεί καλύτερα η ομοιότητα προσδετών προς φαρμακευτικές ουσίες, έχουν δημιουργηθεί επεκτάσεις στους κανόνες αυτούς, παραδείγματος χάριν μια που αναφέρεται από ένα έγγραφο του 1999 από τους Ghose και συνεργάτες [79].

4.6.2 Ο κανόνας των τριών του Jorgensen (Jorgensen's Rule of Three)

Στην πραγματικότητα, η υδατοδιαλυτότητα ($\log S$) ενός υποψηφίου φαρμάκου είναι μια κρίσιμη ιδιότητα για τη βιοδιαθεσιμότητά του [80]. Επιπλέον, η πολύ χαμηλή

διαπερατότητα των Caco-2 κυττάρων, που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη εντερο-αιματική παρεμπόδιση (φραγμός) [49, 81], δείχνει χαμηλή απορρόφηση ή διείσδυση για ένα μόριο προσδέτη, ειδικά εάν ο προσδέτης παρουσιάζει μια ή περισσότερες παραβιάσεις του κανόνα των 5 του Lipinski. Ο καθηγητής William L. Jorgensen, που είναι ο κύριος σχεδιαστής του προγράμματος QikProp, πρόσθεσε 3 επιπλέον κανόνες εκτός από τον κανόνα Lipinski, προκειμένου να καταστούν οι προβλέψεις ακριβέστερες. Αυτοί οι τρεις κανόνες είναι:

- $QPlogS > -5.7$
- $QPPCaco > 22 \text{ nm/s}$
- Αρχικοί μεταβολίτες < 7 .

Οι προσδέτες με λιγότερες (και κατά προτίμηση καμία) παραβιάσεις του κανόνα Jorgensen είναι πιθανότερο να είναι διαθέσιμοι από το στόμα [38].

4.6.3 Οι κανόνες του Veber (Veber's Rules)

Η μείωση του εμβαδού πολικής επιφάνειας (polar surface area - PSA) σχετίζεται καλύτερα με την αύξηση στον ρυθμό διαπερατότητας απ' ό,τι η λιποφιλικότητα [41, 82, 83] και είναι επομένως ένα ελκυστικό εναλλακτικό μοντέλο για την πρόβλεψη της απορρόφησης φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα. Η μελέτη βιοδιαθεσιμότητας του Veber [41] για τέτοιες ουσίες, έδειξε ότι η ευελιξία ενός υποψηφίου φαρμάκου, μετρούμενη ως ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή (< 10) καθώς και το εμβαδόν πολικής επιφάνειας ($< 140 \text{ \AA}^2$) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φίλτρα στα πρώτα στάδια κατά τον σχεδιασμό φαρμάκων, αν και πιο πρόσφατα φάνηκε ότι αυτή η προσέγγιση πρέπει να αντιμετωπιστεί με σύνεση, τόσο αναφορικά με την επιλογή του αλγορίθμου του περιγραφέα που χρησιμοποιούμε όσο και επειδή κι άλλοι παράγοντες μπορεί να έχουν σημαντική επιρροή στη βιοδιαθεσιμότητα [84]. Σε σχέση με το κριτήριο του εμβαδού πολικής επιφάνειας εντούτοις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αντ' αυτού ένα κριτήριο με βάση το συνολικό άθροισμα των δοτών και των δεκτών υδρογονικών δεσμών (≤ 12), που είναι ανεξάρτητο αλγορίθμου [41].

Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα πρόβλεψης ιδιοτήτων ADME(T)

- Προσδέτες στο κέντρο Αναστολής

5.1 Εισαγωγή

Οι προσδέτες του κέντρου αναστολής επιλέχθηκαν από τις αναφορές [6, 7] σε συσχέτιση με τις [15, 30] με τις δομές τους να παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.1. Οι προσδέτες που θεωρείται ότι αποτελούνται από καφεΐνη, φλαβοπυριδόλη και μερικά από τα παράγωγά της, καθώς και από δυο ανάλογα ινδουβίνης (μια κρυσταλλική χρωστική (σκούρο ερυθρό) μοριακού τύπου $C_{16}H_{10}N_2O_2$ ισομερές της χρωστικής ινδικόν (λουλάκι) που βρίσκεται στο φυσικό ινδικόν και ενίοτε στα ούρα). Η καφεΐνη που καταναλώνεται στην καθημερινή μας διατροφή αναστέλλει την GP με την τιμή της $K_i=0.08$ mM για την GPb [6], και το κέντρο αναστολής αναφέρεται συχνά και ως θέση πρόσδεσης καφεΐνης. Η φλαβοπυριδόλη είναι ένα δυνητικά αντικαρκινικό φάρμακο και ισχυρός ανταγωνιστικός αναστολέας (σε σχέση με το ATP) των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών (CDKs) (τιμή της IC_{50} μεταξύ 0,2 και 0,4 μ M). Επίσης δρα ως αναστολέας της μυϊκής GP, συνεργιστικά με τη γλυκόζη, έχει υψηλή συγγένεια για την πουρινική νουκλεοσιδική θέση (έτσι αναφέρεται αλλιώς το κέντρο αναστολής) και μιμείται την καφεΐνη [1]. Πρωτονιώνεται σε φυσιολογικό pH, όπως φαίνεται από τους υπολογισμούς του LigPrep. Το εύρος της K_i για τα παράγωγα της φλαβοπυριδόλης είναι 0,83-2,41 μ M κάνοντάς τα τους πιο πιθανούς προσδέτες για το κέντρο αναστολής που έχουν εντοπιστεί μέχρι σήμερα. Όπως αναφέρεται στις [15, 30], η φλαβοπυριδόλη και τα παράγωγά της εξουδετερώνουν τη δράση της φωσφορυλάσης στα ηπατοκύτταρα (μετατροπή του GPb σε GPa), η οποία προκαλείται από το AICAR (5-αμινοϊμιδαζόλιο-4-καρβοξαμίδιο 1-bDD-ριβοφουρανοσίδη) που μεταβολίζεται σε ένα παράγωγο του AMP. Σε αντίθεση με έναν αναστολέα από ινδολικό καρβοξαμίδιο (indole carboxamide), καταστέλλουν τον βασικό ρυθμό της γλυκογονόλυσης στα ηπατοκύτταρα, εν μέρει με αλλοστερική αναστολή και λιγότερο με την αδρανοποίηση της φωσφορυλάσης (δεδομένου ότι η αναστολή της γλυκογονόλυσης σε αυτές τις "βασικές" συνθήκες δεν θα μπορούσε να

εξηγηθεί πλήρως από τη μετατροπή του GP_a σε GP_b) και συνεπώς προκαλούν αμελητέα διέγερση της σύνθεσης γλυκογόνου. Ωστόσο, εξουδετερώνουν την διέγερση της γλυκογονόλυσης από διβουτυρικό (dibutyl) cAMP και με αλλοστερική αναστολή και με την αδρανοποίηση της φωσφορυλάσης. Εν τω μεταξύ, αξιολογήθηκαν δύο νέα παράγωγα ινδिरουβίνης. Τα Indirubin-3'-aminooxy-acetate και indirubin-5-sulfonate έχουν K_i ίση με 21 μM και 13,8 μM, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα από τις προβλέψεις ADME(T), παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1.

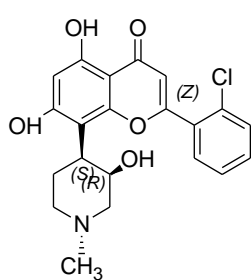
5.2 Αποτελέσματα

5.2.1 Βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα

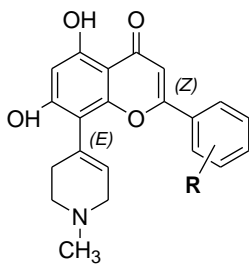
Οι προβλέψεις για τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες ADME αποκαλύπτουν ότι, με εξαίρεση το indirubin-5-sulfonate, όλες οι άλλες ενώσεις που ελέγχθηκαν για το κέντρο αναστολής έχουν φαρμακευτικές δυνατότητες ως προς τη βιοδιαθεσιμότητα όπως αυτή κρίνεται από την πλήρη έλλειψη παραβιάσεων των κανόνων Lipinski, Jorgensen και Veber. Στην περίπτωση των indirubin-5-sulfonate, η διαπερατότητα των Caco-2 κυττάρων προβλέπεται ως «χαμηλή», ενώ το άλλο παράγωγο ινδिरουβίνης (indirubin-3-aminooxy-acetate) έχει διαπερατότητα (29,3 nm / s), οριακά πάνω από το επίπεδο του Jorgensen (> 22 nm / s). Εν τω μεταξύ, η φλαβοπυριδόλη και τα παράγωγά της δεν έχουν καμία παραβίαση των κανόνων της βιοδιαθεσιμότητας από στοματική χορήγηση. Η καφεΐνη στερείται δοτών δεσμών υδρογόνου (0), που δεν θα πρέπει να είναι πρόβλημα, σύμφωνα με το εύρος των γνωστών φαρμάκων (0-20). Έχει κατά τα άλλα, εξαιρετικές τιμές συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος ότι είναι ο μόνος προσδέτης αυτής της θέσης δέσμευσης που έχει άριστη κυτταρική διαπερατότητα στα Caco-2 κύτταρα.

Inhibitor site

Flavopiridol-

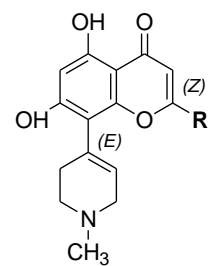


(1) Flavopiridol



Flavopiridol derivatives (2 to 8)

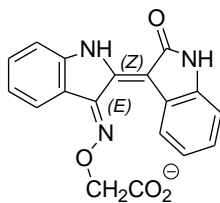
	R
(2)	H
(3)	2-Cl
(4)	3-Cl
(5)	4-Cl
(6)	2-F
(7)	2-Br
(8)	3,5-diCl



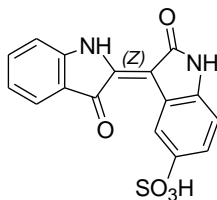
Flavopiridol derivatives (9-10)

	R
(9)	CH ₃
(10)	C(CH ₃) ₃

Indirubin-

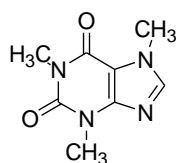


(11) Indirubin-3'-aminoxy-acetate



(12) Indirubin-5-sulfonate

Caffeine



(13)

Εικόνα 5.1 Προσδέτες στο κέντρο Αναστολής

5.2.2 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Τα αποτελέσματα στον πίνακα 5.1 αποκαλύπτουν ότι όλοι οι προσδέτες έχουν ευνοϊκές τιμές log BB σε σχέση με την επιθυμητή μη-δράση τους στο Κ.Ν.Σ, με όλες τις τιμές να εμπίπτουν εντός του εύρους που παρατηρήθηκε για το 95% των γνωστών φαρμάκων

5.2.3 Δέσμευση πρωτεϊνών πλάσματος

Και πάλι, οι τιμές του log K_{HSA} , που αντιπροσωπεύουν ένα μέτρο της προβλεπόμενης δέσμευσης των προσδετών στο κέντρο αναστολής για την αλβουμίνη του ανθρώπινου ορού, είναι ικανοποιητικές σε σύγκριση με εκείνες των γνωστών φαρμάκων.

5.2.4 Τοξικότητα

Προειδοποιήσεις λόγω τοξικότητας από το πρόγραμμα FAF-Drugs2 εμφανίζονται για τα υποκατεστημένα με "επίπεδο" δακτύλιο παράγωγα φλαβοπυριδόλης **2-8** (Σχήμα 5.1), λόγω της παρουσίας ενός αλκενίου. Τα αλκένια είναι σχετικά σταθερές ενώσεις, αλλά είναι πιο δραστικά από τα αλκάνια λόγω της παρουσίας ενός π-δεσμού μεταξύ δύο ανθράκων (-C=C-). Πράγματι, χρησιμεύουν ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία πετροχημικών, επειδή μπορούν να συμμετάσχουν σε ένα ευρύ φάσμα αντιδράσεων. Η «δυνατότητα» των αλκενίων να αντιδρούν και να σχηματίζουν τοξικούς μεταβολίτες, πρέπει κατά συνέπεια να λαμβάνεται υπόψη [85].

Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στη θέση δέσμευσης Αναστολέα όπως αναφέρονται στην εικόνα 5.1

Ligand/ Derivatives	Ki enzyme (μM) (RMGPb)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b					Veber's Rules & Violations (V) ^b					log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning
		MW (<500)	Num. H- bond donors (≤ 5)	Num. H- bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA ($<$ 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (\leq 12)	V					
Flavopiridol -																			
Flavopiridol (1)	1.16	401.8	3	6	2.38 (3.07)	0	80.05	-3.73 (-3.63)	5	0	3	93.0	9	0	0.310	-0.612	-		
2	1.28	349.4	2	5	2.87 (3.32)	0	116.60	-3.97 (-3.93)	5	0	2	78.5	7	0	0.530	-0.467	alkene		
3	0.99	383.8	2	5	3.13 (3.93)	0	116.69	-4.19 (-4.41)	5	0	2	77.8	7	0	0.602	-0.380	alkene		
4	0.83	383.8	2	5	3.21 (3.93)	0	116.36	-4.23 (-4.43)	5	0	2	78.3	7	0	0.610	-0.301	alkene		
5	1.89	383.8	2	5	3.36 (3.92)	0	116.66	-4.71 (-4.41)	5	0	2	78.5	7	0	0.644	-0.326	alkene		
6	2.75	367.4	2	5	2.99 (3.49)	0	116.25	-4.19 (-3.55)	5	0	2	78.0	7	0	0.555	-0.446	alkene		
7	1.50	428.3	2	5	3.19 (4.06)	0	116.10	-4.28 (-4.13)	5	0	2	77.7	7	0	0.621	-0.373	alkene		
8	2.50	418.3	2	5	3.71 (4.53)	0	116.41	-5.01 (-4.65)	5	0	2	78.3	7	0	0.726	-0.168	alkene		
9	2.41	287.3	2	5	1.69 (1.97)	0	117.32	-2.65 (-2.35)	6	0	2	79.7	7	0	0.117	-0.393	alkene		
10	-	329.4	2	5	2.48 (3.16)	0	116.49	-3.37 (-3.00)	5	0	3	77.9	7	0	0.421	-0.465	alkene		
Indirubin -																			
3-aminooxy- acetate (11)	21 (RMGPb)	335.3	2	7	2.31 (2.07)	0	29.30	-3.89 (-3.82)	1	0	4	119.3	9	0	-0.200	-1.601	-		
5-sulfonate (12)	13.8 (RMGPb)	342.3	3	7	1.11 (0.38)	0	8.10*	-3.58 (-3.73)	0	1	2	143.2	10	0	-0.427	-2.025	-		
Caffeine (13)		194.2	0	6	-0.07 (- 0.02)	0	1061.85	-0.92 (-1.25)	0	0	0	74.1	6	0	-0.838	-0.268	-		
Range 95% Known Drugs^d	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-		

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδόν επιφανείας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKhsa" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή <10 και (2) η PSA $<140 \text{ \AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

5.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

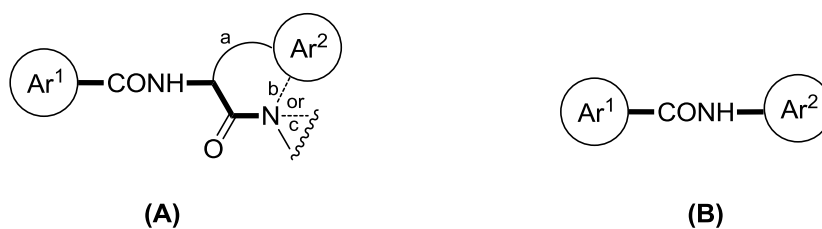
Οι προσδέτες για κέντρο αναστολής είναι ελπιδοφόροι υποψήφιοι για βελτιστοποίηση ως προς τη δυνατότητα φαρμακοποίησής τους (εμφανίζουν ως επί το πλείστον ευνοϊκές ιδιότητες). Ωστόσο, στην περίπτωση της φλαβοπυριδόλης υπάρχει μια προειδοποίηση τοξικότητας για την παρουσία μιας αλκενικής ομάδας στην περίπτωση των παραγώγων με επίπεδο δακτύλιο. Τα παράγωγα ινδουροβίνης πρέπει να εξετασθούν ως προς την καταλληλότητα των ιδιοτήτων διαπερατότητας, ενώ η καφεΐνη παρουσίασε σχεδόν τέλειες τιμές για τις ιδιότητες που μελετήθηκαν.

Κεφάλαιο 6

Αποτελέσματα των προβλέψεων των ιδιοτήτων ADME(T) – Προσδέτες στο Νέο αλλοστερικό κέντρο.

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι προσδέτες για νέο αλλοστερικό κέντρο επιλέχθηκαν από τις αναφορές [6, 7, 29]. Όλοι οι προσδέτες μπορούν γενικά να εκπροσωπηθούν από τα ικρίωματα (A) και (B) όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 που έχουν και οι δύο από έναν -CO-NH- (καρβοξαμίδιο) συνδέτη. Η δομή (A) έχει ευρέως διερευνηθεί για προσδέτες που δεσμεύονται στη συγκεκριμένη θέση και εκπροσωπεί τη μεγάλη πλειοψηφία των προσδετών που χρησιμοποιούνται για τις προβλέψεις μας ADME(T). Ωστόσο παρουσιάζουμε επίσης και τα αποτελέσματα για τους αρκετά υποσχόμενους προσδέτες βενζαμιδίου [6, 86], οι οποίοι έχουν τη βασική δομή (B) όπως φαίνονται στο Σχήμα 6.1 για σύγκριση.



Σχήμα 6.1: Βασικές δομές προσδετών που έχουν μελετηθεί για τη νέα αλλοστερική θέση δέσμευσης.

Οι προσδέτες που έχουν μελετηθεί χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες. Οι Ομάδες I-III, εκπροσωπούνται από τη βασική δομή (A), και η ομάδα IV από τη βασική δομή (B). Για τη βασική δομή (A), η Ομάδα I (Εικόνα 6.1), έχει a και b συνδέσεις (fused ring - συμπτυκνωμένοι δακτύλιοι) με την ομάδα Ar^2 . Οι προσδέτες της Ομάδας II (Εικόνα 6.2) δεν έχουν καθόλου b συνδέσεις (έλλειψη συμπτυκνωμένου δαχτυλίου με την Ar^2) αλλά έχουν a και c συνδέσεις. Η Ομάδα III (Εικόνα 6.3) δεν έχει ούτε a ούτε b συνδέσεις (ούτε ομάδα Ar^2), παρά μόνο συνδέσεις τύπου c. Η βασική δομή (B) δείχνει τους προσδέτες του τύπου της Ομάδας IV που μελετήθηκαν, δηλαδή τα παράγωγα βενζαμιδίου (benzamide derivatives) (Εικόνα 6.4)

Πολλοί από τους προσδέτες που μελετήθηκαν για τη νέα αλλοστερική θέση υπάρχουν ως στερεοϊσομερή, είτε με ένα ή δύο (διαστερομερή) χειρόμορφα κέντρα. Ενώσεις με σχέση κατόπτρου - ειδώλου εμφανίζουν τις ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες, αλλά διαφορετικά δυναμικά (πρόσδεσης, δράσης κλπ). Ως εκ τούτου σε αυτές τις περιπτώσεις, υπολογίσαμε τις ιδιότητες ADME για το ένα μόνο από τα δύο μόρια κατοπτρικού ειδώλου.

6.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.2.1 Προσδέτες των Ομάδων I και II

Τα αποτελέσματα των προβλέψεων ADME(T) για τους προσδέτες των ομάδων I και II φαίνονται στον Πίνακα 6.1.

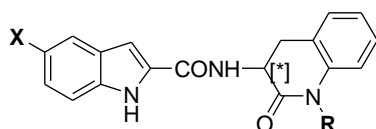
Προβλέψεις ADME: Οι προσδέτες της ομάδας I φαίνονται στην Εικόνα 6.1 και είναι όλοι αναστολείς με σταθερές αναστολής της τάξης του nM στο καθαρό ένζυμο. Έχουν συνδέσεις a και b (Σχήμα 6.1 (A)) και αντιπροσωπεύονται από παράγωγα 2-ινδόλης και θιανοπυρρολ-καρβοξαμίδιου (thienopyrrol-carboxamide). Οι προσδέτες της ομάδας II φαίνονται στην Εικόνα 6.2 και δεν έχουν καμία b σύνδεση αλλά έχουν a και c συνδέσεις. Ως εκ τούτου, έχουν την ομάδα Ar², όχι όμως τον συνδετικό συμπυκνωμένο δακτύλιο που προσδίδει ακαμψία στους προσδέτες της ομάδας I. Οι προσδέτες της ομάδας II είναι κατά τα άλλα δομικά παρόμοιοι με τους προσδέτες της ομάδας I, λαμβάνοντας υπόψιν τα παράγωγα 2-ινδόλης και τα θιανοπυρρολο-καρβοξαμίδια, και είναι ως επί το πλείστον αναστολείς με σταθερές αναστολής της τάξης του nM στο καθαρό ένζυμο.

Οι φαρμακοκινητικές προβλέψεις του QikProp αποκαλύπτουν ότι όλοι οι προσδέτες έχουν άριστες ιδιότητες ADME. Δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου παραβιάσεις κανόνων για την από στόματος βιοδιαθεσιμότητα (Lipinski, Jorgensen και Veber) και όλοι οι προσδέτες έχουν ευνοϊκές τιμές log K_{hsa} και log BB. Υπάρχουν μερικά παράγωγα και των ινδόλη-2-καρβοξαμίδιων και των θιανοπυρρολο-καρβοξαμίδιων που έχουν τιμές QikProp log S λίγο πάνω από το όριο του Jorgensen (> -5,7), αλλά οι αντίστοιχες τιμές που υπολογίζονται με χρήση του ALOGPS και θεωρούνται πιο αξιόπιστες [43, 78] είναι όλες εντός εύρους. Σε κάθε περίπτωση, όλες οι log S τιμές (από QikProp και ALOGPS) είναι εντός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων (-6,6 έως 0,5). Τα προβλεπόμενα ευνοϊκά προφίλ των προσδετών είναι σύμφωνα με τις χαμηλές τιμές των σταθερών αναστολής στο κύτταρο (τάξης μM ως και nM), με τρία παράγωγα θιανοπυρρολο-καρβοξαμίδια να εμφανίζουν τιμές των σταθερών αναστολής σε κλίμακα nM (B-1, 0.6 μM, B-2 μ 0.26 μM και B-5, 0.79 μM).

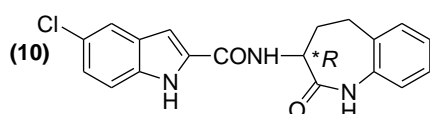
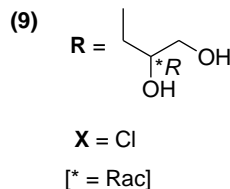
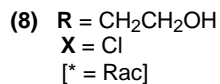
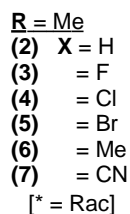
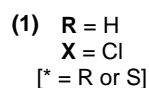
Προειδοποιήσεις Τοξικότητας λόγω δομής: Οι προειδοποιήσεις για τα παράγωγα θιανοπυρρολο-καρβοξαμίδιου βρέθηκαν μέσω του FAF-Drugs2, και αφορούν την ομάδα του θειοφαίνιου, και όσων εξ αυτών περιέχουν αρυλαλογονίδιο (aryl-halide).

Η προειδοποίηση για το αρυλαλογονίδιο (κυκλικό αλογονίδιο) είναι μια επίσης κοινή προειδοποίηση για τα ινδόλ-2-καρβοξαμίδικά παράγωγα, καθώς και μία προειδοποίηση για το νιτρίλιο στον προσδέτη A-7. Πολλές ενώσεις με υποκαταστάτες κυανίου είναι ιδιαίτερα τοξικές. Το κυανικό ανιόν είναι ένας αναστολέας του ενζύμου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (γνωστή και ως aa_3), στο τέταρτο σύμπλοκο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (που βρίσκεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων των ευκαρυωτικών κυττάρων) [87]. Συνδέεται με τον σίδηρο μέσα σε αυτήν την πρωτεΐνη. Η σύνδεση του κυανίου σε αυτό το κυτόχρωμα αποτρέπει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από την οξειδάση του κυτοχρώματος c στο οξυγόνο. Ως αποτέλεσμα, η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων διαταράσσεται, πράγμα που σημαίνει ότι το κύτταρο δεν μπορεί πλέον να παράγει ATP για ενέργεια με αερόβια διαδικασία. Οι ιστοί που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αερόβια αναπνοή, όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα και η καρδιά, πλήττονται σε μεγάλο βαθμό. Οργανικά νιτρίλια, τα οποία δεν εκλύουν εύκολα κυανικά ιόντα, έχουν χαμηλή τοξικότητα, οπότε η προκαλούμενη από το κυάνιο τοξικότητα ίσως δεν είναι πρόβλημα στην προκειμένη περίπτωση. Εν τω μεταξύ, η ηπατική τοξικότητα των αρυλαλογονιδίων έχει αναφερθεί ήδη από το 1977 με τον βαθμό της τοξικότητας να κυμαίνεται ανάλογα με τη φύση του άλλου φαινυλικού υποκαταστάτη [88]. Επιπλέον, ο θειοφαινικός δακτύλιος είναι επιρρεπής σε ηπατική οξειδάση από το CYP και υφίσταται εποξειδωση, ακολουθούμενη από το άνοιγμα του εποξειδωμένου δακτυλίου με πυρηνόφιλα βιομόρια προς παραγωγή συμπλόκων (adducts) [87, 89, 90]. Το θείο του θειοφαινίου μπορεί επίσης να υποστεί οξειδωση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του δακτυλίου προς πυρηνόφιλη προσθήκη βιομορίων. Ένας τρόπος εν τούτοις, για να μειωθούν αυτές οι πορείες είναι να εισαχθούν 2,5-υποκαταστάσεις στο δακτύλιο του θειοφαινίου ή να απενεργοποιηθεί ο δακτύλιος προς πυρηνόφιλη προσβολή μέσω εισαγωγής παρακείμενης λειτουργίας. Περαιτέρω πειράματα είναι απαραίτητα για την επαλήθευση της αποτελεσματικότητας της παρούσας παρατήρησης και για να εξαλειφθούν οποιοδήποτε άλλοι μηχανισμοί τοξικότητας για την ομάδα αυτή.

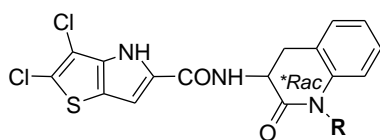
(A) Indole-2-carboxamide derivatives



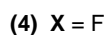
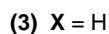
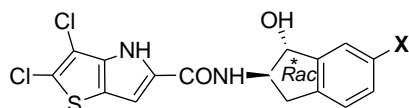
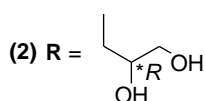
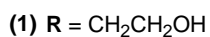
(entry for compounds 1-10)



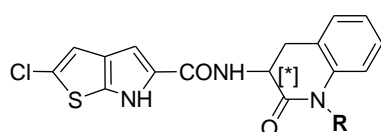
(B) Thienopyrrol-carboxamide derivatives type I



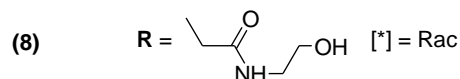
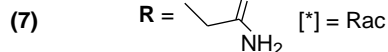
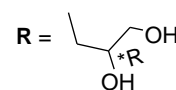
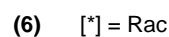
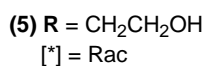
(entry for compounds 1-4)



(B) Thienopyrrol-carboxamide derivatives type II

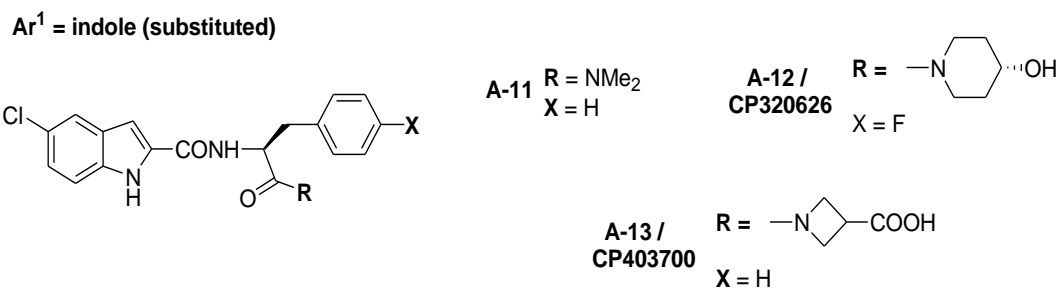


(entry for compounds 5-6)

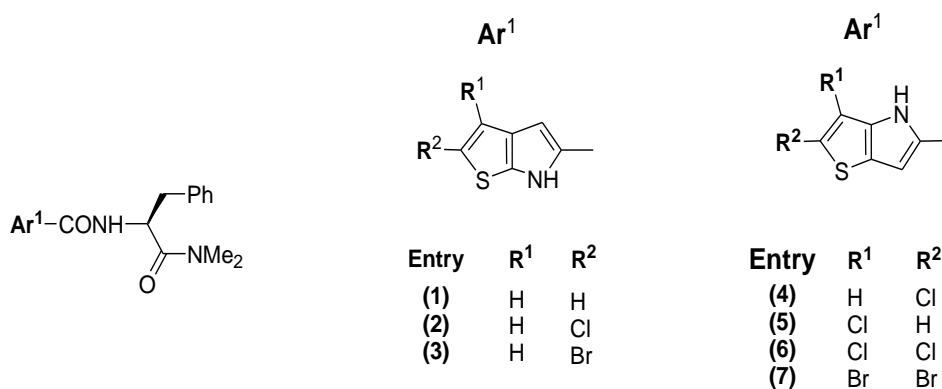


**Note: For compounds with -Rac chiralities, the -S conformation was used to calculate ADMET properties (Mirror compounds with only one chirality -R or -S are equal regarding the physicochemical properties).

Εικόνα 6.1: Προσδέτες που ανήκουν στην Ομάδα I του νέου αλλοστερικού κέντρου σύμφωνα με τη βασική δομή που περιγράφεται στο Σχήμα 6.1.



(C) Ar¹ = thienopyrrol (N-acyl-phenylalaninamides)



Εικόνα 6.2: Προσδέτες που ανήκουν στην Ομάδα II του νέου αλλοστερικού κέντρου σύμφωνα με τη βασική δομή που περιγράφεται στο Σχήμα 6.1.

Πίνακας 6.1: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στη Νέα Αλλοστερική θέση δέσμευσης όπως αναφέρονται στην εικόνα 6.1

Ligand/Group/ Derivatives	IC50 enzyme (μM) (HLGPa)	IC50 cell (μM)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b					Veber's Rules & Violations (V) ^b					log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning
			MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)	V					
Group I/ Indole-2- carboxamide-																				
(A-1)	0.025/-R 0.047/-S	-	339.8	3	5	3.37 (3.14)	0	521.50	-5.32 (-4.21)	3	0	2	90.9	8	0	0.395	-0.690	aryl_halide_X		
(A-2)	0.16	-	319.4	2	5	3.56 (2.53)	0	1255.04	-5.17 (-3.66)	3	0	2	77.5	7	0	0.425	-0.484	-		
(A-3)	0.12	-	337.4	2	5	3.79 (2.48)	0	1255.40	-5.53 (-3.65)	3	0	2	77.5	7	0	0.466	-0.377	aryl_halide_X		
(A-4)	0.025	-	353.8	2	5	4.05 (3.12)	0	1255.26	-5.90 (-4.17)	3	1	2	77.5	7	0	0.538	-0.330	aryl_halide_X		
(A5)	0.030	-	398.3	2	5	4.12 (3.08)	0	1255.23	-6.00 (-4.48)	3	1	2	77.5	7	0	0.561	-0.320	aryl_halide_X		
(A-6)	0.12	-	333.4	2	5	3.86 (2.74)	0	1254.59	-5.73 (-3.92)	4	1	2	77.5	7	0	0.580	-0.512	-		
(A-7)	0.18	-	344.4	2	6	2.81 (2.25)	0	260.65	-6.15 (-3.82)	3	1	3	103.3	8	0	0.262	-1.317	nitrile		
(A-8)	0.017	4.0	383.8	3	6	3.21 (2.25)	0	365.13	-5.27 (-3.74)	4	0	5	100.8	9	0	0.229	-1.092	aryl_halide_X		
(A-9R)	0.044	1.3	413.9	4	7	2.58 (1.73)	0	170.01	-4.87 (-3.48)	5	0	7	119.2	11	0	-0.005	-1.585	aryl_halide_X		
(A-9S)			413.9	4	7	2.76 (1.73)	0	232.49	-5.05 (-3.48)	5	0	7	116.6	11	0	0.021	-1.470	aryl_halide_X		
(A-10)	0.099	-	353.8	3	5	3.81 (3.20)	0	615.68	-5.92 (-4.31)	3	1	2	88.5	8	0	0.546	-0.663	aryl_halide_X		
Range 95% Known Drugs^d	-	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-		

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδό επιφάνειας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKhsa" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή <10 και (2) η PSA $<140 \text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

Πίνακας 6.1 (συνέχεια): Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες του νέου αλλοστερικού κέντρου όπως αναφέρονται στην εικόνα 6.1

Ligand/Group/ Derivatives	IC50 enzyme (μM)	IC50 cell (μM)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b				Veber's Rules & Violations (V) ^b				log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning
			MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)	V			
Thienopyrrol- carboxamide -																		
(B-1)*	0.007	0.6	424.3	3	6	3.59 (2.85)	0	385.94	-5.87 (-5.04)	5	1	5	101.2	9	0	0.251	-0.796	thiophene
(B-2R)*	0.002	0.26	454.3	4	7	2.96 (2.25)	0	181.87	-5.45 (-4.93)	6	0	7	119.5	11	0	0.014	-1.281	thiophene
(B-2S)*			454.3	4	7	3.03 (2.25)	0	213.15	-5.45 (-4.93)	6	0	7	118.7	11	0	0.022	-1.200	thiophene
(B-3R)*	0.009	1.5	367.3	3	4	3.86 (3.60)	0	1110.79	-5.72 (-5.14)	3	1	3	70.5	7	0	0.310	-0.158	thiophene
(B-3S)*			367.3	3	4	3.87 (3.66)	0	1288.90	-5.69 (-5.14)	3	0	3	68.5	7	0	0.293	-0.092	thiophene
(B-4R)*	0.049	1.3	385.2	3	4	4.09 (3.75)	0	1112.40	-6.08 (-5.28)	3	1	3	70.4	7	0	0.348	-0.051	thiophene, aryl_halide_X
(B-4S)*			385.2	3	4	4.10 (3.75)	0	1288.96	-6.05 (-5.28)	3	1	3	68.5	7	0	0.332	0.014	thiophene, aryl_halide_X
(B-5)	0.026	0.79	389.9	3	6	3.13 (2.22)	0	344.15	-5.28 (-4.70)	5	0	5	101.3	9	0	0.157	-0.976	thiophene
(B-6R)	0.029	1.1	419.9	4	7	2.51 (1.62)	0	162.20	-4.86 (-4.59)	6	0	7	119.5	11	0	-0.073	-1.452	thiophene
(B-6S)			419.9	4	7	2.58 (1.62)	0	196.20	-4.83 (-4.59)	6	0	7	118.7	11	0	-0.064	-1.349	thiophene
(B-7)	0.135	1.2	402.9	3	7	1.78 (1.71)	0	64.58	-4.06 (-4.74)	6	0	4	130.7	10	0	-0.265	-1.389	thiophene
(B-8)	0.121	15	446.9	4	8	2.13 (1.50)	0	146.12	-4.85 (-4.80)	6	0	7	133.2	12	0	-0.335	-1.442	thiophene
Range 95% Known Drugs^d	-	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδό επιφανείας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKhsa" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή <10 και (2) η PSA <140 \AA^2 , ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

Πίνακας 6.1 (συνέχεια): Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες του νέου αλλοστερικού κέντρου όπως αναφέρονται στην εικόνα 6.2

Ligand/Group/ Derivatives	IC50 enzyme (μM) (HLGPa)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b				Veber's Rules & Violations (V) ^b				log Kh _{sa}	log BB	Tox. struct. Warning
		MW (<500)	Num. H- bond donors (≤ 5)	Num. H- bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)	V			
Group II/Indole-2- carboxamide-																	
(A-11)	0.082	369.9	2	5	4.13 (3.37)	0	1012.68	-5.29 (-4.85)	2	0	5	74.9	7	0	0.353	-0.405	aryl_halide_X
(A-12) / CP-320626	0.2	443.9	3	6	3.83 (3.23)	0	353.89	-5.72 (-4.30)	3	1	6	95.6	9	0	0.287	-0.888	aryl_halide_X
(A-13) / CP403700	0.045	425.9	3	7	4.09 (2.78)	0	33.78	-5.44 (-4.30)	3	0	7	122.2	10	0	0.127	-1.538	aryl_halide_X
Group II/ N-acyl- phenylalanylamides																	
(C-1)	2.31	341.4	2	5	3.51 (2.41)	0	925.56	-4.47 (-4.61)	3	0	5	75.4	7	0	0.147	-0.446	thiophene
(C-2)	0.017	375.9	2	5	4.01 (3.03)	0	926.64	-5.19 (-5.14)	3	0	5	75.3	7	0	0.263	-0.293	thiophene
(C-3)	0.031	420.3	2	5	4.10 (3.18)	0	925.27	-5.35 (-5.21)	3	0	5	75.3	7	0	0.291	-0.287	thiophene
(C-4)	0.577	375.9	2	5	4.02 (3.07)	0	946.43	-5.22 (-5.14)	3	0	5	75.5	7	0	0.265	-0.289	thiophene
(C-5)	0.390	375.9	2	5	4.05 (3.02)	0	1072.20	-5.20 (-5.14)	3	0	5	75.3	7	0	0.260	-0.226	thiophene
(C-6)*	0.005	410.3	2	5	4.50 (3.65)	0	1071.03	-5.8 (-5.52)	3	1	5	75.3	7	0	0.372	-0.099	thiophene
(C-7)*	0.023	499.2	2	5	4.66 (3.91)	0	1081.93	-6.08 (-5.60)	3	1	5	75.4	7	0	0.421	-0.078	thiophene
Range 95% Known Drugs^d	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδό επιφάνειας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKh_{sa}" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή <10 και (2) η PSA $<140 \text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (για συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

6.2.2 Προσδέτες της Ομάδας III:

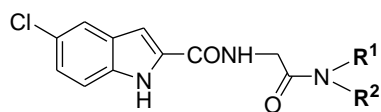
Τα αποτελέσματα των ADME(T) προβλέψεων για τους προσδέτες της Ομάδας III, δείχνονται στον Πίνακα 6.2.

Προβλέψεις ADME: Οι προσδέτες της ομάδας III (Σχήμα 6.1 (A)) είναι τα γλυκιναμίδια (glycinamides) που φαίνονται στην Εικόνα 6.3. Είναι όλα παράγωγα ινδολο-2-καρβοξαμιδίου, αλλά στερούνται μιας ομάδας Ar² που βρίσκεται στις ομάδες I και II. Παρά το γεγονός αυτό, οι προσδέτες είναι όλοι αναστολείς με σταθερές αναστολής της τάξης του nM στο ένζυμο και τα περισσότερα τουλάχιστον αναστολείς με πολύ χαμηλές τιμές των σταθερών αναστολής (μM) σε κυτταρικό επίπεδο. Οι προβλέψεις ADME δεν εμφανίζουν καμία απολύτως παραβίαση των κανόνων Lipinski, Jorgensen ή Veber για οποιονδήποτε από αυτούς τους προσδέτες, ενώ και τιμές για τις log BB και log K_{hsa} είναι στο επιθυμητό εύρος. Η δραματική διαφορά στις τιμές της K_i για τον προσδέτη Glyc-9 στο ένζυμο (0,012 μM) και σε ηπατοκύτταρα (SK hep > 30 μM) δεν σχετίζεται με οποιαδήποτε από τις προβλέψεις ADME. Ωστόσο, είναι πιο πιθανό να σχετίζεται με την αντιδραστικότητα / μεταβολισμό του σουλφονικού.

Προειδοποιήσεις Τοξικότητας λόγω δομής: Όλοι οι προσδέτες έχουν μια προειδοποίηση για την αλογόνο-υποκατεστημένη ινδολική ομάδα (αρυλ-αλογονίδιο). Επιπροσθέτως ο προσδέτης Glyc-6 έχει μια προειδοποίηση για μία ομάδα νιτριλίου. Ο προσδέτης Glyc-6 περιέχει μία σουλφονική ομάδα, η οποία είναι ευαίσθητη σε πυρηνόφιλη προσβολή από κυστεΐνη-SH ή άλλα πυρηνόφιλα βιομόρια προς σχηματισμό συμπλόκων [91]. Η τοξικότητα τέτοιων ομάδων σχετίζεται με τη χημική τους αντιδραστικότητα [87].

Glycinamides

(Glyc -)



Entry	R ¹	R ²
(1)	CH ₃	
(2)	CH ₃	
(3)	CH ₃	
(4)	CH ₃	

Entry	R ¹	R ²
(9)	-(CH ₂) ₂ OH	
(10)	-(CH ₂) ₂ OH	
(11)	-(CH ₂) ₂ OH	
(12)	-(CH ₂) ₂ OH	

Entry	R ¹	R ²
(5)		
(6)		-CH ₂ CN
(7)		
(8)		-(CH ₂) ₂ OH

Εικόνα 6.3: Προσδέτες που ανήκουν στην Ομάδα III του νέου αλλοστερικού κέντρου σύμφωνα με τη βασική δομή που περιγράφεται στο Σχήμα 6.1.

Πίνακας 6.2: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στη Νέα Αλλοστερική θέση δέσμευσης όπως αναφέρονται στην εικόνα 6.3

Ligand/Group/ Derivatives	IC50 enzyme (μM) (HLGPa)	Ki cell (μM) (SK-Hep)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b					Veber's Rules & Violations (V) ^b					log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning
			MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)	V					
Group III/ Glycinamides																				
(Glyc-1)	0.055	1.7	333.8	2	5	3.09 (2.89)	0	539.94	-4.78 (-3.61)	1	0	4	80.4	7	0	0.119	-0.637	aryl_halide_X		
(Glyc-2)	0.150	1.4	307.8	2	5	2.74 (2.43)	0	552.48	-4.16 (-3.48)	1	0	5	80.6	7	0	-0.078	-0.674	aryl_halide_X		
(Glyc-3)	0.210	7.1	341.8	2	5	3.98 (3.12)	0	888.91	-5.67 (-4.38)	2	0	4	80.2	7	0	0.448	-0.637	aryl_halide_X		
(Glyc-4S)	0.230	0.62	321.8	2	5	3.03 (2.81)	0	567.42	-4.49 (-3.81)	1	0	5	79.9	7	0	0.042	-0.667	aryl_halide_X		
(Glyc-5S)	0.016	1.3	377.9	3	6	2.86 (2.58)	0	390.27	-4.94 (-3.64)	2	0	7	96.8	9	0	-0.047	-1.088	aryl_halide_X		
(Glyc-6)	0.030	0.68	358.8	2	6	2.45 (2.56)	0	168.87	-5.57 (-3.98)	2	0	6	104.7	8	0	-0.104	-1.371	aryl_halide_X,nitrile		
(Glyc-7)	0.042	0.76	377.9	3	6	2.74 (2.54)	0	214.14	-4.74 (-3.70)	2	0	8	101.3	9	0	-0.072	-1.414	aryl_halide_X		
(Glyc-8)	0.057	0.14	363.8	3	6	2.38 (2.21)	0	221.98	-4.39 (-3.55)	2	0	7	101.2	9	0	-0.175	-1.299	aryl_halide_X		
(Glyc-9)	0.012	>30	427.9	3	8	0.89 (0.72)	0	45.45	-4.11 (-2.94)	2	0	7	139.0	11	0	-0.633	-2.164	aryl_halide_X		
(Glyc-10)	0.030	2.3	391.9	3	6	2.97 (3.09)	0	221.36	-5.04 (-3.98)	2	0	7	100.9	9	0	0.066	-1.314	aryl_halide_X		
(Glyc-11)	0.32	12	405.9	3	6	3.26 (3.65)	0	219.20	-5.32 (-4.23)	2	0	7	100.7	9	0	0.188	-1.313	aryl_halide_X		
(Glyc-12)	0.12	0.27	371.8	3	6	3.24 (2.45)	0	299.61	-5.24 (-4.06)	3	0	7	101.9	9	0	0.164	-1.369	aryl_halide_X		
Range 95% Known Drugs^d	-	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-		

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδόν επιφάνειας van der Waals περιοχή (\AA^2) πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKhsa" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή <10 και (2) η PSA $<140 \text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

6.2.3 Ομάδα συνδέτες IV - Παράγωγα Βενζαμιδίου:

Προβλέψεις ADME: Οι προσδέτες της ομάδας IV (Σχήμα 6.1 (B)) είναι τα παράγωγα βενζαμιδίου [86] που παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.4. Συνεπώς, έχουν μια διαφορετική βασική δομή από τις ομάδες I-III, και η διαφορά αυτή αντανακλάται περαιτέρω στις τιμές της IC₅₀ του ενζύμου με τους προσδέτες να προκαλούν αναστολή σε επίπεδα μΜ στο ένζυμο σε σύγκριση τις ομάδες I-III με αναστολή σε επίπεδα nM. Παρ'όλα αυτά, οι προβλεπόμενες ιδιότητες ADME ταιριάζουν με εκείνες των ομάδων I-III για την από του στόματος βιοδιαθεσιμότητα, και με τις log K_{hsa} και log BB τιμές, να είναι όλες ευνοϊκές. Οι τιμές της διαλυτότητας (log S) για τους προσδέτες Benz-2 και Benz-3 είναι εκτός του εύρους του Jorgensen με τη χρήση του QikProp και πάλι, εντός των επιθυμητών ορίων με το ALOGPS.

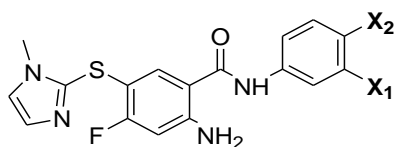
Προειδοποιήσεις Τοξικότητας λόγω δομής: Οι προσδέτες, εν τούτοις, προκαλούν πολλές προειδοποιήσεις λόγω δομής. Το αρυλαλογονίδιο εμφανίζεται και πάλι, αλλά αυτή τη φορά μη συγχωνευμένο με ομάδα ινδολίου. Ο προσδέτης Benz-1 περιέχει μια αρωματική αμίνη η οποία μπορεί να προκαλέσει μεθαιμοσφαιριναιμία, ακοκκιοκυττάρωση, απλαστική αναιμία, ηπατοτοξικότητα, υπερευαισθησία του δέρματος και αυξημένο κίνδυνο μεταλλαξιγένεσης [87]. Για όλους εκτός από έναν προσδέτη (Benz-10), υπάρχουν προειδοποιήσεις για ομάδα ανιλίνης. Υπάρχουν δύο κύριοι μηχανισμοί τοξικότητας της ανιλίνης: οξείδωση του αρωματικού δακτυλίου όρθο ή παρα του αζώτου της ανιλίνης, ή οξείδωση του ίδιου του αζώτου της ανιλίνης. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά παραδείγματα επιτυχημένων φαρμάκων που περιέχουν το κομμάτι της ανιλίνης με επιτυχείς λύσεις στο μπλοκάρισμα του φαινυλικού δακτυλίου στην όρθο και πάρα οξείδωση, απομάκρυνση του ανιλινικού αζώτου συνολικά ή δημιουργώντας έναν σκελετό ανιλίνης (μπλοκαρισμένη ανιλίνη) που δεν είναι δυνατόν να μεταβολιστεί προς το δραστικό ενδιάμεσο [87]. Πράγματι, οι ανιλίνες που έχουν μελετηθεί είναι ήδη πολύ υποκατεστημένες. Άλλες δομικές προειδοποιήσεις είναι για υπερίτη (mustard sulfur) για όλους τους προσδέτες εκτός του Benz-10, τριφθορο- για τον Benz-3, 1_2_dimethoxy για τον Benz-4 και μια ομάδα νιτριλίου για τους Benz-2 και Benz-10.

Ο υπερίτης (Sulfur Mustard, γνωστό κοινώς ως αέριο μουστάρδας) είναι γνωστός ως μία οργανική ένωση που περιγράφεται με τον τύπο (Cl-CH₂CH₂)₂S. Η ένωση εύκολα αφαιρεί ένα ιόν χλωρίου με ενδομοριακή πυρηνόφιλη υποκατάσταση για να

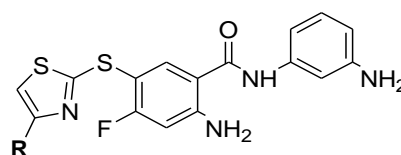
σχηματίζει ένα κυκλικό ιόν σουλφονίου. Αυτό το πολύ δραστικό ενδιάμεσο τείνει να αλκυλιώσει μόνιμα το νουκλεοτίδιο γουανίνης σε κλώνους DNA, κάτι που αποτρέπει την κυτταρική διαίρεση και γενικά οδηγεί απευθείας σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, ή, εάν ο κυτταρικός θάνατος δεν είναι άμεσος, το κατεστραμμένο DNA μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου. Ο υπερίτης δεν είναι πολύ διαλυτός στο νερό αλλά είναι πολύ διαλυτός στο λίπος, συμβάλλοντας στην ταχεία απορρόφηση του μέσα στο δέρμα. Μολονότι ελήφθησαν προειδοποιήσεις για υπερίτη, δεν είναι εμφανές εάν μπορούν να σχηματίσουν παρόμοια τοξικά ιόντα σουλφονίου. Για την προειδοποίηση τριφθορο, τα αλκυλαλογονίδια είναι ευαίσθητα σε πυρηνόφιλη προσβολή από κυστεΐνη-SH ή άλλα πυρηνόφιλα βιομόρια προς δημιουργία συμπλόκων [91]. Η τοξικότητά τους είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη χημική τους αντιδραστικότητα. Για την προειδοποίηση 1_2_dimethoxy όμως, μια αναζήτηση στη βιβλιογραφία δεν αποκάλυψε καμία γνωστή επίδραση τοξικότητας που να σχετίζεται με αυτή την ομάδα.

Benzamides

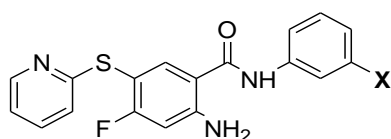
(Benz -)



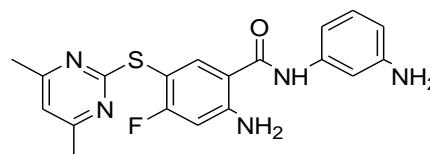
- (1) $X_1 = \text{NH}_2$; $X_2 = \text{H}$
 (2) $X_1 = \text{CN}$; $X_2 = \text{H}$
 (3) $X_1 = \text{CF}_3$; $X_2 = \text{H}$
 (4) $X_1 = \text{OMe}$; $X_2 = \text{OMe}$



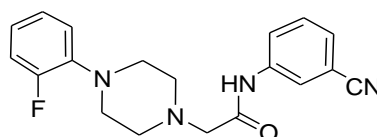
- (5) $R = \text{H}$
 (6) $R = \text{Me}$



- (7) $X = \text{NH}_2$
 (8) $X = \text{F}$



(9)



(10)

Εικόνα 6.4: Προσδέτες που ανήκουν στην Ομάδα IV του νέου αλλοστερικού κέντρου σύμφωνα με τη βασική δομή που περιγράφεται στο Σχήμα 6.1.

Πίνακας 6.3: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στη Νέα Αλλοστερική θέση δέσμευσης όπως αναφέρονται στην εικόνα 6.4

Ligand/Group/ Derivatives	IC50 enzyme (μM) (RMGPa)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b				Veber's Rules & Violations (V) ^b				log Kh _{sa}	log BB	Tox. struct. Warning
		MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)	V			
Group IV/ Benzamides																	
(Benz-1)	2.68	357.4	3	6	2.92 (2.28)	0	265.39	-4.64 (-3.48)	4	0	6	99.9	9	0	0.143	-1.286	aniline, aryl_halide_X, mustard_sulfur,
(Benz-2)*	9.87	367.4	2	6	3.18 (2.85)	0	207.23	-6.09 (-3.75)	2	1	6	99.8	8	0	0.271	-1.434	aniline, nitrile, aryl_halide_X, mustard_sulfur
(Benz-3)**	8.95	410.4	2	5	4.88 (3.91)	0	1002.31	-6.45 (-4.67)	3	1	5	74.0	7	0	0.656	-0.365	aniline, acyclic_halide, alkyl_halide_F, aryl_halide_X, mustard_sulfur, trifluoro
(Benz-4)	9.3	402.4	2	7	4.15 (2.77)	0	1040.28	-5.53 (-4.06)	3	0	7	89.8	9	0	0.456	-0.758	aniline, 1_2_dimethoxy, aryl_halide_X, mustard_sulfur
(Benz-5)	5.4	360.4	3	5	2.95 (2.75)	0	269.78	-4.72 (-4.52)	5	0	6	96.7	8	0	0.072	-1.172	aniline, aryl_halide_X, mustard_sulfur
(Benz-6)	3.5	374.5	3	5	3.31 (3.13)	0	309.94	-5.31 (-4.77)	6	0	6	96.4	8	0	0.219	-1.166	aniline, aryl_halide_X, mustard_sulfur
(Benz-7)	10.6	354.4	3	5	3.23 (2.82)	0	302.09	-4.84 (-4.43)	5	0	6	95.5	8	0	0.204	-1.225	aniline, aryl_halide_X, mustard_sulfur
(Benz-8)	7.2	357.4	2	4	4.46 (3.86)	0	1135.35	-5.67 (-5.01)	3	0	5	69.6	6	0	0.517	-0.442	aniline, aryl_halide_X, mustard_sulfur
(Benz-9)	9.8	383.4	3	6	3.42 (2.92)	0	294.16	-5.69 (-4.55)	6	0	6	106.0	9	0	0.334	-1.335	aniline, aryl_halide_X, mustard_sulfur
(Benz-10)	12.5	338.4	1	5	2.42 (2.57)	0	184.12	-4.52 (-3.57)	3	0	4	68.2	6	0	0.079	-0.412	nitrile, aryl_halide_X
Range 95% Known Drugs^d	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδόν επιφάνειας van der Waals περιοχή (\AA^2) πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKh_{sa}" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή <10 και (2) η PSA $<140 \text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

6.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι προσδέτες του νέου αλλοστερικού κέντρου αποτελούν πολλά υποσχόμενα εν δυνάμει φάρμακα αναφορικά με την αναστολή τους, τόσο στο ένζυμο όσο και στο κύτταρο. Οι ομάδες I-III παρουσιάζουν ως επί το πλείστον σταθερές αναστολής σε επίπεδο nM στο καθαρό ένζυμο και τιμές μερικών μM σε κυτταρικό επίπεδο, για τους προσδέτες που ελέγχθηκαν. Υπάρχουν μερικές προειδοποιήσεις λόγω δομής οι οποίες είναι σοβαρές, με έμφαση στα αρυλαλογονίδια και στις θιеноφενικές ομάδες (για τα θιеноπυρρόλες). Τα αρυλαλογονίδια ωστόσο είναι συντηγμένα ως μέρος των ινδολικών ομάδων, οπότε η προειδοποίηση τοξικότητας μπορεί να μην δικαιολογείται. Οι προσδέτες της ομάδας IV είναι λιγότερο ισχυροί, αλλά εξακολουθούν να αναστέλλουν με σταθερές αναστολής σε μM κάτι που μπορεί να βελτιωθεί με περαιτέρω βελτιστοποίηση. Ωστόσο, έχουν έναν αριθμό προειδοποιήσεων λόγω δομής, ιδίως σε σχέση με την ομάδα ανιλίνης και πάλι, το αρυλαλογονίδιο. Ωστόσο, για τους προσδέτες της ομάδα IV, το αρυλαλογονίδιο δεν ενσωματώνεται ως μέρος μιας ομάδας ινδολίου, και έτσι είναι πιθανό τα αποτελέσματα της τοξικότητάς τους να είναι πιο σοβαρά.

Κεφάλαιο 7

Αποτελέσματα προβλέψεων των ιδιοτήτων ADME(T) – Προσδέτες στο αλλοστερικό κέντρο.

7.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι προσδέτες του αλλοστερικού κέντρου επιλέχθηκαν κυρίως από τις αναφορές [6, 7]. Οι προσδέτες που μελετήθηκαν μπορούν να χωριστούν βάση της δομής τους σε τέσσερις κατηγορίες: ακυλο-ουρίες (acyl ureas), παράγωγα φθαλικού οξέος (phthalic acid derivatives), παράγωγα δίοξυ-διωδροπυριδίνης (dihydropyridine-diacid derivatives) και πεντακυκλικά τριτερπένια (pentacyclic triterpenes). Έχουμε δημιουργήσει επίσης μια

ομάδα για προσδότες παρασκευασμένους από φαρμακευτικές εταιρείες, οι οποίοι δεν ανήκουν σε καμία από τις παραπάνω κατηγορίες.

Οι ακυλο-ουρίες διαθέτουν άκαμπτες και επίπεδες δομές (Εικόνα 7.1) και έχουν μελετηθεί ευρέως ως αναστολείς της GP [7]. Ενώσεις που περιέχουν ακυλο-ουρίες είναι υποσχόμενα φάρμακα για αντιμετώπιση ποικίλων παθήσεων συμπεριλαμβανομένων, για παράδειγμα, των νευρολογικών ασθενειών και διαταραχών, όπως η επιληψία, ο νευροπαθητικός πόνος και διπολικές διαταραχές [92]. Αυτή η κατηγορία έχει παράγει ισχυρούς αναστολείς της GP τόσο στο καθαρό ένζυμο (δραστικότητα σε κλίμακα nM) όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (δραστικότητα χαμηλότερα από μM), για τον προσδότη A.U.4 (Πίνακας 7.1). Τα παράγωγα του φθαλικού οξέος που φαίνονται στην Εικόνα 7.2 χωρίζονται σε δύο ομάδες (I και II), ως αποτέλεσμα του υποκατεστημένου βενζολικού ή ναφθαλινικού δακτύλιου που ενσωματώνουν αντίστοιχα [7]. Εμφανίζουν επίσης δραστηριότητα χαμηλά σε nM στο καθαρό ένζυμο (Πίνακες 7.1 - 7.2), ωστόσο δεν υπάρχουν στοιχεία για την κυτταρική τους δράση. Η επόμενη κατηγορία προσδετών που διερευνήθηκαν είναι τα παράγωγα δίοξυ-διυδροπυριδίνης που φαίνονται στο Εικόνα 7.3. Και πάλι κι αυτοί οι προσδότες είναι ισχυροί αναστολείς του ενζύμου (χαμηλά σε nM) με μερικούς να εμφανίζουν επίσης κυτταρική δραστηριότητα σε nM (DpD.3, DpD.5, DpD.6). Τα πεντακυκλικά τριτερπένια είναι ευρέως καταναεμημένα σε όλο το φυτικό βασίλειο με διάφορες βιολογικές ιδιότητες και έχουν διερευνηθεί σημαντικά ως αντι-HIV και αντικαρκινικοί παράγοντες [67, 93]. Υποδιαιρούνται δομικά σε "ουρσανικού" τύπου (ursane) (Εικόνα 7.4), "ολεανανικού" τύπου (oleanane) (Εικόνα 7.5) και "λουπανικού" τύπου (lupane) (Εικόνα 7.6) παράγωγα. Τα πεντακυκλικά τριτερπένια εμφανίζουν χαμηλή ισχύ για τη GPα με μέτρια αναστολή σε μM στο ένζυμο και άγνωστες τιμές IC₅₀ στο κύτταρο [67]. Τέλος, οι προσδότες της τελευταίας ομάδας (W1807, Novo4j και FR258900), όπως ήδη αναφέρθηκε, δεν ανήκουν σε καμία από τις προηγούμενες κατηγορίες και φαίνονται στην Εικόνα 7.7. Η ένωση της Bayer W1807 είναι ο πιο ισχυρός γνωστός μέχρι σήμερα αναστολέας της GP προκαλώντας ελάττωση της γλυκόζης του αίματος σε αρουραίους και μειώνοντας τη γλυκογονόλυση τόσο με απενεργοποίηση όσο και με αναστολή της GPα [6]. Ο Novo4j είναι ένας μη φυσιολογικός αναστολέας (όπως ο W1807) που εκμεταλλεύεται το αλλοστερικό κέντρο

και ειδικότερα τη θέση αναγνώρισης φωσφορικών ιόντων (Arg309, Arg310, και Arg242), η οποία φυσιολογικά αναγνωρίζει φωσφορυλιωμένες ενώσεις (π.χ., AMP, ATP και Glc-6P). Κατά την πρόσδεση των αναστολέων W1807 και Nono4j, προκαλούνται δομικές μεταβολές στην διαμόρφωση του αλλοστερικού κέντρου που επηρεάζουν την πλαστικότητα του χώρου και φαίνεται πως είναι σημαντικές για τη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης στην ανενεργή διαμόρφωση T [67]. Ο FR258900 αναστέλλει την HLGPa με $IC_{50} = 2,5 \mu M$ [67, 94]. Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου RMGPb-FR258900 αποκάλυψε τη δέσμευσή του στο αλλοστερικό κέντρο ($K_i = 0,46 \mu M$ για την RMGPb) αν και ο FR258900 δεν έχει δομική ομοιότητα προς κανέναν από τους φυσιολογικούς αλλοστερικούς τροποποιητές (AMP, 6-φωσφορική γλυκόζη) [6, 7, 95]. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι το φαινόμενο να είναι οι σταθερές της αναστολής στο κύτταρο μικρότερες από εκείνες για το καθαρό ένζυμο, μπορεί να αποδοθεί στα επίπεδα του AMP τόσο στα πειράματα με καθαρό ένζυμο όσο και στα κυτταρικά, το οποίο ανταγωνίζεται με τους αναστολείς για τη δέσμευση στο αλλοστερικό κέντρο. Οι διαφορετικές δομικές κατηγορίες και οι διαφορετικοί τρόποι πρόσδεσης αλλοστερικών προσδετών αποκαλύπτουν έναν αξιοσημείωτο βαθμό προσαρμοστικότητας του αλλοστερικού κέντρου, η οποία επιτρέπει την εξειδικευμένη αναγνώριση ανόμοιων ενώσεων με την χρήση των ίδιων καταλοίπων της GP.

7.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.2.1. Προσδέτες ακυλο-ουρίας

Τα αποτελέσματα των προβλέψεων ADME(T) για τους προσδέτες ακυλο-ουρίας (Εικόνα 7.1) φαίνονται στον Πίνακα 7.1.

Προβλέψεις ADME: Οι ακυλο-ουρίες που φαίνονται στο Εικόνα 7.1, επιλέχθηκαν από την [7], παρουσιάζουν ποικίλη ανασταλτική ισχύ, με τα λιγότερο επίπεδα και άκαμπτα μόρια (A.U.5 και A.U.6) να έχουν τις χειρότερες τιμές IC_{50} . Από τα υπόλοιπα, τα οποία έχουν παρόμοια δομή για την ομάδα R^4 , ο A.U.1 έχει υψηλότερες τιμές IC_{50} τόσο για το καθαρό ένζυμο όσο και στο κύτταρο (ίσως επειδή είναι το πιο αλειφατικό και λιγότερο επίπεδο μόριο από όλα), ενώ οι A.U.2, A.U.3 και A.U.4 είναι αναστολείς με σταθερές αναστολής σε χαμηλά επίπεδα μM έως nM , με τον καθένα να παρουσιάζει προτίμηση για

το ένζυμο ή τα ηπατοκυττάρα, και τον προσδέτη A.U.4 να είναι πολύ ελπιδοφόρος και για τα δύο. Οι προβλέψεις ADME δεν παράγουν σχεδόν καθόλου παραβιάσεις των κανόνων Lipinski, Jorgensen ή Veber για τους προσδέτες με εξαίρεση της Caco-2 κυτταρικής διαπερατότητας όπου οι A.U.2, A.U.5 και A.U.6 μόλις που αποτυγχάνουν στον κανόνα του Jorgensen και είναι έξω από το εύρος για το 95% των γνωστών φαρμάκων, μαζί με τον A.U.1. Παρομοίως, ο A.U.6 παραβιάζει με μικρή απόκλιση τον κανόνα Veber για την PSA και το άθροισμα των δοτών και δεκτών H- δεσμού, αν και οι τιμές για τις ιδιότητες log BB και log K_{hsa} είναι για όλους στο επιθυμητό εύρος. Η δραματική διαφορά στις τιμές της IC₅₀ για τον προσδέτη A.U.1 στο ένζυμο (2 μM) και στο κύτταρο (80 μM) δεν αντιστοιχούσε σε καμία από τις προβλέψεις ADME και είναι πιθανόν να σχετίζεται με την αντιδραστικότητα (2 χλώρια και ένα άτομο οξυγόνου που συνδέονται στενά) και το μήκος της ομάδας R⁴, όπως σημειώνεται προηγουμένως.

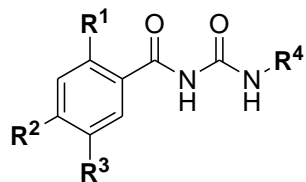
Προειδοποιήσεις Τοξικότητας λόγω δομής: Οι προειδοποιήσεις λόγω δομής για τις ακυλοουρίες αποκαλύπτουν την αναμενόμενη προειδοποίηση της ουρίας. Όλοι οι μη-αρωματικοί διπλοί δεσμοί που συνδέονται με μια ομάδα απόσπασης ηλεκτρονίου (electron withdrawing group / EWG) μπορούν να υποστούν ενδεχομένως την αντίδραση/προσθήκη Michael (Michael addition / reaction) δηλαδή την πυρηνόφιλη προσθήκη ενός καρβανιόντος ή άλλου πυρηνόφιλου μορίου σε μια αλφα, βήτα ακόρεστη καρβονυλική ένωση. Τοξικότητα μπορεί να προκύψει από μη ειδική πυρηνόφιλη προσβολή από μία κυστεΐνη-SH προς σχηματισμό ενός ομοιοπολικού συμπλόκου DNA προκαλώντας έτσι μεταλλαξιγένεση ή απώλεια πρωτεϊνικής λειτουργίας ή ανοσογονική απόκριση [87]. Η ουρία μπορεί να προκαλέσει ερεθισμούς στο δέρμα, στα μάτια και στην αναπνευστική οδό. Η επανειλημμένη ή παρατεταμένη επαφή με ουρία σε μορφή λιπάσματος στο δέρμα μπορεί να προκαλέσει δερματίτιδα. Υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα μπορεί να είναι επιζήμιες. Πρόσληψη χαμηλών συγκεντρώσεων ουρίας, όπως αυτές που βρίσκονται φυσιολογικά στα ανθρώπινα ούρα, δεν είναι επικίνδυνες με επιπλέον πρόσληψη νερού μέσα σε εύλογο χρονικό διάστημα [96].

Όλοι οι προσδέτες έχουν προειδοποιήσεις για αρυλαλογονίδια (αρωματικά αλογονίδια - aryl halides). Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, συνιστάται προσοχή σχετικά με την τοξικότητα του ήπατος [88]. Ο προσδέτης A.U.6 έχει μια πρόσθετη

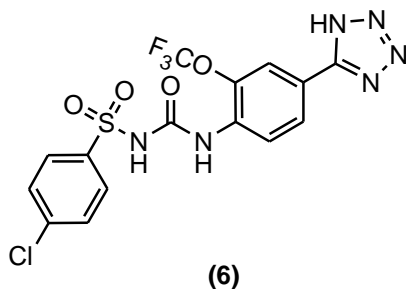
προειδοποίηση για σουλφοναμίδιο (sulfonamide). Τα σουλφοναμίδια (σουλφοναμίδες ως φάρμακα) έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν μια ποικιλία αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων παθήσεων του ουροποιητικού συστήματος, αιμοποιητικές διαταραχές, πορφυρία, και αντιδράσεις υπερευαισθησίας. Όταν χρησιμοποιούνται σε μεγάλες δόσεις, μπορούν να προκαλέσουν ισχυρή αλλεργική αντίδραση. Περίπου το 3% του γενικού πληθυσμού έχει ανεπιθύμητες αντιδράσεις κατά τη θεραπεία με σουλφοναμιδικά αντιμικροβιακά. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι οι ασθενείς με τον ιό HIV έχουν πολύ υψηλότερη επιρρέπεια, περίπου 60% [97]. Αντιδράσεις υπερευαισθησίας είναι λιγότερο συχνές σε μη αντιβιοτικά σουλφοναμίδια, και, αν και αμφιλεγόμενα, τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι άτομα με υπερευαισθησία σε αντιβιοτικά σουλφοναμιδίου (σουλφοναμίδες) δεν έχουν αυξημένο κίνδυνο αντίδρασης υπερευαισθησίας σε μη αντιβιοτικούς παράγοντες [98]. Οι πιο κοινές ενδείξεις αντίδρασης υπερευαισθησίας σε φάρμακα σουλφονίου είναι το εξάνθημα και η κνίδωση. Ωστόσο, υπάρχουν και αρκετές απειλητικές εκδηλώσεις υπερευαισθησίας σε σουλφοναμίδες, όπως το σύνδρομο Stevens-Johnson, η τοξική επιδερμική νεκρόλυση (επίσης γνωστή ως σύνδρομο Lyell), η ακοκκιοκυτταραιμία, η αιμολυτική αναιμία, η θρομβοκυτταροπενία, και η οξεία ηπατική νέκρωση, μεταξύ άλλων [99].

Acyl ureas

(A.U.)



Entry	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
(1)	Cl	H	H	
(2)	Cl	F	H	
(3)	Cl	F	H	
(4)	Cl	F	F	
(5)	Cl	F	H	



Εικόνα 7.1: Προσδέτες που ανήκουν στις ακυλο-ουρίες ως αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου.

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στην Αλλοστερική θέση όπως αναφέρονται στις εικόνες 7.1 και 7.2 (Group I)

Ligand/ Derivatives	IC50 enzyme (μM)	IC50 cell (μM)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b				Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b				Veber's Rules & Violations (V) ^b				log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning	
			MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Meta b (< 7)	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)						
Acyl Ureas	(HLGPa)	(HLGPa)																
A.U.1	2	80	473.7	3	7	4.72 (5.20)	0	23.08*	-6.49 (-6.28)	2	1	9	129.9	10	0	0.265	-1.750	aryl_halide_X, urea
A.U.2	0.21	2	366.7	3	7	2.64 (3.05)	0	20.63*	-4.42 (-4.90)	1	1	4	128.5	10	0	-0.246	-1.437	aryl_halide_X, urea
A.U.3	0.023	6.2	338.7	3	6	2.66 (3.13)	0	253.67	-4.25 (-4.48)	3	0	4	100.8	9	0	-0.029	-0.882	aryl_halide_X, urea
A.U.4	0.053	0.38	412.8	4	8	2.55 (2.70)	0	103.44	-4.74 (-4.71)	2	0	4	127.7	12	0	-0.161	-1.062	aryl_halide_X, urea
A.U.5	10	-	350.7	3	6	2.90 (3.12)	0	20.63*	-4.53 (-4.96)	1	1	4	122.7	9	0	-0.176	-1.417	aryl_halide_X, urea
A.U.6*	10	-	462.8	3	10	2.14 (3.10)	0	20.50*	-4.80 (-4.68)	1	1	4	156.7	13	1	-0.028	-1.823	acyclic_halide, sulfonamide, aryl_halide_X, urea
Phthalic Acid I-	(PLGPa)																	
Pht-I.1	1.3	-	422.4	3	10	2.55 (3.15)	0	3.27*	-2.97 (-5.26)	2	1	7	175.0	13	1	-0.430	-1.833	nitro
Pht-I.2	0.45	-	436.4	3	10	2.80 (3.53)	0	3.16*	-3.26 (-5.47)	3	1	7	176.4	13	1	-0.299	-1.844	nitro
Pht-I.3	0.09	-	436.4	3	10	2.82 (3.53)	0	3.20*	-3.46 (-5.47)	2	1	7	175.2	13	1	-0.311	-1.922	nitro
Pht-I.4*	0.14	-	479.4	4	12	1.97 (2.35)	1	0.93*	-3.56 (-5.46)	2	1	8	213.9*	16	1	-0.524	-2.642	nitro
Pht-I.5**	0.12	-	541.5	4	12	3.31 (3.85)	2	1.27*	-4.78 (-6.10)	2	1	9	210.6*	16	1	-0.211	-2.807	nitro
Pht-I.6***	0.09	-	667.4	4	12	3.98 (4.69)	2	1.49*	-5.62 (-6.08)	2	1	9	210.5*	16	1	-0.081	-2.600	nitro, aryl_halide_I
Pht-I.7****	0.074	-	586.5	4	15	2.61 (3.77)	2	0.15*	-4.94 (-6.15)	3	1	10	255.5*	19	1	-0.258	-3.967*	nitro
Pht-I.8****	0.7	-	600.5	4	15	2.97 (4.03)	2	0.21*	-5.11 (-6.29)	3	1	10	255.1*	19	1	-0.129	-3.755*	nitro
Range 95% Known Drugs^d	-	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδόν της επιφάνειας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστρεφές <10 και (2) η PSA $<140 \text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (για συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

7.2.2. Παράγωγα Φθαλικού οξέος ομάδας I & ομάδας II

Τα αποτελέσματα των προβλέψεων μας ADME(T) για τους προσδέτες Φθαλικού οξέος (Εικόνα 7.2) φαίνονται στους Πίνακες 7.1 (για την Ομάδα I) και 7.2 (για την Ομάδα II).

Προβλέψεις ADME: Όλα τα παράγωγα φθαλικού οξέος από τις δύο ομάδες (I και II), που επιλέγονται από την αναφορά [7] έχουν σταθερές αναστολής από χαμηλές τιμές μM έως και χαμηλές τιμές nM ως αναστολείς στο ένζυμο, με την ομάδα II να έχει τους πιο δραστικούς προσδέτες. Η κύρια δομή της ομάδας I φθαλικών οξέων έχει μια υδρόφοβη απλήρωτη περιοχή κοντά στο κεντρικό φαινυλικό δακτύλιο. Οι προσδέτες της ομάδας II δημιουργήθηκαν με βάση τα παραπάνω ως μια σειρά ναφθυλικών αναλόγων (naphthyl analogues) με ισχυρότερη συνάφεια προς το ένζυμο (Pht-II.1, Pht-II.2, Pht-II.3, Pht-II.4). Μεταξύ αυτών των ναφθαλινικών παραγώγων το 4-νιτρο-2-πυριδυλικό (4-nitro-2-pyridyl or 4-NO₂) παράγωγο (Pht-II.4) είναι το πιο αποτελεσματικό, αν και η 4-χλωρο- (4-Cl) ένωση (Pht-II.3) είναι επίσης αρκετά καλή [7]. Οι 3-φωσφορο- (3'-P) ενώσεις είναι περισσότερο αποτελεσματικές στο κύτταρο (Pht-II.6 και Pht-II.9) ενώ τα 4-φθορο- (4'-F) παράγωγα (Pht-II.7 και Pht-II.10) φαίνονται να είναι λιγότερο δραστικά [7].

Οι προβλέψεις ADME δεν παράγουν παραβιάσεις του κανόνα του Lipinski για φθαλικά παράγωγα της ομάδας I Pht-I.1 ως Pht-I.3, αλλά για τα Pht-I.4 ως Pht-I.8 μόνο ο προσδέτης Pht-I.4 έχει μία παραβίαση και οι άλλες τρεις ενώσεις έχουν από 2. Οι προσδέτες της ομάδας II είναι καλύτεροι, με ορισμένους μόλις να παραβαίνουν τον κανόνα του Lipinski για τον αριθμό των δεκτών H-δεσμού <10 (και αυτά είναι τα 4-NO₂ παράγωγα, Pht-II.4, Pht-II.8, Pht -II.9 και Pht-II.10), όμως όλοι βρίσκονται στο εύρος για το 95% των γνωστών φαρμάκων. Ο κανόνας του Veber για την PSA και το άθροισμα δεκτών/δοτών H-δεσμών παραβιάζεται από όλους τους προσδέτες της ομάδας I, κυρίως όμως από τους Pht-I.4 ως και Pht-I.8. Οι προσδέτες της ομάδας II ακολουθούν ως επί το πλείστον το ίδιο πρότυπο όπως για τις παραβιάσεις του κανόνα Lipinski, με όλες τις 4-NO₂ ενώσεις: Pht-II.2, Pht-II.4, Pht-II.8, Pht-II.9 και Pht-II. 10 να είναι εκτός των ορίων του κανόνα του Veber. Ωστόσο, το πιο έντονο πρόβλημα για όλους τους προσδέτες των δύο ομάδων φαίνεται να είναι η παραβίαση του κανόνα του Jorgensen για την Caco-2 κυτταρική διαπερατότητα, δεδομένου ότι η πλησιέστερη τιμή προς το όριο του κανόνα (> 22 nm / s) είναι για τον Pht-II.6 με

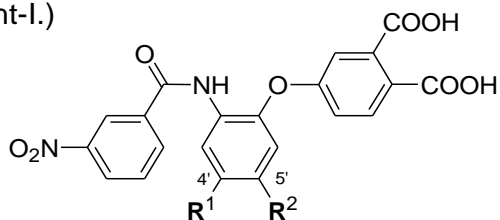
Caco-2 διαπερατότητα 13.73 nm / s, μια αρκετά χαμηλή τιμή. Ωστόσο, αυτός ίσως είναι ο λόγος για τον οποίο αυτός ο προσδέτης προκαλεί σημαντική ελάττωση των επιπέδων γλυκόζης του αίματος πριν (~ 50%) και μετά (λιγότερο από το βασικό) από επεξεργασία με γλυκαγόνη *in vivo* [7]. Τέλος, οι τιμές για τη log BB και τη log K_hsa για όλους τους προσδέτες είναι στο επιθυμητό εύρος, με εξαίρεση τους Pht-I.7 και Pht-I.8 των οποίων οι τιμές εκτός εύρους για τη log BB.

Προειδοποιήσεις Τοξικότητας λόγω δομής: Όλα τα παράγωγα φθαλικού οξέος της ομάδας I έχουν προειδοποιήσεις "νιτρο" λόγω δομής, ενώ η ένωση Pht-I.6 έχει επίσης μια προειδοποίηση *aryl_halide_I* (αρυλαλογονίδιο ιωδίου) εξαιτίας της υποκατάστασης του ιωδίου στον φαινυλικό δακτύλιο της ομάδας R¹. Μερικά από τα παράγωγα φθαλικού οξέος της ομάδας II (Pht-II.2, Pht-II.4, Pht-II.8, Pht-II.9, Pht-II.10) έχουν επίσης "νιτρο" προειδοποιήσεις. Επιπλέον, υπάρχουν γενικές προειδοποιήσεις αρυλαλογονιδίου για τα Pht-II.6, Pht-II.7, II.9 Pht-και-Pht II.10. Οι τοξικολογικές ιδιότητες των νιτρο-ομάδων (αζωτούχες ομάδες) έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης τα τελευταία 50 χρόνια. Οι περισσότερες ενώσεις που περιέχουν άζωτο μπορούν να προκαλέσουν μεθαιμοσφαιριναιμία και είναι δυνητικά μεταλλαξιόνες [100]. Μεταβολίτες νιτρο-αρωματικών ενώσεων έχουν αποδειχθεί ότι συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA. Η νίτρο-ομάδα μπορεί να αναχθεί προς το ίδιο δραστικό νιτροζο τοξικοφόρο όπως θα σχηματίζονταν από την οξειδωση της αντίστοιχης αρωματικής αμίνης. Η πορεία προς τον μετασχηματισμό σε ανιλίνη θα είναι αναγωγική [101]. Τρία διαδοχικά προϊόντα αναγωγής που παρατηρήθηκαν είναι αρωματικό νιτροζο (ArN = O), αρωματικές υδροξυλαμίνες (ArNHOH) και ανιλίνες (ArNH₂), τα οποία είναι όλα τοξικοφόρα από μόνα τους. Οι νιτροζο-αρωματικές ενώσεις είναι καρκινογόνες και τροποποιούν ομοιοπολικά τις πρωτεΐνες (π.χ. νιτροζο-αρωματική σήμανση/ τροποποίηση της C-93 στην αιμοσφαιρίνη). Οι υδροξυλαμίνες είναι γνωστό ότι τροποποιούν ομοιοπολικά το DNA μέσω ηλεκτρονιόφιλου νιτρενικού σχηματισμού (electrophilic nitrenium formation) από O-θειωμένους ή ακετυλιωμένους μεταβολίτες. Στους ανθρώπους, η οξειδάση της ξανθίνης και μικροσωμικό NADPH-κυτόχρωμα c (microsomal NADPH-cytochrome c) έχουν ταυτοποιηθεί ως ένζυμα που εμπλέκονται στην νίτρο-αναγωγή. Το μεγαλύτερο μέρος της νίτρο-αναγωγής συμβαίνει στο έντερο από αναερόβια βακτήρια [102]. Οξειδωτικές οδοί συμβάλλουν επίσης στον μεταβολισμό πολλών από αυτών των ενώσεων. Η οικογένεια των ενζύμων του κυτόχρωματος CYP είναι κυρίως υπεύθυνη

για τον οξειδωτικό μεταβολισμό αυτών των ενώσεων. Έχει προταθεί ότι στον αντιβακτηριακό παράγοντα χλωραμφαινικόλη (chloramphenicol), που περιέχει μια αρωματική νιτρική ομάδα και προκαλεί απλαστική αναιμία, μια νιτροζο-χλωραμφαινικόλη (nitrosochloramphenicol) μπορεί να εμπλέκεται ως τοξικό ενδιάμεσο [103, 104]. Σε αυτήν την περίπτωση, η χλωραμφαινικόλη ανάγεται προς νιτροζο-χλωραμφαινικόλη από τα εντερικά βακτήρια, η οποία με τη σειρά της N-οξυγονώνεται από ηπατικά μικροσώματα στην νιτροζομάδα. Οι τιμές K_m και V_{max} είναι παρόμοιες με εκείνες που αναφέρονται για την N-οξυγόνωση της ανιλίνης [87]. Εκτός από τους μηχανισμούς που υπάρχουν για άλλα αλογονίδια, τα οργανικά ιωδία μπορούν να προκαλέσουν υποθυρεοειδισμό, υπερθυρεοειδισμό, φωτοτοξικότητα, φωτοευαισθησία και ευαισθητοποίηση του δέρματος. Η έκθεση σε ιωδία μπορεί να προκαλέσει ιωδισμό (iodism), δηλαδή δηλητηρίαση από ιώδιο. Ηπατική και γενετική τοξικότητα έχει παρατηρηθεί για ορισμένα αρωματικά ιωδία (aryl iodides), αλλά δεν έχει τεκμηριωθεί ακόμη κάποια συγκεκριμένη τοξική δομική χαρακτηριστική ομάδα. Αρωματικές ενώσεις ιωδίου αναστέλλουν την 5'-μονοδιωδινάση (5'-monode-iodinase), το ένζυμο που καταλύει την περιφερική μετατροπή της T4 (θυροξίνη) σε T3 (τριωδοθυρονίνη). Η προκύπτουσα μείωση των επιπέδων της T3 στην κυκλοφορία διεγείρει την παραγωγή Θυροειδοτρόπου ορμόνης (TSH) από την υπόφυση [105, 106, 107, 108]. Χρόνια διέγερση της TSH του θυρεοειδούς αδένα κατ' αυτό τον τρόπο μπορεί να οδηγήσει σε υπερτροφία των θυλακιωδών κυττάρων (follicular cell hypertrophy), υπερπλασία και τελικά νεοπλασία. Υπερπλασία και νεοπλασία της υπόφυσης έχουν επίσης συσχετιστεί με χρόνια έκκριση της TSH. Οι άνθρωποι είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητοι στις επιδράσεις της χρόνιας διέγερσης του θυρεοειδούς από τα τρωκτικά [87].

Phthalic acid derivatives I

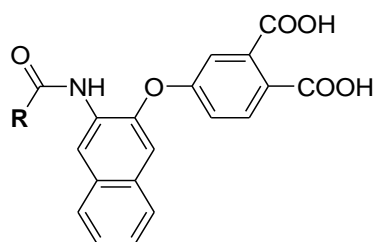
(Pht-I.)



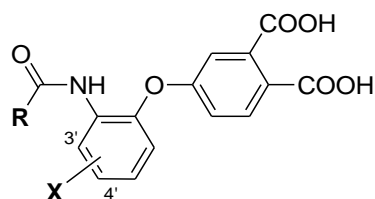
Entry	R ¹	R ²
(1)	H	H
(2)	CH ₃	H
(3)	H	CH ₃
(4)	CH ₃ -CONH	H
(5)	C ₆ H ₅ -CONH	H
(6)	4-I-C ₆ H ₄ -CONH	H
(7)	3-NO ₂ -C ₆ H ₄ -CONH	H
(8)	3-NO ₂ -C ₆ H ₄ -CONH	CH ₃

Phthalic acid derivatives II

(Pht-II.)



Entry	R
(1)	
(2)	
(3)	
(4)	

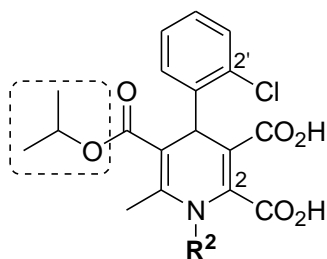


Entry	X	R
(5)	H	
(6)	3'-F	
(7)	4'-F	
(8)	H	
(9)	3'-F	
(10)	4'-F	

Εικόνα 7.2: Παράγωγα φθαλικού οξέος ως αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου.

Dihydropyridine-diacid derivatives

(DpD.)



Entry (1)	R ²	
rac-U6751	-CH ₂ CH ₃	
(2)	R	R'
(3)	H	H
(4)	H	Cl
(5)	Cl	Cl
(6)	NO ₂	H
	OMe	OMe

Εικόνα 7.3: Παράγωγα διοξυ-διυδροπυριδινών ως αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου.

7.2.3. Παράγωγα διοξυ-διυδροπυριδίνης

Τα αποτελέσματα των προβλέψεων ADME(T) για τα παράγωγα διοξυ-διυδροπυριδίνης (Εικόνα 7.3) παρουσιάζονται στους Πίνακες 7.2 και 7.3.

Προβλέψεις ADME: Τα παράγωγα διοξυ-διυδροπυριδίνης που παρουσιάζονται, είναι όλα δομικές παραλλαγές της διοξυ-διυδροπυριδίνης U6751 [7]. Επειδή αλλαγές όπως η αφαίρεση του Cl από την θέση 2' της U6751 ή η εξάλειψη της καρβοξυλικής ομάδας στη θέση 2 είχαν σαν αποτέλεσμα πολύ ασθενέστερη αναστολή, αποκαλύπτεται ότι μια σχεδόν κάθετη διάταξη του φαινυλικού και του πυριδινικού δακτυλίου είναι απαραίτητη για την πρόσδεση καθώς και ότι η λειτουργικότητα του διοξέος δεν μπορεί να παραλειφθεί. Αντικατάσταση της επισημασμένης ισοπροποξυλικής (isopropoxy) ομάδας για να δώσει διάφορα αμίδια παρείχε πολύ κακούς αναστολείς επίσης [7]. Τέλος, διάφορες υποκαταστάσεις στην βενζυλ-ομάδα (-R² ομάδα) οδήγησαν στις πολύ δραστικές ενώσεις DpD.3, DpD.4, DpD.5, DpD.6. Σε ηπατοκύτταρα το διμεθοξυ-παράγωγο (DpD.6) αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό, και η ένωση φάνηκε να μειώνει πολύ αποτελεσματικά τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος σε ποντικούς [7].

Οι προβλέψεις ADME παράγουν ωστόσο πολλές παραβιάσεις των κανόνων για όλα τα παράγωγα. Όλοι οι προσδέτες εκτός των DpD.1 και DpD.2 παραβιάζουν τον κανόνα Lipinski τουλάχιστον μια φορά, με τις τιμές να είναι όμως λίγο πάνω από τα όρια και εντός του εύρους του 95% των γνωστών φαρμάκων. Το ίδιο ακριβώς ισχύει και για τον κανόνα του Jorgensen, με όλους τους προσδέτες να έχουν τουλάχιστον 1 παραβίαση, λόγω της πολύ χαμηλής Caco-2 κυτταρικής διαπερατότητας που εμφανίζουν, και με τους DpD.3 - DpD.4 να έχουν μια δεύτερη, αλλά αρκετά κοντά στις κατάλληλες τιμές. Ο κανόνας του Veber δεν εμφανίζει καμία παραβίαση για κάποιον από τους προσδέτες και ομοίως, οι τιμές για τις log BB και log K_{hsa} είναι στο επιθυμητό εύρος.

Προειδοποιήσεις Τοξικότητας λόγω δομής: Όλες οι ενώσεις της ομάδας αυτής έχουν τις προειδοποιήσεις "κυκλικός δέκτης Michael (michael_acceptor_cyclic)" και "αρυλαλογονίδιο (aryl_halide_X)" (βλ. προηγούμενες ομάδες προσδετών, π.χ. ακυλοουρίες και δομικές προειδοποιήσεις τοξικότητας στην ενότητα 6.2.1 [88]) λόγω μιας ή περισσοτέρων υποκαταστάσεων χλωρίου σε καθέναν από τους δακτυλίους των ενώσεων. Μια από αυτές (DpD.5) έχει επίσης μια "νιτρο" προειδοποίηση (βλ. προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής των ομάδων του Φθαλικού οξέος), ενώ ένα άλλο παράγωγο (DpD.6) έχει μια "1_2_διμέθοξυ (1_2_dimethoxy)" προειδοποίηση. Για την προσθήκη Michael, έχουμε ήδη συζητήσει (βλ. ενότητα 7.2.1). Σε αυτή την περίπτωση πρόκειται για μια "κυκλική" προειδοποίηση. Για να ανακεφαλαιώσουμε, η αντίδραση Michael ή προσθήκη Michael είναι η πυρηνόφιλη προσθήκη ενός καρβανιόντος ή άλλου πυρηνόφιλου σε μια άλφα, βήτα ακόρεστη καρβονυλική ένωση. Όλοι οι μη-αρωματικοί διπλοί δεσμοί που συνδέονται σε μία EWG ομάδα μπορούν δυνητικά να υποβληθούν σε προσθήκη Michael *in vivo* με πυρηνόφιλα όπως η γλουταθειόνη. Οι ομάδες EWG περιλαμβάνουν κυρίως -CO₂R, -CON₂R, -CN, -SO₂C, -SO₂NR₂, εποξειδία και κετόνες. Η τοξικότητα παρουσιάζεται λόγω μη ειδικής πυρηνόφιλης προσβολής από μία κυστεΐνη-SH προς σχηματισμό ενός ομοιοπολικού συμπλόκου που προκαλεί μεταλλαξιγένεση του DNA ή απώλεια πρωτεϊνικής λειτουργίας ή ανοσογόνο απόκριση. Οι δέκτες Michael με ένα β-άζωτο συνδεδεμένο σε ένα σύστημα δακτυλίου που περιέχει χαρακτηριστική ομάδα αλκενίου είναι λιγότερο ικανοί για προσθήκη γλουταθειόνης ή κυστεΐνης εντός του διπλού δεσμού [87].

Πίνακας 7.2: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στο αλλοστερικό κέντρο όπως αναφέρονται στις εικόνες 7.2 (Group II) και 7.3

Ligand/ Derivatives	IC50 enzyme (μM)	EC50 cell (μM)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b				Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b				Veber's Rules & Violations (V) ^b				log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning	
			MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA ($<$ 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)				V
Phthalic Acid II-	(HLGP)																	
Pht-II.1**	2.88	-	427.4	3	7	3.87 (4.30)	0	9.03*	-4.38 (-5.69)	0*	1	6	132.3	10	0	-0.075	-1.574	-
Pht-II.2	0.023	-	472.4	3	10	3.46 (4.20)	0	3.38*	-4.00 (-5.86)	1	1	7	175.6	13	1	-0.130	-1.945	nitro
Pht-II.3	0.002	-	462.9	3	8	3.91 (3.95)	0	7.81*	-4.86 (-5.72)	1	1	6	144.0	11	0	-0.137	-1.525	-
Pht-II.4*	0.001	-	473.4	3	11	2.76 (3.30)	1	0.90*	-4.36 (-5.48)	2	1	7	189.0	14	1	-0.265	-2.730	nitro
Pht-II.5	0.017	-	412.8	3	8	3.04 (2.89)	0	7.70*	-3.80 (-4.90)	2	1	6	144.0	11	0	-0.433	-1.417	-
Pht-II.6	0.01	-	430.8	3	8	3.18 (2.99)	0	13.73*	-3.37 (-5.20)	2	1	6	142.3	11	0	-0.439	-0.989	aryl_halide_X
Pht-II.7	0.078	-	430.8	3	8	3.27 (3.06)	0	7.61*	-4.16 (-5.25)	2	1	6	144.0	11	0	-0.399	-1.330	aryl_halide_X
Pht-II.8*	0.003	-	423.3	3	11	1.93 (2.25)	1	1.95*	-2.77 (-4.83)	3	1	7	186.4	14	1	-0.604	-2.068	nitro
Pht-II.9*	0.001	-	441.3	3	11	2.25 (2.36)	1	3.02*	-2.72 (-4.88)	3	1	7	185.3	14	1	-0.553	-1.702	nitro, aryl_halide_X
Pht-II.10*	0.013	-	441.3	3	11	2.11 (2.43)	1	0.92*	-3.64 (-4.87)	3	1	7	189.0	14	1	-0.523	-2.460	nitro, aryl_halide_X
Dihydropyridine- diacid -	(HLGPa)																	
DpD.1/ rac-U6751	0.039	2.23	393.8	2	7	3.79 (2.63)	0	9.33*	-4.54 (-4.32)	3	1	5	121.1	9	0	0.010	-1.372	michael_acceptor_cyclic, aryl_halide_X
DpD.2	0.011	1.13	455.9	2	7	4.83 (3.70)	0	8.50*	-5.47 (-5.26)	4	1	6	121.3	9	0	0.341	-1.538	michael_acceptor_cyclic, aryl_halide_X
DpD.3	0.002	0.48	490.3	2	7	5.22 (4.31)	1	10.17*	-5.78 (-4.97)	4	2	6	121.4	9	0	0.407	-1.275	michael_acceptor_cyclic, aryl_halide_X
Range 95% Known Drugs^d	-	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-

^a Τα ADME δεδομένα υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδόν της επιφάνειας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKhsa" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών με δυνατότητα περιστροφής <10 και (2) η PSA $<140 \text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στο αλλοστερικό κέντρο όπως αναφέρονται στις εικόνες 7.3 (συνέχεια) και 7.4

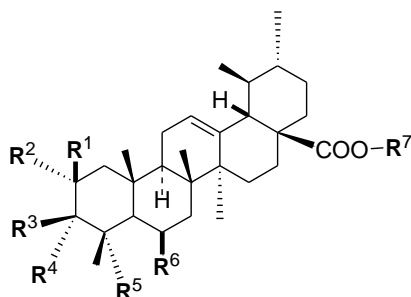
Ligand/ Derivatives	IC50 enzyme (μM) (HLGPa)	EC50 cell (μM) (HLGPa)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b					Veber's Rules & Violations (V) ^b					log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning
			MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)	V					
DpD.4*	0.013	1.06	524.8	2	7	5.89 (4.91)	2	13.92*	-6.59* (-6.23)	4	2	6	123.6	9	0	0.559	-1.044	michael_acceptor_cyclic, aryl_halide_X		
DpD.5	0.005	0.44	500.9	2	10	4.46 (3.65)	1	2.64*	-5.31 (-5.63)	5	1	7	168.7	12	0	0.293	-2.012	michael_acceptor_cyclic, nitro, aryl_halide_X		
DpD.6	0.004	0.27	515.9	2	9	5.02 (3.39)	2	13.53*	-5.01 (-5.39)	6	1	8	139.4	11	0	0.297	-1.332	michael_acceptor_cyclic, 1_2_dimethoxy, aryl_halide_X		
PENTACYCLIC TRITERPENES (P.Tr)	(RMGPa)																			
(P.Tr) Ursane type																				
P.Tr.Urs.1/ ursolic.acid**	9	-	456.7	2	3	6.11 (6.66)	1	278.49	-6.91* (-5.89)	3	1	2	61.7	5	0	1.369	-0.430	alkene		
P.Tr.Urs.2/ 3-epiursolic.acid**	19	-	456.7	2	3	6.13 (6.66)	1	301.19	-6.87* (-5.89)	3	1	2	61.0	5	0	1.367	-0.394	alkene		
P.Tr.Urs.3/ corosolic.acid**	20	-	472.7	3	4	5.19 (5.75)	1	72.81	-6.93* (-5.01)	4	1	3	82.6	7	0	1.085	-1.148	alkene		
P.Tr.Urs.4/ asiatic.acid*	17	-	488.7	4	5	4.14 (4.78)	0	54.21	-5.33 (-4.63)	5	0	5	101.8	9	0	0.622	-1.257	alkene		
P.Tr.Urs.5 ***	4.1	-	542.8	1	5	6.82* (7.10)	2	780.90	-9.07* (-6.38)	4	1	5	841.2*	6	0	1.919*	-0.961	alkene		
P.Tr.Urs.6 ***	7.3	-	528.8	0	4	6.75* (7.71)	2	1045.08	-7.92* (-6.65)	3	1	3	649.3*	4	0	1.882*	-0.549	alkene		
P.Tr.Urs.7 *****	3.3	-	570.9	2	5	7.64* (7.87)	2	202.55	-9.05* (-6.09)	4	1	7	944.5*	7	0	1.813*	-1.066	alkene		
P.Tr.Urs.8 ***	5.1	-	576.8	2	5	7.47* (7.71)	2	163.15	-9.01* (-6.08)	3	1	4	931.5*	7	0	1.802*	-0.955	alkene		
Range 95% Known Drugs^d	-	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-		

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδόν της επιφάνειας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKhsa" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών που επιτρέπουν περιστροφή <10 και (2) η PSA $<140 \text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

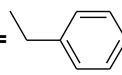
PENTACYCLIC TRITERPENES (P.Tr)

Ursane type

(Urs.)



Entry

- | | |
|-------------------------|--|
| (1) / ursolic.acid | $R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = R^6 = R^7 = H$
$R^3 = OH$ |
| (2) / 3-epiursolic.acid | $R^1 = R^2 = R^3 = R^5 = R^6 = R^7 = H$
$R^4 = OH$ |
| (3) / corosolic.acid | $R^1 = R^4 = R^5 = R^6 = R^7 = H$
$R^2 = R^3 = OH$ |
| (4) / asiatic.acid | $R^1 = R^4 = R^6 = R^7 = H$
$R^2 = R^3 = R^5 = OH$ |
| (5) | $R^1 = R^2 = R^4 = R^6 = H, R^3 = OH,$
$R^5 = Me, R^7 = CH_2CO_2Et$ |
| (6) | $R^1 + R^2 \rightarrow =O$
$R^3 + R^4 \rightarrow =O$
$R^5 = Me, R^6 = H, R^7 =$  |
| (7) | $R^1 = R^4 = R^6 = R^7 = H, R^3 = OH$
$R^2 = -OCO(CH_2)_4CH_3, R^5 = Me$ |
| (8) | $R^1 = R^4 = R^6 = R^7 = H, R^3 = OH$
$R^2 = -OCOC_6H_5, R^5 = Me$ |

Εικόνα 7.4: Πεντακυκλικά τριτερπένια (ουρσανικού τύπου) ως αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου.

7.2.4 Πεντακυκλικά τριτερπένια

Τα αποτελέσματα των ADME(T) προβλέψεων για τα πεντακυκλικά τριτερπένια (Εικόνες 7.4, 7.5 και 7.6) φαίνονται στους Πίνακες 7.3 και 7.4.

Προβλέψεις ADME: Τα πεντακυκλικά τριτερπένια, επιλέχθηκαν από [7, 67], και χωρίζονται σε 3 υπο-ομάδες με βάση τον δομικό σκελετό τους: προσδέτες που ανήκουν στον Ουρσανικό (Ursane) τύπο (Εικόνα 7.4), στον Ολεανανικό (Oleanane) τύπο (Εικόνα 7.5) και στον Λουπανικό (Lupane) τύπο (Εικόνα 7.6). Το ουρσολικό οξύ (P.Tr.Urs.1) και το ολεανολικό οξύ (P.Tr.Ol.1) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βάσεις για την παραγωγή των προσδετών Ουρσανικού και Ολεανανικού τύπου αντίστοιχα, μέσω κατάλληλων χημικών αντιδράσεων / μετασχηματισμών [7]. Μερικά από αυτά είναι ενδιάμεσα βενζυλεστέρων. Το ολεανολικό οξύ (P.Tr.Ol.1) (όντας σε ενεργό κλινική

χρήση ως φάρμακο κατά της ηπατίτιδας στην Κίνα) είχε *in vivo* υπογλυκαιμική δράση και αποδείχθηκε ένας αρκετά καλός αναστολέας [7].

Το κοροζολικό οξύ (Corosolic acid / P.Tr.Urs.3) είναι κύριο δραστικό συστατικό ενός φυτικού εκχυλίσματος που διατίθενται στην αγορά της Ιαπωνίας και των ΗΠΑ για την μείωση των επιπέδων του σακχάρου στο αίμα, ενώ το μασλινικό οξύ (maslinic acid / P.Tr.Ol.3) βρίσκεται σε αφθονία στον καρπό της ελιάς. Και τα δύο ταυτοποιήθηκαν ως μικρομοριακοί (μM) αναστολείς της RMGPa [109]. Οι προσδέτες λουπανικού τύπου είναι συνήθως παράγωγα με χαμηλή ισχύ προς την RMGPa. Το συμπέρασμα ότι οι βενζυλεστέρες ότι είναι πιο αδύναμοι αναστολείς από τα περισσότερα οξέα ως μια γενική τάση [7] συνάδει με τα αποτελέσματα των προβλέψεων ADME για τους προσδέτες P.Tr.Ol.7 και P.Tr.Ol.8. Και οι δύο αυτοί προσδέτες θεωρούνται ως "αρκετά" ισχυροί για βενζυλεστέρες στην αναφορά [7], λόγω ενός μεγάλου υδρόφοβου υποκαταστάτη και μία ομάδα υδροξυμεθυλενίου. Ωστόσο, βρίσκονται πολύ έξω από τα όρια του κανόνα Lipinski δυο φορές (για $\log P$ και Μοριακό Βάρος) και μία φορά για τον κανόνα Jorgensen (για την $\log S$). Αυτό δεν προκαλεί καμία εντύπωση βέβαια, δεδομένου ότι όλοι οι προσδέτες παραβιάζουν τουλάχιστον μία φορά και τους δύο κανόνες και όλοι για τις ίδιες ιδιότητες. Επιπλέον, φαίνεται ότι τα οξέα (συμπεριλαμβανομένων και των τριών προσδετών λουπανικού τύπου) είναι πιο κοντά στις κατάλληλες τιμές (ή απλώς λίγο έξω από το κατάλληλο εύρος σε περίπτωση παραβίασης), ενώ τα ανάλογα εστέρων (P.Tr.Urs.5, P.Tr. Ol.7, P.Tr.Ol.8 και P.Tr.Ol.9) είναι ακόμη και πέρα από το εύρος του 95% των γνωστών φαρμάκων μερικές φορές, μαζί με τα παράγωγα που προέρχονται από τροποποίηση του κοροζολικού οξέος [7] (P.Tr.Urs.6 , P.Tr.Urs.7, P.Tr.Urs.8), όλα με 2 παραβιάσεις του κανόνα Lipinski και 1 για τον Jorgensen. Παρ' όλα αυτά υπάρχει ένας προσδέτης χωρίς καμιά παραβίαση των κανόνων, το ασιατικό οξύ (asiatic acid / P.Tr.Urs.4). Στην περίπτωση του κανόνα του Veber δεν υπάρχουν παραβιάσεις, αλλά τα προηγουμένως αναφερθέντα ανάλογα κοροζολικού οξέος έχουν πολύ υψηλές τιμές της PSA. Τέλος, οι τιμές για τη $\log BB$ είναι όλες στο επιθυμητό εύρος, ενώ για τη $\log Khsa$ ακολουθούν το πρότυπο παραβιάσεων των εστέρων και των αναλόγων κοροζολικού οξέος. Αξιοσημείωτο όμως είναι ότι οι προσδέτες με τις περισσότερες και πιο καταφανείς παραβιάσεις κανόνων, έχουν υψηλότερη (καλύτερη) τιμή για την Caco-2 κυτταρική διαπερατότητα (με την

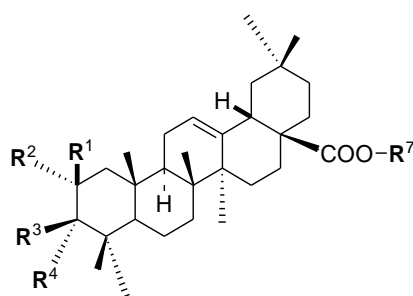
εξαίρεση της P.Tr.OI.6 που έχει μια πολύ χαμηλή τιμή), κάτι που ίσως πρέπει να ληφθεί υπόψη για περαιτέρω φαρμακευτικές μελέτες τέτοιων ενώσεων.

Προειδοποιήσεις Τοξικότητας λόγω δομής: Όλοι οι προσδέτες των 3 υπο-ομάδων έχουν μια προειδοποίηση για "αλκένιο (alkene)", που είδαμε προηγουμένως στο κεφάλαιο 5 (ενότητα 5.2.4) για τα παράγωγα φλαβοπυριδόλης. Επιπλέον, το ολεανανικού τύπου τριτερπένιο P.Tr.OI.5 (oleanonic.acid) έχει μια προειδοποίηση για "κυκλική κετόνη (cyclic_ketone)", ενώ το P.Tr.OI.9 έχει μια προειδοποίηση "αλκυλαλογονίδιο διάφορο του Φθορίου (alkyl_halide_noF)" για το αλκυλο-Br (αλκυλαλοβρωμίδιο) που περιέχει καθώς και μια σχετική "ακυκλικό αλογονίδιο (acyclic_halide)" προειδοποίηση. Τα μονοαλκυλαλοφθορίδια (mono alkyl fluorides) είναι λιγότερο ευαίσθητα σε πυρηνόφιλη προσβολή. Τα αλκυλαλογονίδια και τα σουλφονίδια είναι ευαίσθητα σε πυρηνόφιλη προσβολή από κυστεΐνη-SH ή άλλα πυρηνόφιλα βιομόρια προς σχηματισμό συμπλόκων [87]. Η τοξικότητά τους είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη χημική τους δραστηριότητα. Πολλά αλκυλαλογονίδια και θειικά έχουν αναφερθεί ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Ο σχεδιασμένος τρόπος δράσης τους είναι η αλκυλίωση του DNA, και ως εκ τούτου είναι κυτταροτοξικά με πολλές παρενέργειες. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η γενετική τοξικότητα ενσωματώνεται κατά τον σχεδιασμό και αποτελεί μέρος της ανάλυσης του κινδύνου για ανάπτυξη και χρήση [87]. Τέλος, όλες οι ενώσεις λουπανικού τύπου έχουν επίσης μια προειδοποίηση «τελικό βινύλιο (terminal_vinyl)" που σχετίζεται με την ενδεχόμενη αντιδραστικότητα της ομάδα αλκενίου $-C(Me)=CH_2$.

PENTACYCLIC TRITERPENES (P.Tr)

Oleanane type

(Ol.)



(1) oleanolic.acid $R^1 = R^2 = R^4 = R^7 = H, R^3 = OH$

(2) 3-epioleanolic.acid $R^1 = R^2 = R^3 = R^7 = H, R^4 = OH$

(3) maslinic.acid $R^1 = R^4 = R^7 = H, R^2 = R^3 = OH$

(4) augustic.acid $R^2 = R^4 = R^7 = H, R^1 = R^3 = OH$

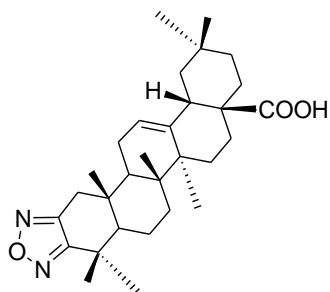
(5) oleanonic.acid $R^1 = R^2 = R^7 = H,$
 $R^3 + R^4 \rightarrow =O$

(6) $R^1 = R^2 = R^4 = R^7 = H,$
 $R^3 = -OCOCH_2CH_2COOH$

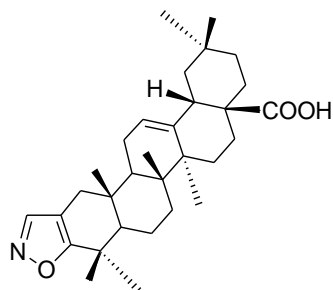
(7) $R^1 + R^2 \rightarrow 2,4\text{-diCl-C}_6\text{H}_3\text{-CH}_2\text{-O-N}$
 $R^3 + R^4 \rightarrow =O$
 $R^7 =$

(8) $R^1 + R^2 \rightarrow$
 $R^3 + R^4 \rightarrow =O$
 $R^7 =$

(9) $R^1 = R^4 = H, R^2 = R^3 = OH$
 $R^7 = (CH_2)_4Br$



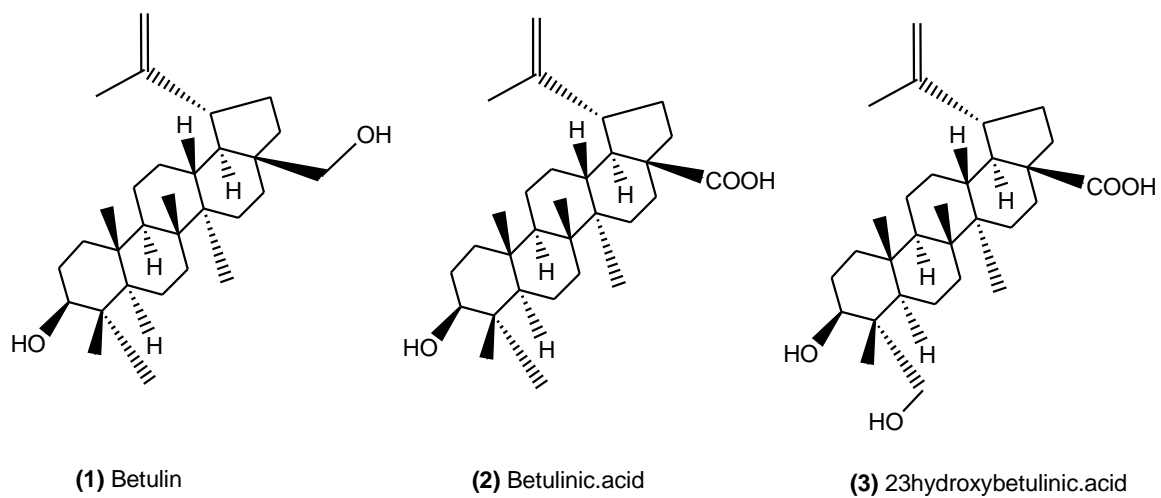
(10)



(11)

Εικόνα 7.5: Πεντακυκλικά τριτερπένια (ολεανανικού τύπου) ως αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου.

(P.Tr) Lupane type
(Lup.)



Εικόνα 7.6: Πεντακυκλικά τριτερπένια (λουπανικού τύπου) ως αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου.

Πίνακας 7.4: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στο αλλοστερικό κέντρο όπως αναφέρονται στις εικόνες 7.5 and 7.6.

Ligand/ Derivatives	IC50 enzyme (μM) (RMGPa)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b					Veber's Rules & Violations (V) ^b				log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning
		MW (<500)	Num. H- bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)	V				
(P.Tr) Oleanane type																		
P.Tr.Ol.1/ oleanolic.acid**	14	456.7	2	3	6.16 (6.79)	1	289.86	-6.95* (-5.75)	3	1	2	61.7	5	0	1.383	-0.415	alkene	
P.Tr.Ol.2/ 3-epioleanolic.acid**	21	456.7	2	3	6.22 (6.79)	1	313.58	-7.06* (-5.75)	3	1	2	60.9	5	0	1.394	-0.395	alkene	
P.Tr.Ol.3/ maslinic.acid*	28	472.7	3	4	5.13 (5.85)	1	117.39	-6.24 (-5.07)	4	1	3	82.6	7	0	1.008	-0.843	alkene	
P.Tr.Ol.4/ augustic.acid*	34	472.7	3	4	5.22 (5.85)	1	153.78	-6.31 (-5.07)	4	1	3	79.3	7	0	1.010	-0.747	alkene	
P.Tr.Ol.5/ oleanonic.acid*	18	454.7	1	3	6.18 (6.59)	1	281.09	-7.15* (-5.93)	3	1	1	68.3	4	0	1.430	-0.369	alkene, cyclic_ketone	
P.Tr.Ol.6**	8	540.8	2	6	6.55* (6.66)	2	9.00*	-7.77* (-5.95)	5	2	5	116.9	8	0	1.286	-1.622	alkene	
P.Tr.Ol.7*****	nd (8)	718.8	0	5	9.86 (10.54)	2	2537.1	-12.11* (-7.84)	4	1	6	69.2	5	0	2.502*	-0.219	alkene	
P.Tr.Ol.8***	nd (6.3)	558.8	1	4	7.38* (7.80)	2	1413.21	-8.72* (-6.34)	3	1	4	69.4	5	0	1.945*	-0.569	alkene	
P.Tr.Ol.9***	7	607.7	2	4	7.28* (7.67)	2	1230.71	-8.83* (-6.26)	4	1	7	67.2	6	0	1.859*	-0.629	alkyl_halide_noF, acyclic_halide, alkene	
P.Tr.Ol.10*	11.2	480.7	1	5	5.88 (6.83)	1	94.40	-7.36* (-4.95)	3	1	1	88.0	6	0	1.440	-0.836	alkene	
P.Tr.Ol.11***	12.7	479.7	1	4	6.73* (7.00)	1	212.62	-7.89* (-5.12)	3	1	1	69.8	5	0	1.693*	-0.513	alkene	
(P.Tr) Lupane type																		
P.Tr.Lup.1/ Betulin****	17	442.7	2	2	6.01 (6.88)	1	2047.84	-6.87* (-6.14)	4	1	4	38.9	4	0	1.534*	-0.314	alkene, terminal_vinyl	
P.Tr.Lup.2/ Betulinic.acid**	43	456.7	2	3	6.24 (6.75)	1	280.43	-6.88* (-6.35)	3	1	3	60.3	5	0	1.375	-0.491	alkene, terminal_vinyl	
P.Tr.Lup.3/ 23hydroxybetulinic.acid*	16	472.7	3	4	5.22 (5.82)	1	122.13	-5.99 (-5.40)	4	1	5	79.5	7	0	0.952	-0.951	alkene, terminal_vinyl	
Range 95% Known Drugs^d	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-	

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδόν της επιφάνειας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKhsa" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών με δυνατότητα περιστροφής <10 και (2) η PSA $<140 \text{\AA}^2$, ή το άθροισμα δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

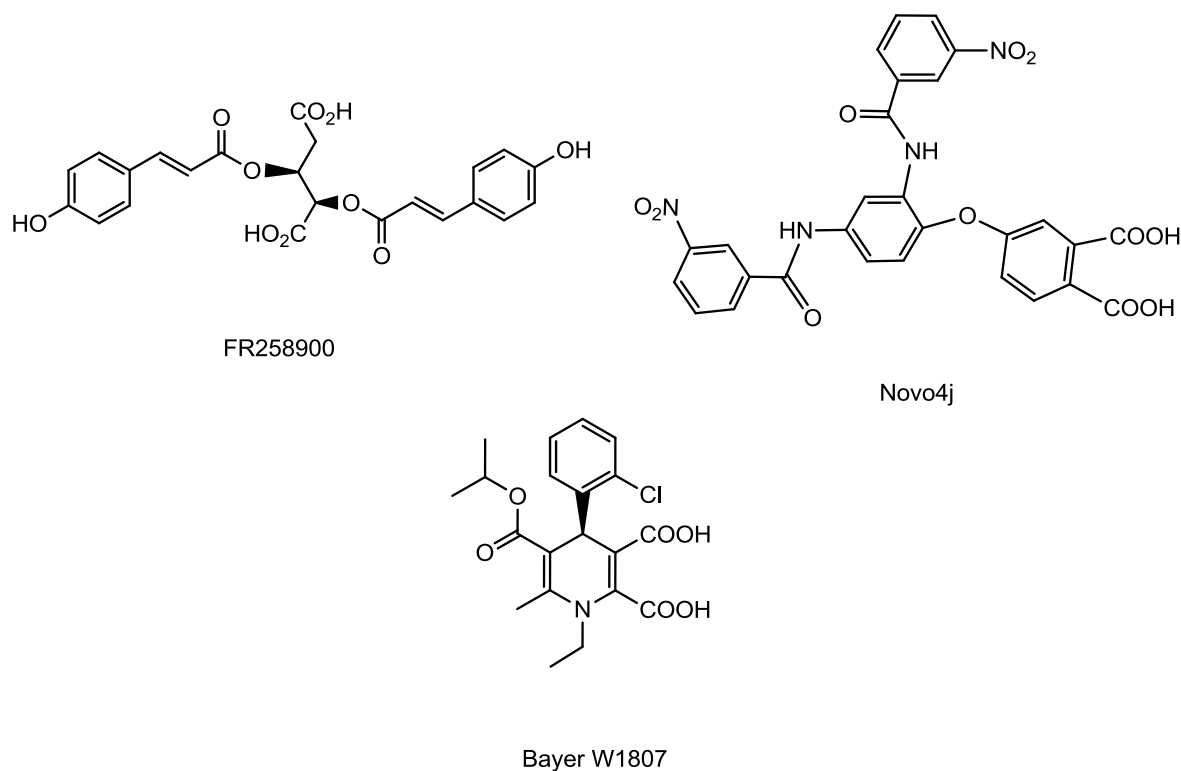
7.2.5 Άλλοι αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου

Τα αποτελέσματα των προβλέψεων ADME(T) γι' αυτή την ομάδα προσδετών (Εικόνα 7.7), φαίνονται στον Πίνακα 7.5.

Προβλέψεις ADME: Οι ενώσεις αυτής της ενότητας είναι μη φυσιολογικοί, ευρέως γνωστοί και μελετημένοι προσδέτες [6, 7, 67] του αλλοστερικού κέντρου. Η ένωση Bayer W1807 που έχει ελάχιστη χημική ομοιότητα με οποιονδήποτε από τους γνωστούς φυσιολογικούς τροποποιητές της GP, αποτελεί τον πιο ισχυρό αναστολέα της GP που είναι γνωστός μέχρι σήμερα (βλ. παράγραφο 1.3.2). Οι προβλέψεις ADME είναι συνεπείς με την ισχύ αυτής της ένωσης, καθώς δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου παραβάσεις των κανόνων Lipinski, Jorgensen ή Veber, με την εξαίρεση της χαμηλής τιμής για την Caco-2 κυτταρική διαπερατότητα για τον Jorgensen. Οι log BB και log K_{hsa} είναι επίσης στο επιθυμητό εύρος. Ο Nono4j είναι επίσης ένας μη φυσιολογικός αναστολέας, όπως ο W1807. Κατά τη σύνδεση αυτών των αναστολέων υπάρχουν δομικές μεταβολές στην περιοχή κοντά στο αλλοστερικό κέντρο που επηρεάζουν την πλαστικότητα του χώρου της θέσης και είναι σημαντικές για τη σταθεροποίηση της διαμόρφωσης στην ανενεργή διαμόρφωση T. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν την ικανότητα της GP να διακρίνει μεταξύ των διαφόρων ειδικών ισχυρών αναστολέων λόγω δομικής ευελιξίας της πρωτεΐνης στην περιοχή του αλλοστερικού κέντρου [67]. Για το Nono4j, οι σταθερές αναστολής στο κύτταρο είναι υψηλότερες από εκείνες για το καθαρό ένζυμο. Όπως περιγράφεται στην αναφορά [94], αυτό μπορεί να αποδοθεί στα επίπεδα του AMP τόσο στα πειράματα με καθαρό ένζυμο όσο και στα κυτταρικά, το οποίο ανταγωνίζεται με το Nono4j για τη δέσμευση στο αλλοστερικό κέντρο. Αυτό ωστόσο, μπορεί να μην συμφωνεί με τις προβλέψεις ADME για μέτρια βιοδιαθεσιμότητα, όπου βρέθηκαν μερικές (αλλά μικρές) παραβάσεις των κανόνων, όπου οι περισσότερες τιμές των ιδιοτήτων που αποτυγχάνουν να βρεθούν εντός ορίων των κανόνων, είναι κοντά στα όρια αυτά και σε κάθε περίπτωση εντός του εύρους του 95% των γνωστών φαρμάκων, με την εξαίρεση της PSA του κανόνα Veber που εμφανίζει κάπως υψηλή τιμή και της Caco-2 κυτταρικής διαπερατότητας που είναι εξαιρετικά χαμηλή. Η τιμή της log K_{hsa} είναι επίσης καλή, αλλά η τιμή για τη log BB είναι αρκετά χαμηλότερη κι εκτός του εύρους του 95% των γνωστών φαρμάκων. Έτσι οι προβλέψεις ADME θα μπορούσαν να

εξηγήσουν ή να σχετίζονται με το λόγο για τον οποίο οι σταθερές αναστολής στο κύτταρο είναι υψηλότερες από ό, τι στο ένζυμο.

Η ένωση FR258900 [95, 110], αναστέλλει την HLGPa και αποδείχθηκε αποτελεσματική στη μείωση των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα σε ζωικά μοντέλα με διαβήτη [111]. Ο προσδέτης δεν έχει καμιά δομική ομοιότητα με φυσιολογικούς τροποποιητές της GP (AMP ή Glc-6-P), δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις του με το ένζυμο κυριαρχούνται από μη πολικές αλληλεπιδράσεις van der Waals και ιοντικές αλληλεπιδράσεις [7]. Οι προβλέψεις ADME δεν παράγουν απολύτως καμία παραβίαση του κανόνα Lipinski για τον FR258900, μία παραβίαση της Caco-2 κυτταρικής διαπερατότητας για τον κανόνα Jorgensen, με μια πολύ χαμηλή τιμή για την ιδιότητα, καθώς και παραβίαση όλων των ιδιοτήτων του κανόνα Veber, αλλά με τις τιμές λίγο έξω από τα όρια. Ομοίως, η τιμή της log BB είναι αρκετά χαμηλότερη από την περιοχή από 95% των γνωστών φαρμάκων, ενώ η τιμή της log Khsa είναι στο επιθυμητό εύρος.



Εικόνα 7.7: Άλλοι φαρμακευτικοί/ γνωστοί προσδέτες ως αναστολείς του αλλοστερικού κέντρου.

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα των προβλέψεων ADMET για τους προσδέτες στο αλλοστερικό κέντρο όπως αναφέρονται στην εικόνα 7.7

Ligand/ Derivatives	IC50 enzyme (μM)	IC50 cell (μM)	Lipinski's Rule of Five & Violations (V) ^b					Jorgensen's Rule of Three & Violations (V) ^b				Veber's Rules & Violations (V) ^b				log Khsa	log BB	Tox. struct. Warning
			MW (<500)	Num. H-bond donors (≤ 5)	Num. H-bond acceptors (≤ 10)	log P (o/w) ^c (< 5)	V	Caco-2 perm. (>22 nm/s)	log S ^c (>-5.7)	Num. Prim. Metab (< 7)	V	Num. Rot. Bonds (< 10)	PSA (< 140 \AA^2)	Hbond donor/ accept. (≤ 12)	V			
Other (P.Tr) Compounds																		
FR258900***	IC50=2.5 (HLGPa) Ki=0.46 (RMGPb)	-	456.4	4	10	2.22 (2.41)	0	0.15*	-3.75 (-4.20)	4	1	14	209.6*	14	2	-0.496	-4.103*	michael_acceptor, michael_acceptor_cyclic, alkene, phenol
Novo4j*****	0.074 (pig liver GPa)	1.6 (basal); 4.7 (glucagon)	586.5	4	15	2.60 (3.77)	2	0.14*	-4.89 (-6.15)	3	1	10	255.6*	19	2	-0.247	-3.963*	- (not known)
Bayer.compound- W1807	Ki = 0.0016 (RMGPb)	-	407.9	2	7	4.07 (3.10)	0	13.14*	-4.90 (-4.39)	4	1	5	119.5	9	0	0.064	-1.247	aryl_halide_X
Range 95% Known Drugs^d	-	-	130 – 725	0-6	2-20	-2.0 to 6.5	-	< 25 poor; >500 good	-6.5 to 0.5	1-8	-	0-15	7-200	-	-	-1.5 to 1.5	-3.0 to 1.2	-

^a Τα δεδομένα ADME υπολογίζονται όπως περιγράφεται στο κείμενο χρησιμοποιώντας το QikProp, οι προειδοποιήσεις τοξικότητας λόγω δομής υπολογίζονται με το FAF-DRUGS2. Η "PSA" αντιπροσωπεύει το εμβαδόν της επιφάνειας (\AA^2) van der Waals πολικών N και O ατόμων. "Log BB" ο προβλεπόμενος συντελεστής αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, "LogKhsa" η προβλεπόμενη σύνδεση στην αλβουμίνη ανθρώπινου ορού. ^b Τυχόν παραβιάσεις των κανόνων τονίζονται με πλάγιους χαρακτήρες, ενώ οι προβλεπόμενες ιδιότητες εκτός του εύρους για το 95% των γνωστών φαρμάκων επισημαίνονται με αστερίσκο (*). Στην περίπτωση των κανόνων Veber: (1) ο αριθμός των δεσμών με δυνατότητα περιστροφής <10 και (2) η PSA <140 \AA^2 , ή το άθροισμα δωτών και δεκτών δεσμών υδρογόνου (sum of H-bond donors/acceptors) <12 είναι προαπαιτούμενο. ^c Τιμές που υπολογίζονται με το ALOGPS δίνονται σε παρένθεση (μια συναινετική τιμή - consensus value- στην περίπτωση του log P (οκτανόλη / νερό)). ^d Παραπομπή (QikProp version 3.3 User Manual)

Προειδοποιήσεις Τοξικότητας λόγω δομής: Ο Nono4j απέτυχε με το πρόγραμμα FAFDugs2, αλλά περιέχει πολλές από τις ομάδες που συζητήθηκαν προηγουμένως με προειδοποιήσεις τοξικότητας. Ιδίως, νίτρο (άζωτο) και δραστικές καρβονυλομάδες. Σε κάθε περίπτωση, οι ιδιότητες ADME του ήταν μάλλον φτωχές, σε αντίθεση με τις πειραματικές σταθερές αναστολής και την ισχύ του. Η ένωση Bayer W1807 έχει μια προειδοποίηση "aryl_halide_X" (βλ. ενότητα 7.2.1 ακολουθίες) επειδή η τελική φαινυλομάδα της έχει έναν υποκαταστάτη χλωρίου. Σε γενικές γραμμές, η φωτοτοξικότητα στα μόρια φαίνεται να συνδέεται με δεσμούς αρυλαλογονιδίων που διασπώνται προς σχηματισμό ριζών, ή με ασυνήθιστα συζευγμένα συστήματα όπου η διεγερμένη κατάσταση τριπλέτας μπορεί να λάβει μέρος σε αντιδράσεις αποικοδόμησης ή αλκυλίωσης. Η φωτοτοξικότητα καλύπτει πολλές τοξικές καταστάσεις που προκαλούνται από φάρμακα και UV (υπεριώδη) / ορατή ακτινοβολία. Αυτός ο τομέας έχει εξεταστεί από τους Moore και Quintaro [112, 113]. Οι έλεγχοι φωτοτοξικότητας αποτελούν πλέον απαίτηση όλων των ρυθμιστικών οδηγιών [114, 115]. Περαιτέρω αξιολόγηση της φωτο-ασφάλειας συνιστάται για μόρια τα οποία απορροφούν την ενέργεια του φωτός στην ορατή και υπεριώδη περιοχή του φάσματος (290-700 nm) και μπορεί να είναι ασταθή. Η Pfizer έδειξε [116] ότι πολλές φωτοτοξικές ενώσεις ήταν επίσης φωτο-ασταθείς αλλά δεν αποδείχτηκε κάποια άμεση συσχέτιση. Παρατήρησαν επίσης ότι μόρια με γραμμομοριακό συντελεστή απόσβεσης (MEC) μεγαλύτερο από 1000 l/molcm στο υπεριώδες και ορατό φάσμα ήταν πιο πιθανό να είναι τοξικά. Οι φωτο-δοκιμασίες (Phototesting) *in vitro* είναι πλέον κοινός τόπος με την χρήση της 3T3 ουδέτερης ερυθρής δοκιμής φωτοτοξικότητας (3T3 neutral red phototoxicity test) [117]. Ο FR258900 έχει προειδοποιήσεις "Michael_acceptor", "Michael_acceptor_cyclic», «αλκένιο» και «φαινόλη». Αυτές οι προειδοποιήσεις έχουν επίσης συζητηθεί πιο πριν.

7.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι προσδέτες του αλλοστερικού κέντρου περιλαμβάνουν μια ποικιλία ενώσεων με διάφορες δομές, ποικίλης ανασταλτικής ισχύος και τιμές ιδιοτήτων ADME, κυρίως λόγω της ευελιξίας της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης GP στην περιοχή του αλλοστερικού κέντρου. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς τους προσδέτες (με την εξαίρεση της ενώσεως Bayer W1807) είναι τα παράγωγα φθαλικού οξέος της ομάδας

Η αφού εμφανίζουν αναστολή σε χαμηλά επίπεδα nM στο ένζυμο μαζί με ως επί το πλείστον καλές προβλέψεις ιδιοτήτων ADME. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν σχεδιαστεί ειδικά μέσω παρατήρησης της συμπεριφοράς και δραστηριότητας των φθαλικών παραγώγων της ομάδας I, έτσι ώστε να αποδώσουν καλύτερα [7]. Μερικοί από τους προσδέτες της τελευταίας αυτής ομάδας (ομάδα I φθαλικών οξέων) δίνουν μέτρια έως καλά αποτελέσματα για τις ιδιότητες ADME, καθώς και πολύ καλές τιμές IC₅₀. Ωστόσο, η "νιτρο" δομική προειδοποίηση πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη. Παρ'όλα αυτά, μιλώνοντας από την πλευρά των προβλέψεων ADME, μερικές ακυλο-ουρίες και διοξυ-διυδροπυριδίνες έχουν τις καλύτερες τιμές ιδιοτήτων, με μόνο μία ή καμία παραβίαση των κανόνων, καλές τιμές για τις σταθερές αναστολής, και θα ήταν οι πιο αποτελεσματικοί προσδέτες αν δεν είχαν ορισμένες προειδοποιήσεις λόγω δομής οι οποίες είναι σοβαρές. Ευτυχώς οι προειδοποιήσεις αρυλαλογονιδίων και ουρίας για τις ακυλο-ουρίες οδηγούν σε χαμηλή τοξικότητα, εκτός από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες. Δεν μπορούμε να πούμε το ίδιο όμως για την προειδοποίηση αποδέκτη michael (michael acceptor) που σχετίζεται με τις διοξυ-διυδροπυριδίνες. Τα πεντακυκλικά τριτερπένια είναι πιθανώς λιγότερο ισχυροί προσδέτες, μικρομοριακοί αναστολείς, με μέτρια αποτελέσματα προβλέψεων ADME. Έχουν δε μελετηθεί λεπτομερώς, αλλά μπορεί να υποστούν περαιτέρω βελτιστοποίηση. Ο μικρός αριθμός των δομικών προειδοποιήσεών τους πάντως, συμβάλλει σίγουρα προς αυτή την κατεύθυνση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Nikos G. Oikonomakos. Glycogen Phosphorylase as a Molecular Target for Type 2 Diabetes Therapy. *Current Protein and Peptide Science*, 2002, 3 (6), 561-586.
- [2] <http://www.who.int/diabetes/actionnow/en/mapdiabprev.pdf>
- [3] DeFronzo R.A. *Ann. Intern. Med.*, 1999, 37, 667-687.
- [4] Zhang B.B. and Moller D.E. New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr. Opin. Chem., Biol.* 4, 461-467.
- [5] Moller D.E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, 2001, 414, 821-827.
- [6] J.M. Hayes and D.D. Leonidas. Computation as a Tool for Glycogen Phosphorylase Inhibitor Design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2010, 10 (12), 1156-1174
- [7] Somsak, L.; Czifrak, K.; Toth, M.; Bokor, E.; Chrysin, E.D.; Alexacou, K.M.; Hayes, J.M.; Tiraidis, C.; Lazoura, E.; Leonidas, D.D.; Zographos, S.E.; Oikonomakos, N.G. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr. Med. Chem.*, 2008, 15, 2933-2983.
- [8] Oikonomakos, N. G.; Skamnaki, V. T.; Tsitsanou, K. E.; Gavalas, N. G.; Johnson, L. N. A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions. *Structure*, 2000, 8, 575-84.
- [9] Oikonomakos, N. G.; Zographos, S. E.; Skamnaki, V. T.; Archontis, G. The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 1313-1319.
- [10] Liu, G. X.; Zhang, Z. S.; Luo, X. M.; Shen, J. H.; Liu, H.; Shen, X.; Chen, K. X.; Jiang, H. L. Inhibitory mode of indole-2-carboxamide derivatives against HLGPa: molecular docking and 3D-QSAR analyses. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, 12, 4147-4157.
- [11] Oikonomakos N.G; Somsák L. Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 2008 Apr, 9 (4), 379-395.

- [12] Praly JP; Vidal S. Inhibition of glycogen phosphorylase in the context of type 2 diabetes, with focus on recent inhibitors bound at the active site. *Mini Rev. Med. Chem.* 2010 Oct 1, 10 (12), 1102-1126.
- [13] Loughlin WA. Recent advances in the allosteric inhibition of glycogen phosphorylase. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2010, 10 (12), 1139-1155.
- [14] Zibrova, D.; Grempler, R.; Streicher, R.; Kauschke, S.G. Inhibition of the interaction between protein phosphatase 1 glycogen-targeting subunit and glycogen phosphorylase increases glycogen synthesis in primary rat hepatocytes. *Biochem. J.*, 2008, 412, 359-366.
- [15] L. Agius. Physiological Control of Liver Glycogen Metabolism: Lessons from Novel Glycogen Phosphorylase Inhibitors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2010, 10, 1175-1187
- [16] Board M. N-Acetyl-beta-D-glucopyranosylamine 6-phosphate is a specific inhibitor of glycogen-bound protein phosphatase 1. *Biochem. J.* 1997, 328, 695-700.
- [17] Lorraine Agius. New hepatic targets for glycaemic control in diabetes. *Best Practice & Research, Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 21, No. 4, pp. 587–605, 2007 doi:10.1016/j.beem.2007.09.001; available online at <http://www.sciencedirect.com>
- [18] Li, A. P. Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2001, 6, 357-366.
- [19] Lin, J.; Sahakian, D. C.; de Morais, S. M. F.; Xu, J. H.; Polzer, R. J.; Winter, S. M. The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Curr. Topics Med. Chem.*, 2003, 3, 1125-1154
- [20] Yu, H. S.; Adedoyin, A. ADME-Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. *Drug Discovery Today*, 2003, 8, 852-861.
- [21] Ismael Zamora; Tudor Oprea; Gabriele Cruciani; Manuel Pastor; Anna-Lena Ungell. Surface Descriptors for Protein-Ligand Affinity Prediction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, Vol. 46, No. 1, 25-33.

- [22] Thomson, S. A.; Banker, P.; Bickett, D. M.; Boucheron, J. A.; Carter, H. L.; Clancy, D. C.; Cooper, J. P.; Dickerson, S. H.; Garrido, D. M.; Nolte, R. T.; Peat, A. J.; Sheckler, L. R.; Sparks, S. M.; Tavares, F. X.; Wang, L.; Wang, T. Y.; Weiel, J. E. Anthranilimide based glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. Part 3: X-ray crystallographic characterization, core and urea optimization and *in vivo* efficacy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, 19, 1177-1182.
- [23] Evans, K. A.; Li, Y. H.; Coppo, F. T.; Graybill, T. L.; Cichy- Knight, M.; Patel, M.; Gale, J.; Li, H.; Thrall, S. H.; Tew, D.; Tavares, F.; Thomson, S. A.; Weiel, J. E.; Boucheron, J. A.; Clancy, D. C.; Epperly, A. H.; Golden, P. L. Amino acid anthranilamide derivatives as a new class of glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18, 4068-4071.
- [24] Sparks, S. M.; Banker, P.; Bickett, D. M.; Carter, H. L.; Clancy, D.C.; Dickerson, S. H.; Dwornik, K. A.; Garrido, D. M.; Golden, P. L.; Nolte, R. T.; Peat, A. J.; Sheckler, L. R.; Tavares, F. X.; Thomson, S. A.; Wang, L.; Weiel, J. E. Anthranilimide-based glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: 1. Identification of 1-amino-1-cycloalkyl carboxylic acid headgroups. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, 19, 976-980.
- [25] Sparks, S. M.; Banker, P.; Bickett, D. M.; Clancy, D. C.; Dickerson, S. H.; Garrido, D. M.; Golden, P. L.; Peat, A. J.; Sheckler, L. R.; Tavares, F. X.; Thomson, S. A.; Weiel, J. E. Anthranilimide-based glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of Type 2 diabetes: 2. Optimization of serine and threonine ether amino acid residues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, 19, 981-985.
- [26] Onda, K.; Shiraki, R.; Ogiyama, T.; Yokoyama, K.; Momose, K.; Katayama, N.; Orita, M.; Yamaguchi, T.; Furutani, M.; Hamada, N.; Takeuchi, M.; Okada, M.; Ohta, M.; Tsukamoto, S. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-bicyclo-5-chloro-1H-indole-2-carboxamide derivatives as potent glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 10001-10012.

- [27] Park, B. K.; Kitteringham, N. R. Effects of fluorine substitution on drug metabolism: pharmacological and toxicological implications. *Drug Metab. Rev.*, 1994, 26, 605-643.
- [28] Onda, K.; Suzuki, T.; Shiraki, R.; Yonetoku, Y.; Negoro, K.; Momose, K.; Katayama, N.; Orita, M.; Yamaguchi, T.; Ohta, M.; Tsukamoto, S. Synthesis of 5-chloro-N-aryl-1H-indole-2-carboxamide derivatives as inhibitors of human liver glycogen phosphorylase a. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16, 5452-5464.
- [29] Birch, A. M.; Kenny, P. W.; Oikonomakos, N. G.; Otterbein, L.; Schofield, P.; Whittamore, P. R.; Whalley, D. P. Development of potent, orally active 1-substituted-3,4-dihydro-2-quinolone glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, 17, 394-399.
- [30] Hampson, L. J.; Arden, C.; Agius, L.; Ganotidis, M.; Kosmopoulou, M. N.; Tiraidis, C.; Elemen, Y.; Sakarellos, C.; Leonidas, D. D.; Oikonomakos, N. G. Bioactivity of glycogen phosphorylase inhibitors that bind to the purine nucleoside site. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, 14, 7835-7845.
- [31] Beresford, A. P.; Segall, M.; Tarbit, M. H. In silico prediction of ADME properties: are we making progress? *Curr. Opin. Drug Discovery Devel.*, 2004, 7, 36-42.
- [32] Gola, J.; Obrezanova, O.; Champness, E.; Segall, M. ADMET property prediction: the state of the art and current challenges. *QSAR Comb. Sci.*, 2006, 25, 1172-1180.
- [33] Norinder, U.; Bergstrom, C. A. S. Prediction of ADMET properties. *Chem. Med. Chem.*, 2006, 1, 920-937.
- [34] Lagorce, D.; Sperandio, O.; Galons, H.; Miteva, M. A.; Villoutreix, B. O. FAF-Drugs2: free ADME/tox filtering tool to assist drug discovery and chemical biology projects. *BMC Bioinform.*, 2008, 9, 396. This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/396>.
- [35] Villoutreix, B. O.; Renault, N.; Lagorce, D.; Sperandio, O.; Montes, M.; Miteva, M. A. Free resources to assist structure-based virtual ligand screening experiments. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2007, 8, 381-411.

- [36] Mohan, C. G.; Gandhi, T.; Garg, D.; Shinde, R. Computer-assisted methods in chemical toxicity prediction. *Mini Rev. Med. Chem.* 2007, 7, 499-507.
- [37] Schrodinger Software Suite, Schrodinger, LLC, New York, NY.
- [38] QikProp 3.3 User Manual, QikProp User Manual Copyright © 2010 Schrödinger, LLC.
- [39] Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2000, 44, 235-249.
- [40] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1997, 23, 3-25.
- [41] Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 2615-2623.
- [42] Hewitt, M.; Cronin, M. T. D.; Enoch, S. J.; Madden, J. C.; Roberts, D. W.; Dearden, J. C. In Silico Prediction of Aqueous Solubility: The Solubility Challenge. *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, 49, 2572-2587.
- [43] Mannhold, R.; Poda, G. I.; Ostermann, C.; Tetko, I. V. Calculation of molecular lipophilicity: State-of-the-art and comparison of log P methods on more than 96,000 compounds. *J. Pharm. Sci.*, 2009, 98, 861-893.
- [44] T. Kennedy. Managing the drug discovery/ development interface. *Drug Discovery Today*, 1997, 2, 436-444.
- [45] D. E. Clark; P. D. Grootenhuis. Progress in computational methods for the prediction of ADMET properties. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* 2002, 5, 382-390.
- [46] S. Modi. Computational approaches to the understanding of ADMET properties and problems. *Drug Discovery Today* 2003, 8, 621-623.
- [47] H. Van de Waterbeemd; E. Gifford. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise ?. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2003, 2, 192-204.

- [48] I. Kola; J. Landis. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates ?. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2004, 3, 711-716.
- [49] P. Artursson; J. Karlsson. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 175, 880-885.
- [50] P. Artursson; R. T. Borchardt. Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures : Caco-2 and beyond. *Pharm. Res.* 1997, 14, 1655-1658.
- [51] U. Norinder; K. Luthman; P. Artursson. Molecular descriptors influencing melting point and their role in classification of solid drugs. C. A. S. Bergstrom. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003, 43, 1177-1185.
- [52] T. W. Schultz; M. T. D. Cronin; J. D. Walker; A. O. Aptula. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) in toxicology: a historical perspective. *J. Mol. Struct.* 2003, 622, 1-22.
- [53] T. W. Schultz; M. T. D. Cronin. Pitfalls in QSAR. *J. Mol. Struct.* 2003, 622, 39-51.
- [54] M. Kansy; F. Senner; K. Gubernator. Physicochemical high-throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 1007 – 1010.
- [55] Jorgensen W. L. and Duffy E. M. Prediction of Drug Solubility from Monte Carlo Simulations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 1155-1158.
- [56] Leukothea Ioakimidis; Loizos Thoukydidis; Amin Mirza; Saira Naeem; Johannes Reynisson. Benchmarking the Reliability of QikProp. Correlation between Experimental and Predicted Values. *QSAR & Combinational Science*, 2007.
- [57] VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory,
<http://www.vcclab.org>, 2005.
- [58] Tetko, I. V.; Gasteiger, J.; Todeschini, R.; Mauri, A.; Livingstone, D.; Ertl, P.; Palyulin, V. A.; Radchenko, E. V.; Zefirov, N. S.; Makarenko, A. S.;

- Tanchuk, V. Y.; Prokopenko, V. V. Virtual computational chemistry laboratory - design and description, *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, 2005, 19, 453-63, article.
- [59] Viswanadhan, V.N.; Ghose, A.K.; Revankar, G.R. & Robins, R.K. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1989, 29, 163-172.
- [60] Moriguchi, I.; Hirono, S.; Liu, Q.; Nakagome, I. & Matsushita, Y. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient, *Chem. Pharm. Bull.*, 1992, 40, 127-130.
- [61] Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2002, 42, 1136-45, article.
- [62] Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y.; Villa, A. E. Prediction of n-octanol/water partition coefficients from PHYSPROP database using artificial neural networks and E-state indices, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2001, 41, 1407-21, article.
- [63] Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y.; Kasheva, T. N.; Villa, A. E. Estimation of aqueous solubility of chemical compounds using E-state indices, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2001, 41, 1488-93, article.
- [64] Tetko, I. V.; Poda, G. I. Application of ALOGPS 2.1 to predict log D distribution coefficient for Pfizer proprietary compounds, *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 5601-4, article.
- [65] Tetko, I. V.; Bruneau, P. Application of ALOGPS to predict 1-octanol/water distribution coefficients, logP, and logD, of AstraZeneca in-house database, *J. Pharm. Sci.*, 2004, 93, 3103-10, article.
- [66] Wendy. A. Loughlin; Gregory K. Pierens; Luke C. Henderson; Maria J.Petersson; Peter C. Healy. Evaluation of novel Hyphodermin derivatives as

- Glycogen Phosphorylase a inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, *16*, 6172–6178.
- [67] Xiaoran Wen; Hongbin Sun; Jun Liu; Keguang Cheng; Pu Zhang; Liying Zhang; Jia Hao; Luyong Zhang; Peizhou Ni; Spyros E. Zographos; Demetres D. Leonidas; Kyra-Melinda Alexacou; Thanasis Gimisis; Joseph M. Hayes; Nikos G. Oikonomakos. Naturally Occurring Pentacyclic Triterpenes as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: Synthesis, Structure-Activity Relationships, and X-ray Crystallographic Studies, *J. Med. Chem.* 2008, *51* (12), 3540-3554.
- [68] Evangelia D. Chrysina. The prototype of glycogen phosphorylase. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2010, *10*(12), 1093-101.
- [69] Chrysina, E.D.; Bokor, E.; Alexacou, K-M.; Charavgi, M-D.; Oikonomakos, N.G.; Zographos, S.E.; Leonidas, D.D.; Oikonomakos, N.G.; Somsak, L. Amide-1,2,3-triazole bioisosterism: the glycogen phosphorylase case, *Tetrahedron Asymm.*, 2009, *20*, 733-740.
- [70] Veronika Nagy; Mahmoud Benlifa; Sebastien Vidal; Eszter Berzsenyi; Cathie Teilhet; Katalin Czifrak; Gyula Batta; Tibor Docsa; Pal Gergely; Laszlo Somsak; Jean-Pierre Praly. Glucose-based spiro-heterocycles as potent inhibitors of glycogen phosphorylase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, *17*, 5696–5707
- [71] Mahmoud Benlifa; Joseph M. Hayes; Sebastien Vidal; David Gueyrard; Peter G. Goekjian; Jean-Pierre Praly; Gregory Kizilis; Costas Tiraidis; Kyra-Melinda Alexacou; Evangelia D. Chrysina; Spyros E. Zographos; Demetres D. Leonidas; Georgios Archontis; Nikos G. Oikonomakos. Glucose-based spiro-isoxazolines: A new family of potent glycogen phosphorylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, *17*, 7368-7380
- [72] Vicky G. Tsirkone; Evangelia Tsoukala; Christos Lamprakis; Stella Manta; Joseph M. Hayes; Vicky T. Skamnaki; Christina Drakou; Spyros E. Zographos; Dimitri Komiotis; Demetres D. Leonidas. 1-(3-Deoxy-3-fluoro- β -D-glucopyranosyl) pyrimidine derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase b: Kinetic, crystallographic and modelling studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, *18*, 3413-3425

- [73] LigPrep manual version 2.1
- [74] G. Chang; W.C. Guida; W.C. Still. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, *111*, 4379-4386.
- [75] W.C. Still; A. Tempczyk; R.C. Hawley; T. Hendrickson. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, *112*, 6127-6129.
- [76] W.L. Jorgensen; D.S. Maxwell; J. Tirado-Rives. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, *118*, 11225-11236.
- [77] G.A. Kaminski; R.A. Friesner; J. Tirado-Rives; W.L. Jorgensen. *J. Phys. Chem.*, 2001, *B105*, 6474-6487.
- [78] Igor V. Tetko; Gennadiy I. Poda; Claude Ostermann; Raimund Mannhold. Large-Scale Evaluation of log P Predictors: Local Corrections May Compensate Insufficient Accuracy and Need of Experimentally Testing Every Other Compound. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 2009, *Vol. 6*.
- [79] http://en.wikipedia.org/wiki/Lipinski's_Rule_of_Five
- [80] W. L. Jorgensen; E.M. Duffy. Prediction of drug solubility from structure, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2002, *54*, 355-366.
- [81] P. Artursson; K. Palm; K. Luthman. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug. Deliv.*, 2001, *46*, 27-43.
- [82] K. Palm; K. Luthman; A.L. Ungell; G. Strandlund; P. Artursson. Correlation of drug absorption with molecular surface properties, *J. Pharm. Sci.*, 1996, *85*, 32-39.
- [83] K. Palm, P. Stenberg; K. Luthman; P. Artursson. *Pharm. Res.*, 1997, *14*, 568-571.
- [84] J.J. Lu; K. Crimin; J.T. Goodwin; P. Crivori; C. Orrenius; L. Xing; P.J. Tandler; T.J. Vidmar; B.M. Amore; A.G.E. Wilson; P.F.W. Stouten; P.S. Burton. *J. Med. Chem.*, 2004, *47*, 6104-6107.
- [85] Wang FI; Kuo ML; Shun CT; Ma YC; Wang JD; Ueng TH. Chronic toxicity of a mixture of chlorinated alkanes and alkenes in ICR mice. *J Toxicol Environ Health A.*, 2002 Feb, *65(3-4)*, 279-91.

- [86] Zhang, L.; Li, H.; Zhu, Q.; Liu, J.; Chen, L.; Leng, Y.; Jiang, H.; Liu, H. Benzamide derivatives as dual-action hypoglycemic agents that inhibit glycogen phosphorylase and activate glucokinase. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, *17*, 7301-7312.
- [87] Graham F. Smith. Designing Drugs to Avoid Toxicity. *Progress in Medicinal Chemistry*, 2011, *50*, 1-47.
- [88] E.Graciela Toranzo; T. Gillesse; M. Mendenhall; G.J. Traiger; P.G. Riley; R.P. Hanzlik; R.A. Wiley. Effect of substituents on arene oxide-mediated liver toxicity among substituted bromobenzenes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1977, *40* (3), 415-425.
- [89] Bray, H.G.; Carpanini, M.B. and Waters, B.D. The metabolism of thiophen in the rabbit and the rat. *Xenobiotica*, 1971, *1* (2), 157-168.
- [90] Fontana, E.; Dansette, P.M. and Poli, S.M. Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity. *Curr. Drug Metab*, 2005, *6*, 413-454.
- [91] DePierre, J.W. Mamalian Toxicity of Organic Compounds of Bromine and Iodine. *Handbook of Environmental Chemistry*, 2003, *3* (Pt. R) , 205-251, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, doi: 10.1007/b11992.
- [92] Bialer Meir; Yagen Boris; Shimshoni Jacob Avi. ACYL-UREA DERIVATIVES AND USES THEREOF. Patent Publication number EP2185505 A2 (text from WO2009001356A2), filed Jun 25, 2008 and published May 19, 2010.
- [93] Laszczyk MN. Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy. *Planta Medica*, 2009, *75* (15), 1549–60.
- [94] Kristiansen, M.; Andersen, B.; Iversen, L. F.; Westergaard, N. Identification, synthesis, and characterization of new glycogen phosphorylase inhibitors binding to the allosteric AMP site. *J. Med. Chem.*, 2004, *47*, 3537-3545.
- [95] Tiraidis, C.; Alexacou, K.M.; Zographos, S.E.; Leonidas, D.D.; Gimisis, T.; Oikonomakos, N.G.. FR258900, a potential anti-hyperglycemic drug, binds at the allosteric site of glycogen phosphorylase. *Protein Sci.*, 2007, *16*, 1773-1782.

- [96] <http://en.wikipedia.org/wiki/Urea>
- [97] Tilles, SA. Practical issues in the management of hypersensitivity reactions: sulfonamides. *Southern Medical Journal*, 2001 August, 94 (8), 817–824
- [98] CG Slatore; Tilles, SA. Sulfonamide hypersensitivity. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 2004 August, 24 (3), 477–90,vii
- [99] *Harrison's Principles of Internal Medicine, 13th Ed.*. McGraw-Hill Inc.. 1994. pp. 604
- [100] Porohit, V.; Basu, A.. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000 August, 13, 673–692.
- [101] Uetrecht, J. N-oxidation of drugs associated with idiosyncratic drug reactions. *Drug Metab. Rev.* 2002 August, 34 (3), 651–665.
- [102] Scheline, R.R.. Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacol. Rev.*, 1973 Dec, 25, 451–523.
- [103] Ascheri, M., Eyer, P. and Kampffmeyer, H. Formation and disposition of nitrosochloramphenicol in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 1985 October, 34 (20), 3755–3763.
- [104] Yunis, A.A.. Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1988, 28, 83–100.
- [105] Hill, R.N., Erdreich, L.S., Paynter, O.E., Roberts, P.A., Rosenthal, S.L. and Wilkinson, C.F. Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fund. Appl. Toxicol.*, 1989 May, 12, 629–697.
- [106] Capen, C.C. Mechanistic data and risk assessment of selected toxic end points of the thyroid gland. *Toxicol. Pathol.*, 1997 Feb, 25, 39–48.
- [107] McClain, R.M.. Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutat. Res.*, 1995 Dec, 333, 131–142.
- [108] Burgi, H.; Wimpfheimer, C.; Burger, A.; Zaunbauer, W.; Rosler, H.; Lemarchand-Beraud, T.. Changes of circulating thyroxine, triiodothyronine and reverse triiodothyronine after radiographic contrast agents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1976 Dec, 43(6), 1203–1210.

- [109] Wen, X.; Sun, H.; Liu, J.; Wu, G.; Zhang, L.; Wu, X.; Ni, P.. Pentacyclic triterpenes. Part 1: the first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005 Nov, *15*, 4944-4948.
- [110] Furukawa, S.; Tsurumi, Y.; Murakami, K.; Nakanishi, T.; Ohsumi K.; Hashimoto, M.; Nishikawa, M.; Takase, S.; Nakayama, O.; Hino, M.. FR258900, a novel glycogen phosphorylase inhibitor isolated from Fungus No. 138354. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.*, 2005, *58*, 497-502.
- [111] Furukawa, S.; Murakami, K.; Nishikawa, M.; Nakayama, O.; Hino, M.. FR258900, a novel glycogen phosphorylase inhibitor isolated from Fungus No. 138354. II. Anti-hyperglycemic effects in diabetic animal models. *J. Antibiot.*, 2005, *58*, 503-506.
- [112] Moore, D.E. Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management. *Drug Safety*, 2002, *25*, 345–372.
- [113] Quintaro, B. and Miranda, M.A. Mechanisms of photosensitization induced by drugs: A general survey. *Ars Pharmaceut.*, 2000, *41*, 27–46.
- [114] FDA, CDER. (2003) *Guidance for Industry: Photosafety Testing*. May 2003.
- [115] OECD Guideline for Testing Chemicals. In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Draft Document, February 2002.
- [116] Henry, B.; Foti, C. and Alsante, K. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? *J. Photochem. Photobiol.*, 2009, *96*,57–62.
- [117] Jones, P.A. and King, A.V. High throughput screening (HTS) for phototoxicity hazard using the in vitro 3T3 neutral red uptake assay. *Toxicol. In Vitro*, 2003, *17*, 703–708.