



UNIVERSITATEA BABEŞ-BOLYAI

FACULTATEA DE CHIMIE ŞI INGINERIE CHIMICĂ
DEPARTAMENTUL DE CHIMIE ORGANICĂ

TOPOLOGIA BIOACTIVITĂŢII - REZUMAT

Îndrumător Ştiinţific

Prof. Dr. MIRCEA V. DIUDEA

Prof. Dr. Csaba Paisz

Doctorand:

Lungu Nicolae Claudiu

Cluj-Napoca

2019

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI

FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ

DEPARTAMENTUL DE CHIMIE ORGANICĂ

TOPOLOGIA BIOACTIVITĂȚII

Îndrumător Științific:

Prof Dr. Csaba Paisz

Prof. Dr. Mircea V. Diudea

Doctorand: Lungu Nicolae Claudiu

Președinte: Prof. Dr. Ioan Grosu

Comisie:

Prof. Dr. Ionel Mangalagiu

Prof. Dr. Mihai V. Putz

Prof. Dr. Simion Simon

Cuvânt înainte

Într-o astfel de încercare există mulți oameni cărora le datorez recunoștință și mulțumiri pentru sprijinul și susținerea lor. Fără toți acești oameni din jurul meu, nu mi-am pot imagina să duc această teză la sfârșit.

Aș dori să mulțumesc mentorului meu, Prof. Dr. Mircea V. Diudea, pentru comentariile detaliate și critica constructivă. Îndrumarea lui m-a ajutat în toată această perioadă dedicată cercetării și scrierii acestei teze.

Totodată aș dori să mulțumesc și comisiei doctorale pentru încurajare, comentarii, informații și întrebări constructive.

Table of Contents

Cuvânt înainte.....	3
Cuvinte cheie.....	9
I.PARTEA TEORETICĂ	10
INTRODUCERE GENERALĂ.....	10
Capitolul I.1.....	11
I.Recunoașterea moleculară.....	12
Capitolul I.2.....	12
Analiza interacțiunilor ligand proteină	12
I. 2.1 Măsurarea EC ₅₀	12
I.2.2 Legarea competitivă și IC ₅₀	13
I.2.3 Echilibru	13
Capitolul I.3.....	14
„QSAR” (Relații structura activitate).....	14
I.3.1 2D-QSAR bazat pe fragmente.....	14
I.3.2 3D-QSAR	14
I.3.3 Metode QSAR multidimensionale	15
I.3.4 Caracteristica selecției receptorilor	15
Capitolul I.4.....	15
Andocarea și plierea proteinelor	15
I.4.1. Andocarea rigidă ligand și receptor	15
I.4.2. Andocarea flexibilă ligand și rigidă receptor	16
I.4.3 Andocarea flexibilă ligand și flexibilă receptor	16
I.4.4 Plierea proteinelor.....	17
I.4.5 Structura terțiară a proteinelor	17
I.4.6 Structura quaternară a proteinelor.....	17
I.4.7 Modelarea plierii proteinelor	17

Capitolul I.5.....	18
Descriptori moleculari.....	18
I.5.1. Definiții de bază în grafuri	18
I.5.2. Matrice topologice pătrate și indici	18
I.5.2.1. Matricea adiacenței.....	18
I.5.2.2. Matricea distanței.....	18
I. 5.2.3. Matricea deturului	19
I.5.2.4. Matricea Cluj.....	19
I.5.2. 5. Matrice sarcina – „CH“	20
I.5.2.6 Matrice de straturi și coajă	20
I.5.2.7.1 Matrice de straturi	20
I.5.2.7.2 Matrice pentru straturi.....	21
II.Contribuții personale	22
Capitolul II.1	22
Adaptabilitate moleculară a ligandului	22
PEI (polietilenimine) lineare și ramificate și spațiul proprietăților	22
II.1.1 Introducere.....	22
II.1.2 Metode computaționale	22
II.1.3 Rezultate.....	23
II.1.4 Concluzii.....	25
Capitolul II.2	26
Adaptabilitatea moleculară a receptorului.....	26
Adaptabilitatea moleculară a flavin adenin dinucleotidul (FAD) în rândul aminoacizilor adiacenți și rolul său catalitic în GOx (gluco oxidază)	26
II.2.1 Introducere.....	26
II.2.3 Metode computaționale	27
II.2.3 Rezultate.....	27
II.2.4 Concluzii.....	29

Capitolul II.3	29
Prezicerea potenței	29
Potența și predicția situsului de legare a teixobactinei și a altor liganzi ai Lipidului II prin scorurile de bază statistice ale hărților spațiale conformaționale.	29
II.3.1 Introducere.....	29
II.3.2 Metode computaționale	30
II.3.3 Rezultate.....	31
II.3.4 Concluzii.....	31
Capitolul II.4	32
Predicție și reprezentare a suprafeței biologice	32
Modelarea liganzilor în andocarea rigidă a inhibitorilor MraY. Discriminantul polinomial și operatorul Laplacian ca și predictor ai bioactivității	32
II.4.1 Introducere.....	32
II.4.2 Metode computaționale	32
II.4.3 Rezultate.....	33
II.4.4. Concluzii.....	34
Capitolul II. 5	35
Plierea proteinelor și interacțiuni.....	35
Plierea alfa 1 antitripsinei și interacțiunea cu nanomaterialele.....	35
II.5.1 Introducere.....	35
II.5.3 Rezultate.....	36
II.5.4 Concluzii.....	38
Capitolul II.6	39
Explorarea spațiului bioactivității.....	39
II.6.1 Derivați imidazol piridinici: modele QSAR	39
II.6.1.1 Introducere.....	39
II.6.1.3 Metode computaționale	41
II.6.1.4 Rezultate	41

II.6.1.4.1 Rezultate experimentale.....	41
II.6.1.4.3 Modele QSAR	43
II.6.1.5 Concluzii.....	43
II.6.2. Oxabutan benzamidele ca inhibitori ai UDP-3-O-acil-N-acetilglucozamină deacetilazei: un studiu QSAR.....	44
II.6.2.1 Introducere.....	44
II.6.2.2 Metode computaționale	44
II.6.2.3 Rezultate	45
II.6.2.4 Concluzii.....	46
II.6.3 Famotidina ca inhibitor de urokinază: un studiu QSAR	47
II.6.3.1 Introducere.....	47
II.6.3.2 Metode computaționale	47
II.6.3.3 Rezultate	48
II.6.3.4 Concluzii.....	49
II.6.4 Inhibitorii Ciclin dependent kinazei 2: un studiu de regresie neuronală artificială QSAR	50
II.6.4.1 Introducere.....	50
II.6.4.2 Metode computaționale	51
II.6.4.3 Rezultate	51
II.6.4.4 Concluzii.....	52
II.6.5 Inhibitori ai fosfodiesterazei cGMP 3', 5'-ciclic 10A: un studiu QSAR.	52
II.6.5.1 Introducere.....	52
II.6.5.2 Metode computaționale	52
II.6.5.3 Rezultate	53
II.6.5.4 Concluzii.....	54
II.6.6 Explorarea bioactivității - spațiul toxicității.....	54
Un studiu teoretic de toxicitate asupra unor macromolecule biologice “prietenose”	54
II.6.6.1 Introducere.....	54
II.6.6.2 Metode computaționale	55

II.6.6.3 Rezultate	56
II.6.6.4 Concluzii	57
II.6.7 Explorarea spațiului de bioactivitate - activitate antimicrobiană	58
Proteina de legare a penicilinei în mecanismul de rezistență la Staphilococcus aureus	58
II.6.7.1 Introducere	58
II.6.7.2 Metode experimentale	58
II.6.7.3 Metode computaționale	59
II.6.7.3 Rezultate	60
II.6.7.4 Concluzii	62
Concluzii generale	62
Lista de publicații	65
Referințe	67

Cuvinte cheie

Andocare

Bioactivitate

Cofactor

Corelația Pearson

Descriptorii chimici

Dinamică moleculară

Dinamică moleculară scăzută

Energie conformațională

Farmacofor

Ligand

Lipid II

Modelarea omologilor

MraY

Nanostructură

Receptor

Recunoaștere moleculară

Regresie liniară multiplă

Relația structură activitate

Relația structură -proprietate

Rețele neuronale

Spațiul topologic

Spațiul chimic

Toxicitate

Varietate (topologică)

I.PARTEA TEORETICĂ

INTRODUCERE GENERALĂ

Bioactivitatea sau activitatea biologică subliniază proprietatea unui stimul (radiație, moleculă, biomolecule, medicament) de a declanșa un răspuns biologic în materia vie. În farmacologie, această activitate este determinată de farmacoforul moleculelor de ligand, a cărui constituție și formă reprezintă natura interacțiunilor dintre molecula de ligand și țintă (respectiv receptorul).

Spațiul topologic este definit ca un set de puncte / atomi cu vecinătatea corespunzătoare pentru fiecare punct, a cărui existență axiomatică este acceptată (Stadler și Stadler 2002). Toate variabilele biologice, care reflectă, fie prezența discretă, fie prezența continuă sau interacțiunea entităților biologice - pot fi reprezentate și măsurate în spațiul euclidian (Fagerland et al., 2011) Spațiile topologice pot fi descrise până la homeomorfism prin proprietățile lor topologice. Acestea sunt invariabile sub homeomorfism. Un spațiu topologic, care este la nivel local euclidian, se numește o varietate. Ca spațiu euclidian, o varietate poate avea n-dimensiuni (Körner 2015). Spațiile varietăților pot fi ponderate pentru a "transporta" anumite proprietăți, precum bioactivitatea. Astfel, o variabilă care descrie bioactivitatea poate fi reprezentată utilizând varietăți (spații topologice).

Bioactivitatea farmacologică este rezultatul biodinamicii și biocineticii unui anumit medicament; aceste activități pot fi considerate a fi spațiul medicamentos. Spațiul medicamentos este o regiune specială, o componentă a spațiului chimic. Spațiul chimic este o conceptualizare în chiminformatică, care se referă la spațiu, incluzând toate moleculele posibile și compușii chimici definiți de un set dat de reguli de construcție și de condiții limită. Spațiul chimic teoretic în chiminformatică se referă la spațiul moleculelor potențial farmacologic active, cu un ordin de dimensiune de 10^{60} molecule.

Serviciul Abstract Chimic are în baza sa de date din iulie 2009, 49.037.297 molecule organice și anorganice, număr ce crește în 11 noiembrie 2013 la peste 75 de milioane de structuri citate în jurnale. Explorarea spațiului chimic poate fi efectuată computațional - în „silico” sau experimental - prin reacții chimice. Această explorare a spațiului chimic se realizează prin

utilizarea în baza de date „in silico” a moleculelor virtuale, vizualizate prin proiectarea spațiului proprietății multidimensionale în dimensiunile inferioare, caracterizat prin proprietăți măsurabile/cuantificabile fizico-chimice (Vallianatou et al., 2015).

Deplasarea prin spațiul chimic se realizează prin generarea de combinații stoichiometrice de electroni și nuclee atomice, pentru abordarea tuturor izomerilor topologici posibili necesari aplicării regulilor de construcție. În cheminformatică, astfel de tehnici includ motoare de generare a structurilor, motoare de fragmentare și tehnici mai discrete, cum ar fi tehnici de căutare și analiză conformaționale precum dinamica moleculară, andocare etc. (Carlson și McCammon 1999).

În lumea reală, proprietățile fizico-chimice sunt proiecția proprietăților chimice în spațiul chimic cunoscut. Fiind doar proiecții, aceste caracteristici adesea nu sunt unice (respectiv degenerate), iar molecule diferite pot prezenta proprietăți similare (Raymond și Awale 2012). Design-ul materialelor și descoperirea de molecule cu proprietăți farmacologice implică explorarea spațiului chimic.

I. Recunoașterea moleculară

Recunoașterea moleculară se referă la o interacțiune specifică dintre două molecule, aceasta fiind una noncovalentă (Bolel et al., 2012). Noțiunea de recunoaștere moleculară a fost introdusă de Jean Marie Lehn în 1970. Procesul de recunoaștere este multistrat. Cei doi parteneri, în cazul biologiei, sunt reprezentați de o gazdă sau țintă și oaspetele sau molecula activă reprezentată de medicament. Procesul implică recunoașterea reciprocă, în special, pe baza complementarității (în formă și sarcină locală) necesară creerii unei obligații bazate pe grupuri funcționale.

Recunoașterea este posibilă în orice direcție având șase grade de libertate. Grupurile funcționale naturale, donatorii de hidrogen sau acceptorii de hidrogen sunt importante pentru ca moleculele să se "recunoască" și să interacționeze între ele. Diferitele eliminări ale atomilor funcționali din jurul atomului central vor determina o recunoaștere noncovalentă diferită în spațiu, cu o poziționare geometrică diversă. Pe scurt, bioactivitatea este rezultatul atât a recunoașterii de legare, cât și a recunoașterii moleculare. Recunoașterea moleculară determină o interacțiune ulterioară între gazdă (receptor) și oaspete (ligand).

Capitolul I.2

Analiza interacțiunilor ligand proteină

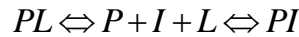
Interacțiunile sunt descrise ca și cazuri unice și complicate precum locurile multiple de legare, de exemplu, alosterii (Liu și Nussinov 2016). Numărul mare de structuri macromoleculare depuse în banca de date a proteinelor (PDB) care descrie "complexe între proteine și compuși endogeni sau medicamente sintetice a făcut posibilă o analiză a interacțiunilor care apar între proteine și liganzii lor. Reziduurile observate cu cea mai mică frecvență în secvențele de proteine, Trp, His, Met, Tyr și Phe, s-au dovedit a fi cele mai abundente în buzunarele de legare. Au fost găsite diferențe semnificative între compușii de tip medicamentos și cei fiziologici

I. 2.1 Măsurarea EC₅₀

Concentrația totală a ligandului la care se leagă jumătate din proteină se numește EC_{50} (concentrație de efect 50%) a reacției. EC_{50} este utilizat pe scară largă pentru a raporta rezultatele testelor deoarece estimarea punctului de mijloc al titrării prin inspecție este simplă. La jumătatea punctului de titrare, când jumătate din proteină este legată de ligand avem următoarea relație $[P] = [PL]$ (Polla 2010).

I.2.2 Legarea competitivă și IC_{50}

În multe situații, este important să se evalueze concurența dintre doi liganzi pentru legarea la o proteină. Dacă unul dintre aceștia este un ligand "de referință" cu un situs de legare cunoscut și dacă titrarea într-un alt ligand "test" diminuează legarea "referinței", înseamnă că ligandul de testare fie se leagă la același situs ca și "referința" sau la un situs alosteric care influențează locul de legare al referinței.



La echilibru, pot fi scrise următoarele:

$$[P] = \frac{K_d[PL]}{[L]} = \frac{K_i[PI]}{[I]}$$

atunci

$$\frac{[PL]}{[PI]} = \frac{K_i[L]}{K_d[I]}$$

Ecuția arată că efectul inhibitorului este proporțional; cu cât afinitatea sau concentrația inhibitorului liber $[I]$ este mai mare, cu atât mai mic este raportul ligandului.

I.2.3 Echilibru

Se ia în considerare o situație în care o cantitate de ligand este adăugată la proteine. Inițial, fiecare moleculă de proteină va fi nelegată ($[P] = [P]_T$), iar întâlnirile dintre ligand și proteină duc frecvent la legare:

$$\frac{d[PL]}{dt} = k_{on}[P][L] - k_{off}[PL] = k_{on}([P]_T - [PL])([L]_T - [PL]) - k_{off}[PL] = k_{on}[P]_T[L]_T - (k_{on}([P]_T + [L]_T) + k_{off})[PL] + k_{on}[PL]^2$$

$$f_b(t) \propto 1 - e^{-(k_{on}([P] + [L]) + k_{off})t}$$

Constanta de timp pentru abordarea echilibrului, $t_{relax} = 1 / (k_{on} ([P] + [L]) + k_{off})$, se dovedește a fi o bună aproximare a valorii reale într-o varietate largă de circumstanțe. Frația legată de proteine va atinge, de obicei, mai mult de 98% din valoarea sa de echilibru în t_{relax} și în practică acest timp depinde în mare măsură de k_{on} și de concentrația totală de proteină și ligand, deoarece k_{off} este relativ mic. Experimentarea designului pentru măsurători de echilibru ar trebui să țină cont de timpul necesar pentru a ajunge acolo. "Pentru o testare tipică de legare proteină-ligand cu proteină 1 pM, ligand 2 pM și K_d de 1 pM timpul pentru echilibru poate varia dramatic cu proprietățile cinetice ale proteinei.

Capitolul I.3

„QSAR” (Relații structura activitate)

Relația cantitativă între structură și activitate poate fi descrisă în cele din urmă ca fiind o teorie care leagă "structura moleculară, prin descriptorii moleculari, cu activitățile biologice relevante pentru a crea modele de regresie sau de clasificare" (Nantasenamat et al., 2009). Prin urmare, importanța sa este incalculabilă, deoarece este capabilă să cunoască sau să prezică această legătură "de la structura moleculară la o anumită activitate biologică care are o valoare enormă în numeroase domenii de cercetare științifică.

I.3.1 2D-QSAR bazat pe fragmente

„Metodele 2D-QSAR permit construirea de modele atunci când obiectele de tip cristal 3D sau structurile receptorilor nu sunt disponibile. Au fost introduse metode îmbunătățite QSAR bazate pe fragmente. Holograma-QSAR (H-QSAR) a fost prima metodă QSAR bazată pe fragmente moleculare introduse de Tripos (Leal et al., 2015) ”.

I.3.2 3D-QSAR

Metodele 3D-QSAR sunt mai complexe. Există două tipuri de metode 3D-QSAR: dependența de aliniere și independența alinierii. Ambele metode necesită conformații bioactive ale liganzilor ca șabloane pentru dezvoltarea modelelor QSAR. CoMFA este una dintre bine-cunoscutele metode 3D-QSAR dezvoltate de Cramer et al. În această metodă "structura 3D a liganzilor este suprapusă, apoi câmpurile sterice și electrostatice sunt generate în jurul fiecărui ligand.

I.3.3 Metode QSAR multidimensionale

Metodele QSAR multidimensionale sunt dezvoltate pentru a aborda dezavantajele metodelor 3D-QSAR prin încorporarea unor descriptori suplimentari(dimensiuni). Hopfinger și colab., "au dezvoltat un model 4D-QSAR prin utilizarea eșantionării conformaționale Boltzmann. Geometria receptorului este esențială pentru dezvoltarea unui model 4D-QSAR ". Acest model a fost dezvoltat folosind programul XMAP

I.3.4 Caracteristica selecției receptorilor

O problemă comună în orice studiu QSAR este de a descrie proprietățile moleculare. Natura descriptorilor utilizați și gradul în care aceștia criptează caracteristicile structurale legate de variabila dependentă, este o parte vitală a unui studiu QSAR.

Capitolul I.4

Andocarea și plierea proteinelor

„Finalizarea proiectului genomului uman a dus la un număr tot mai mare de „ținte” terapeutice noi pentru descoperirea de medicamente. În același timp, s-au dezvoltat tehnici de purificare a proteinelor de înaltă performanță, cristalografie și tehnici de spectroscopie prin rezonanță magnetică nucleară ce au contribuit cu multe detalii structurale ale proteinelor” (Meng et al., 2011). Aceste progrese permit strategiilor computaționale să pătrundă în prezent în toate aspectele descoperirii medicamentului, cum ar fi tehnicile de screening virtual (VS) pentru identificarea “hit-urilor”- și metodele de optimizare moleculară.

I.4.1. Andocarea rigidă ligand și receptor

Atunci când ligandul și receptorul sunt ambele tratate ca și corpuri rigide, spațiul de căutare este foarte limitat, având în vedere că sunt doar trei grade de libertate de translație și trei grade de libertate de rotație. În acest caz, flexibilitatea ligandului ar putea fi abordată prin utilizarea unui set precalculat de configurații de ligand sau prin permiterea unui grad de suprapunere de atom-atom între proteină și ligand. DOCK a fost prima procedură automată de andocare a unei molecule într-un sit receptor și a fost dezvoltată în mod continuu. Aceasta caracterizează ligandul și receptorul ca seturi de sfere care ar putea fi suprapuse prin intermediul unei proceduri de detectare a clicurilor.

FLOG generează conformațiile ligandului pe baza geometriei distanței și utilizează un algoritm de determinare a clicurilor pentru a calcula seturile de distanțe. Până la 25 de conformații explicite ale ligandului ar putea fi folosite pentru a acoperi o anumită flexibilitate. FLOG permite utilizatorilor să definească puncte esențiale care trebuie asociate cu un atom de ligand (Elkoley și Doersksen, 2013). Această abordare este utilă dacă o interacțiune importantă este deja cunoscută înainte de andocare. Conformațiile sunt marcate cu o funcție având în vedere interacțiunile van der Waals, electrostatice, legături de hidrogen și interacțiuni hidrofobe.

I.4.2. Andocarea flexibilă ligand și rigidă receptor

Pentru sistemele al căror comportament urmărește paradigma de potrivire indusă, este de importanță vitală să se ia în considerare flexibilitatea ligandului și a receptorului, deoarece în acest caz atât ligandul, cât și receptorul își schimbă conformațiile pentru a forma un complex minim de energie perfectă. Cu toate acestea, costul este foarte mare atunci când receptorul este de asemenea flexibil. Astfel, abordarea comună, un compromis între precizie și timpul de calcul, tratează ligandul ca fiind flexibil, în timp ce receptorul este menținut rigid în timpul andocării. Aproape toate programele de andocare au adoptat această metodologie, cum ar fi AutoDock, FlexX.

I.4.3 Andocarea flexibilă ligand și flexibilă receptor

Mobilitatea intrinsecă a proteinelor s-a dovedit a fi strâns legată de comportamentul ligandului și a fost revizuită de Teague. Incorporarea flexibilității receptorului reprezintă o provocare semnificativă în domeniul docherii. În mod ideal, utilizarea simulărilor de dinamică moleculară(MD) ar putea modela toate gradele de libertate în complexul ligand-receptor. Dar MD are problema eșantionării inadecvate așa cum s-a menționat mai devreme. În plus față de potrivirea

istorică indusă, au fost propuse mai multe modele teoretice: selecția conformer și inducția conformațională pentru a ilustra procesul de legare flexibilă a ligandului-proteină. Conform definiției date de Teague, selecția conformer se referă la un procedeu în care un ligand se leagă selectiv de o conformație favorabilă dintr-un număr de conformații de proteine.

I.4.4 Plierea proteinelor

Este procesul fizic prin care lanțul de proteine își dobândește structura nativă tridimensională, o conformație care este de obicei funcțională din punct de vedere biologic, într-un mod expedient și reproductibil. Este procesul fizic prin care o polipeptidă se pliază în structura tridimensională caracteristică și funcțională din „bobina” aleatorie. Fiecare proteină există ca o polipeptidă sau „bobină” aleatorie desfășurată atunci când este tradusă dintr-o secvență de mRNA într-un lanț liniar de aminoacizi.

I.4.5 Structura terțiară a proteinelor

Odată ce structura terțiară a proteinei este formată și stabilizată prin interacțiunile hidrofobe, poate exista, de asemenea, legătura covalentă sub formă de punți disulfidice formate între două resturi de cisteină. Structura terțiară a unei proteine implică un lanț polipeptidic unic. Totuși, interacțiunile suplimentare ale lanțurilor polipeptidice pliate dau naștere la formarea structurii quaternare.

I.4.6 Structura quaternară a proteinelor

Structura terțiară poate da naștere la formarea structurii quaternare în unele proteine, care implică de obicei "asamblarea" sau "coasamblarea" subunităților deja pliate. Cu alte cuvinte, lanțurile multiple de polipeptide ar putea interacționa pentru a forma o proteină quaternară pe deplin funcțională.

I.4.7 Modelarea plierii proteinelor

Tehnicile „de novo” sau „ab initio” pentru predicția structurii proteinei computerizate sunt legate, dar strict distincte de studiile experimentale de pliere a proteinelor. Dinamica moleculară (MD) este un instrument important pentru studierea plierii și dinamicii proteinelor în silico. Simulări pliabile de echilibru au fost realizate utilizând modelul implicit de solvent și eșantionarea

“umbrelă”. Din cauza costurilor computaționale, simulările de pliere MD de la început, cu apă explicită, sunt limitate la peptide și proteine foarte mici. Simulările MD ale proteinelor mai mari rămân limitate la dinamica structurii experimentale sau la desfășurarea acestora la temperaturi ridicate. Procesele de pliere de lungă durată (peste 1 milisecundă), cum ar fi plierea proteinelor de dimensiuni mici (aproximativ 50 de reziduuri) sau mai mari, pot fi accesate folosind modele cu granulație grosieră.

Capitolul I.5

Descriptori moleculari

Teoria grafurilor chimice este o știință interdisciplinară, între chimie și matematică. Se încearcă rezolvarea unor probleme dificile ale chimiei, cum ar fi enumerarea izomerilor, simetria moleculară și / sau elucidarea unor structuri chimice complexe.

I.5.1. Definiții de bază în grafuri

Un graf este o pereche de două seturi: setul de vârfuri / atomi V și setul de margini / legături E . O margine este o pereche de vârfuri (i, j) care aparțin de $E(G)$ (Harary, 1969), G fiind un graf molecular (nedirecționat). Numărul de vârfuri în G este dat de cardinalitatea setului de vârfuri. Termenul de graf a fost introdus de Sylvester (1874).

I.5.2. Matrici topologice pătrate și indici

Un graf molecular poate fi reprezentat de o secvență de numere, un polinom, un singur număr sau o matrice. Aceste reprezentări au scopul de a fi unice, pentru o anumită structură.

I.5.2.1. Matricea adiacenței

Matricea de adiacență $A(G)$ Sylvester (1874) este un tabel simetric pătrat definit ca:

Dacă în locul 1, am pus topologic bo ordine de legătură ($> C-C <$, $bo = 1$; $> C = C <$, $bo = 2$; aromatic legătură, $bo = 1,5$), avem matricea de conectivitate $C(G)$. Matricea adiacenței permite recuperarea grafului corespunzător.

I.5.2.2. Matricea distanței

Matricea distanței $DI(G)$ este o masă simetrică pătrată, cu dimensiuni $n \times n$, definită ca (Harary, 1969):

Intrările non-diagonale ale acestei matrice sunt doar distanța topologică dintre i și j . Suma a jumătății a tuturor intrărilor din $DI(G)$ oferă indicele topologic Wiener - „ W ” binecunoscut.

I. 5.2.3. Matricea deturului

În grafurile care conțin cicluri, dacă cele mai scurte căi sunt înlocuite cu cea mai lungă cale între două noduri i și j , poate fi definită matricea Detour $DE(G)$ (Harary, 1969, Diudea et al., 2002).

I.5.2.4. Matricea Cluj

Matricea Cluj $CJ(G)$, propusă de Diudea (Diudea, 1997, Diudea, 2010, Diudea et al. 1997, Janežič et al. 2007), este definită pe fragmente Cluj care colectează nodurile v situate mai aproape de i decât de j , capetele unei p căi (i, j) , cu alte cuvinte, vecinătăți vertex (vezi Gutman, 1994) a i vs. orice nod j , unite prin calea p , cu distanțele măsurate în subgraful $G \setminus p$:

Intrările în matricele CJ se calculează ca fiind maximul cardinalității dintre toate fragmentele care pot apărea în grafurile care conțin inele.

Matricile Cluj sunt definite atât prin distanța ($UCJDI$) cât și prin conceptele de ocolire ($UCJDE$), ele sunt matrice non-simetrice, cu excepția unor grafuri simetrice. Aceste matrici pot fi simetrizate prin multiplicarea Hadamard cu transpunerea lor. Matricele simetrice bazate pe margini sunt calculabile de la cea bazată pe cale, prin înmulțire cu matricea de adiacentă a grafului.

În arbori, intrările matricei Cluj reprezintă numărul de căi care trec prin i până la j . În figura de jos se oferă un exemplu în acest sens. Observați că $RS(UCJp) = RS(We)$; $CS(UCJp) = CS(DI)$.

Indicii proveniți din matrici topologice (a se vedea mai sus) sunt calculați ca jumătate din suma intrărilor matriceale.

$$I(G) = (1/2) \sum_i \sum_j [M]_{ij} = \sum_{i>j} [M]_{ij}$$

În arbori, suma jumătății din matricele simetrice Cluj oferă indicii Wiener W și hiper-Wiener WW, de la SCJe și SCJp, respectiv.

I.5.2. 5. Matrici sarcina – „CH“

Tabelul CH (G) al matricei “weighted” se calculează pe baza grupului electronegativităților grupului Sanderson (Diudea și Ursu, 2003), după cum urmează:

I.5.2.6 Matrice de straturi și coajă

I.5.2.7.1 Matrice de straturi

Un strat de vârfuri v situat la distanța k, în partiția G (i) este definit ca:

$$G(v)_k = \{v \mid d_{i,v} = k\} \quad G(i) = \{G(v)_k ; k \in [0, 1, \dots, ecc_i]\}$$

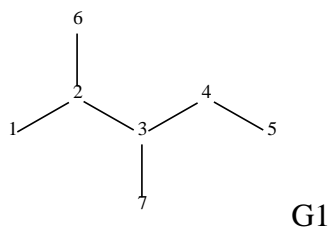
Unde ecc_i este excentricitatea lui i. Intrările din matricea stratului (a proprietății vârfurilor) LM (Diudea, 1994, Diudea și Ursu, 2003, Diudea, 2010) sunt definite ca

$$[LM]_{i,k} = \sum_{v \mid d_{i,v}=k} p_v$$

Matricea straturilor este o colecție de intrări de mai jos:

$$LM(G) = \{[LM]_{i,k} ; i \in V(G); k \in [0, 1, \dots, d(G)]\}$$

D (G) fiind diametrul grafului (adică cea mai mare distanță în G). Coloana k = 0 este doar coloana proprietăților vârfurilor. Atunci când $p_i = 1$ (proprietatea de numărare), matricea LM se numește LC (matricea stratului de numărare). Orice proprietate atomică / vârf poate fi folosită ca p_i . Orice matrice pătrată M poate fi matricea - info, adică matricea care furnizează proprietăți locale / vârf, așa cum este implementată în software-ul TopoCluj (Ursu și Diudea, 2005).



i\k	0	1	2	3	4	RS
1	1	1	2	2	1	7
2	1	3	2	1	0	7
3	1	3	3	0	0	7
4	1	2	2	2	0	7
5	1	1	1	2	2	7
6	1	1	2	2	1	7
7	1	1	2	3	0	7
CS	7	12	14	12		
kCS		12	28	36	16	92a

Matrici strat LC(G1); a = 2 × indexul Wiener

I.5.2.7.2 Matrice pentru straturi

Operatorul matricei de coajă, Sh, (Diudea și Ursu, 2003) transformă o matrice pătrată într-o matrice de strat / coajă:

$$[\text{ShM}]_{i,k} = \sum_{v|d_{i,v}=k} [M]_{i,v}$$

Clasele de centralizare a vârfurilor sunt identice cu cele găsite prin permutarea intrărilor din matricea de adjuvant, de exemplu, de către Mathematica și GAP (Grupuri, Algoritmi și Programare). Indicele de indexare este în special un descriptor al formei moleculare.

II. Contribuții personale

Capitolul II.1

Adaptabilitate moleculară a ligandului

PEI (polietilenimine) lineare și ramificate și spațiul proprietăților

II.1.1 Introducere

Un spațiu de proprietăți chimice definește adaptabilitatea unei molecule la condițiile în schimbare și interacțiunea acesteia cu alte sisteme moleculare determinând un răspuns farmacologic. Într-o serie moleculară congenerică (compuși cu același algoritm de derivatizare și prin urmare, aceeași formulă brută), proprietățile chimice variază în mod monoton, adică compușii congenerici au același spațiu de proprietăți chimice. Spațiul de proprietăți chimice este o componentă cheie în proiectarea moleculară, unde unele blocuri de construcție sunt funcționale, adică derivatizate și eventual auto-asamblate în sisteme mai complexe, cum ar fi sistemele de enzimă-ligand, din care (proprietăți fizico-chimice/bioactivitate) pot fi prezise prin studiile QSPR / QSAR (relație cantitativă-proprietate / activitate).

Adaptabilitatea moleculară a unui anumit compus reprezintă procesul de remodelare prin care compusul adoptă o nouă conformație potrivită cu interacțiunea acestuia cu o altă moleculă, proteine, condiții medii. O modalitate de a evalua cantitativ această proprietate intrinsecă a unui compus este calculând indicele de adaptabilitate moleculară. Indexul este raportul dintre varianța unui descriptor topologic sensibil la schimbarea coordonatelor topologice și atenuarea energiei compusului.

II.1.2 Metode computaționale

PEI sunt explorate computațional prin spațiul lor de proprietăți chimice. Pentru această clasă de compuși, grafice bidimensionale și graficele radar sunt potrivite pentru proiectarea subspațiului relevant pentru receptor și respectiv, pentru analiza diversității (Franco et al., 2008; Shelat et al., 2007, Perlman et al., 1999). Folosind metode statistice în explorarea spațiului proprietăților chimice ale PEI, proprietățile lor fizico-chimice pot fi prezise chiar și în mod consecutiv derivatizării și funcționalizării. Cu alte cuvinte, comportamentul fizico-chimic al unei

clase de compuși, când se deplasează în spațiul său chimic, poate fi prezis prin metode computaționale (Mandal et al., 2009). Pentru a prezice în mod corespunzător comportamentul compușilor derivați, trebuie să se calculeze proprietățile compușilor de bază (Guru et al., 2015). Pentru a studia PEI, spațiul lor de proprietăți chimice, adică variațiile de proprietăți consecutive funcționalității și derivatizării, s-au dezvoltat pentru a simula interacțiunea PEI cu sisteme moleculare (adică nano-dispozitive) pentru un set de molecule PEI.

Locul unde s-a efectuat andocarea a fost locul activ al GOx pentru oxidarea glucozei (Anslyn și Dennis, 2006). Toate valențele GOx, sarcinile au fost corectate, moleculele de apă, alți liganzi și cofactori au fost îndepărtați.

Pentru a obține o măsură cantitativă (exprimată matematic) a diferenței dintre unghiurile PEI didere , a fost calculată o ecuație de gradul 4 bazată pe o linie de tendință polinomială cu perioada 4. Un exemplu de linie de trend polinomial și linearizare a datelor este prezentat în figura 3 (material suplimentar)

Datele, calculate pentru ambele PEI-uri, includ următoarele variabile: aria moleculară Connolly, zona accesibilă Connolly (Connolly,1983), greutatea moleculară, ovalitatea, momentul principal inerțial, refractivitatea moleculară, diametrul topologic și indexul Wiener, log P (Timmerman et al., 2002; CRC Press 1974).

Pentru a determina lungimea maximă a lanțului de PEI legat pe GOx, a fost efectuat un studiu suplimentar de andocare. Un set de molecule LPEI, de la C2 la C70 (a se vedea Materialul suplimentar), au fost andocat la situsul activ catalitic al enzimei (a se vedea metoda de andocare descrisă mai sus). După andocare s-au dezvoltat modele QSAR, energia sterică a complexului GOx-PEI fiind variabilă dependentă.

II.1.3 Rezultate

Pentru a da o măsură cantitativă a asemănării / disimilarității prezentată o abordare matematică a fost utilizată: o linie de tendință polinomială de ordinul 4 a fost calculată pentru grupurile aparținând BPEI 04 (C14N8 și C18N10), obținându-se astfel polinoame de gradul al patrulea (un total de 15 ecuații au fost calculate) precum ecuațiile de mai jos:

$$\text{C14N8 BPEI 04: } y=0.0001x^4 - 2*10^{-5}x^3 - 30.06x^2 + 0.661x + 97,401 \quad (1)$$

$$\text{C18N8 BPEI 04: } y = 0.000x^4 - 1 * 10^{-5}x^3 - 14.96x^2 + 0.622x + 48,499 \quad (2)$$

Apoi, rădăcinile ecuațiilor au fost calculate. Ele constau din numere reale și imaginare (vezi tabelul 1, pentru ecuația prezentată). Calculul rădăcinilor a fost realizat utilizând motorul computational online Wolfram alpha.

Tabelul 1. Rădăcini pentru ecuațiile de gradul 4: (3), (3)

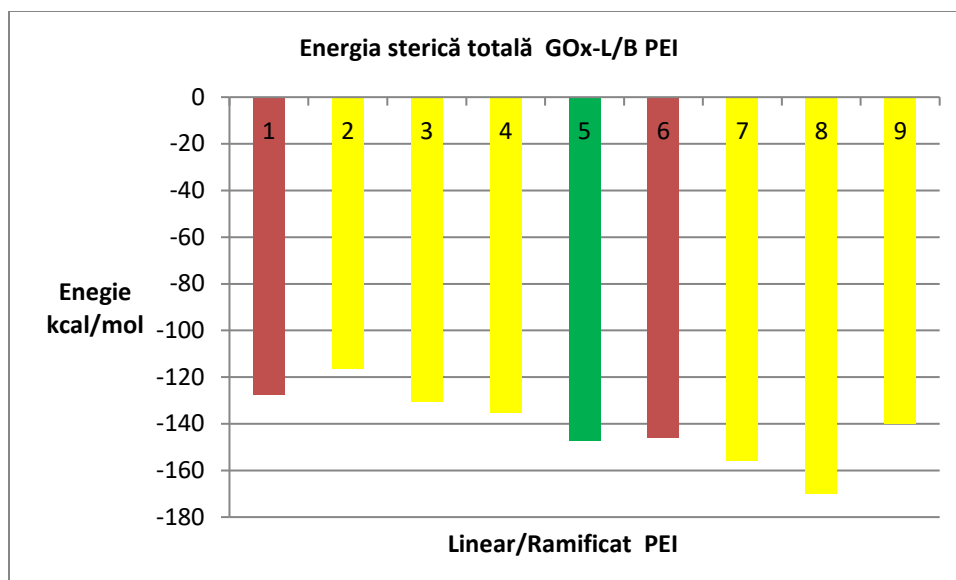
Ecuție	Rădăcină 1	Rădăcină 2	Rădăcină 3	Rădăcină 4
3. C14	-545.181	-57.254	57.275	545.361
3. C18	20.376	50.003	-11.684-18.421i	-11.684+18.421i

Pentru a reprezenta în detaliu spațiul proprietăților chimice, 10 descriptori moleculari au fost calculați pentru PEI și rezultatele au fost îmbinate într-o formă bi dimensională, iar o suprafață asemănătoare cu graficul radial a fost reprezentată

Fiecare proprietate a fost reprezentată de graficul radial. Suprafețele LPEI01 și BPEI 02 nu sunt vizibile fiind acoperite de suprafețele BPEI 03 și BPEI 04 din seria PEI liberă C14N8.

Există diferențe clare în spațiul de proprietăți chimice al PEI, înainte și după andocare. Compararea a două molecule este echivalentă cu formarea unui cluster complex (care corespunde interacțiunilor lor virtuale). Conform teoriei rețelei, odată formată complexitatea unui grup între două structuri PEI, aceasta este direct proporțională cu disimilaritatea lor (adică, cu cât moleculele sunt mai "diferite", cu atât sunt mai complexe rezultatele clusterului.

Comparația dintre energia de andocare (energia totală sterică) și energia după andocare a LPEI și BPEI cu număr apropiat de atomi de carbon este reprezentată în figura de mai jos.



Energia sterică a complexului GOx-L / B PEI: (de la stânga la dreapta) 1 și 6 L PEI C14 și C18 (în roșu); 2 până la 4 și 7 până la 9 reprezintă izomerii ramificați B PEI corespunzători (în galben). Izomerul LPEI C16 este reprezentat în verde.

II.1.4 Concluzii

LPEI-urile își modifică geometria mai ușor în comparație cu BPEI-urile, ceea ce înseamnă că LPEI-urile sunt mai adaptabile la un anumit loc de legare. LPEI-urile sunt adaptabile la locul de amplasare și spațiul proprietăților chimice - stabile. Din perspectiva intervalului de variație, setul PEI C18N10 este mai favorabil în comparație cu C14N8 PEI. Dacă se dorește construirea un dispozitiv nano folosind PEI și având GOx ca component, atunci LPEI sunt preferate, cel puțin în dispozitivele de prima generație (în care LPEI este ancorat la GOx). Dacă este necesară funcționalizarea suplimentară, atunci C18N10 PEI trebuie să fie ales în detrimentul C14N8. Când se vorbește despre proprietățile termoresponsive, care sunt corelate cu momentul principal al inerției, LPEI ar trebui alese preferențial la BPEI. Momentul principal este legat de temperatură și astfel de stabilitatea termică în complexul GOx-PEI [31]. Dimensiunea optimă a PEI trebuie să fie în jurul valorii de C18N10, care este la mijlocul lungimii lanțului PEI, după cum sugerează modelul QSAR dezvoltat în acest studiu, pentru a obține dovezi ale unei anumite "saturații" a GOx prin PEI și invers, atunci când mărimea moleculei PEI crește. Cele PEI ramificate au o influență energetică relativ mică a legării GOx în comparație cu PEI liniar (Lungu et al., 2016).

În concluzie, un compus linear neramificat are o adaptabilitate moleculară mai bună decât un compus ramificat cu aceeași formulă moleculară. Acest lucru se realizează în principal din cauza factorilor sterici care apar în urma ramificării (de exemplu derivatizarea). Din punct de vedere al recunoașterii moleculare, un compus liniar își pliază mai ușor structura, de exemplu, într-un “buzunar” sau într-un grup funcțional. În designul molecular, pentru ca un compus să aibă grade nesfârșite de libertate pentru un anumit spațiu chimic, înseamnă o pierdere în specificitatea lui. Spațiul de bioactivitate are un domeniu rigid.

Un compus liniar se poate deplasa prin întregul spațiu de bioactivitate, cu consecința pierderii specificității pentru o anumită țintă biologică. Pentru a restrânge această adaptabilitate moleculară neîngrădită, un compus (ligand) trebuie să fie ramificat astfel încât numai o regiune specifică a spațiului chimic, care corespunde spațiului de bioactivitate, să poată fi explorată de compus. Astfel, compusul poate avea numai conformații distincte care ajung la zone distincte ale spațiului de bioactivitate. Aceste "limitări" măresc specificitatea compusului pentru o anumită țintă (receptor). În sfârșit, din punct de vedere al ligandului (oaspeții), fiecare compus are nevoie de o anumită adaptabilitate la receptor, astfel încât recunoașterea moleculară să aibă loc.

Capitolul II.2

Adaptabilitatea moleculară a receptorului

Adaptabilitatea moleculară a flavin adenin dinucleotidul (FAD) în rândul aminoacizilor adiacenți și rolul său catalitic în GOx (gluco oxidază)

II.2.1 Introducere

Formarea unui complex între un receptor și un ligand este evenimentul critic în orice cale biologică. Într-o astfel de interacțiune, ligandul și receptorul (de exemplu enzima, proteina) se modelează reciproc pentru a obține o conformație optimă, capabilă să îndeplinească funcții biologice. Cu excepția proteinelor funcționale inerte, cum ar fi cele găsite în țesutul conjunctiv, proteinele funcțional active, pentru a-și îndeplini funcția, trebuie să existe într-un complex cu o moleculă mică numită ligand, indiferent dacă ligandul este exogen, endogen sau un cofactor. Cofactorii sunt o categorie unică de liganzi endogeni, datorită legăturii lor permanente necovalente

cu enzima (receptorul). În mod normal, un ligand formează legături necovalente cu receptorul pentru o perioadă relativ scurtă de timp determinată, după care complexul este fie metabolizat, fie ligandul este decuplat de receptor, făcând receptorul gata pentru un alt eveniment obligatoriu. Enzimele, care joacă și rolul unui receptor pentru substratul lor (liganzi), efectuează modificări structurale permanente pe substrat (ligand). K_{off} , natura și dinamica acestor procese sunt modulate de cofactori.

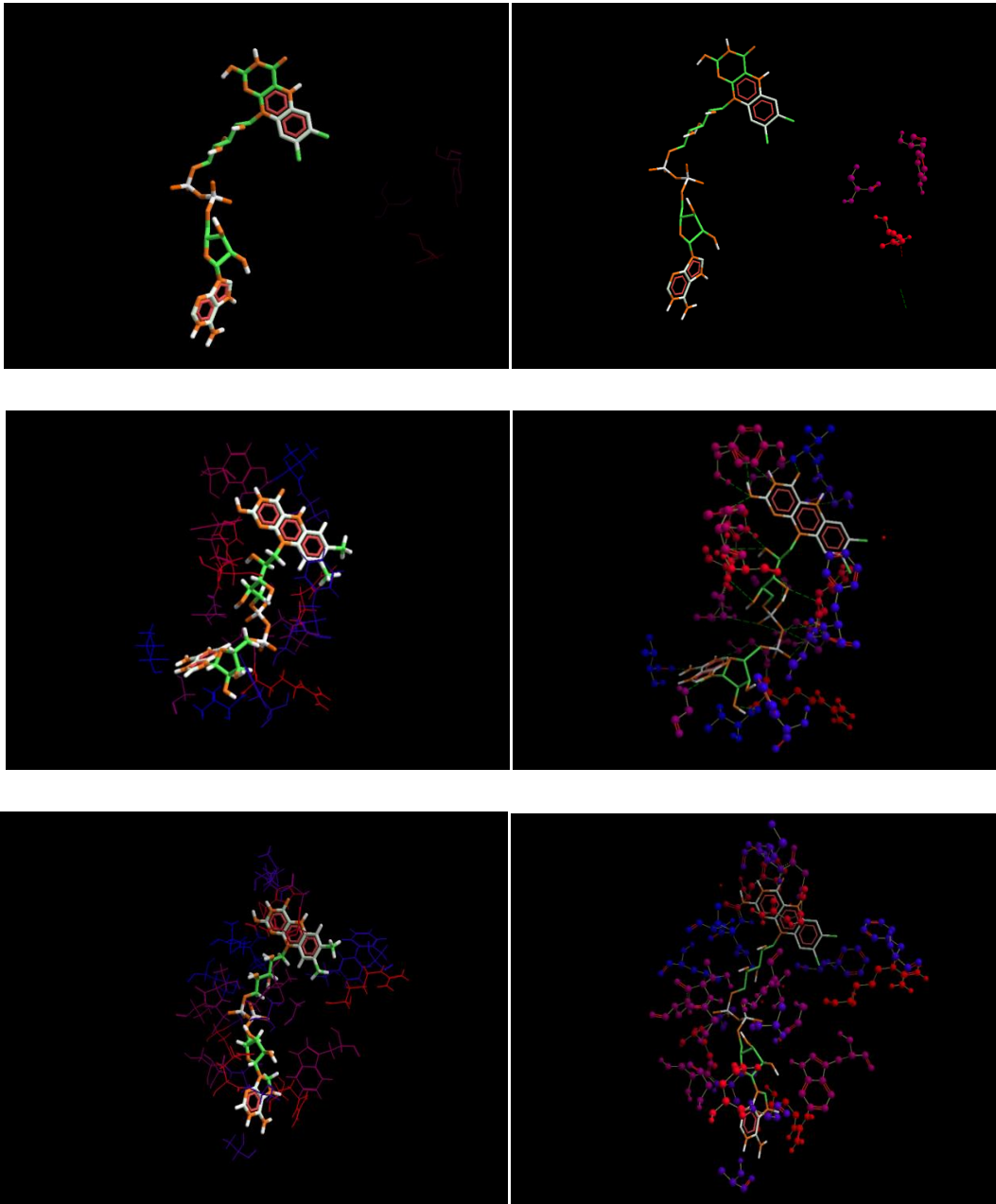
II.2.3 Metode computationale

În studiul sistemelor enzimatică au fost folosite metode computazionale- homologia, dinamica moleculară. Toate sistemele moleculare concepute „in silico”, au fost minimizezate, protonate la pH fiziologic, sarcinile și distanțele interatomice corectate

II.2.3 Rezultate

În modelul de homologie, FAD are cea mai scăzută energie, mai favorabilă, datorită flexibilității modelului (în model, legăturile disulfidice dintre lanțuri au fost evitate). Potențialul de energie GOx, așa cum este reprezentat în intervalele de pH și de temperatură, sugerează o variație a pH-ului, independentă de temperatură. Aceasta înseamnă că o scădere a energiei potențiale de aproximativ 0,08305 kcal / mol (vezi potențialul = -16691,6689 kcal / mol, energia potențială medie care trebuie modificată -16691,7519 kcal / mol) va păstra activitatea GOx la pH 7 și la 50°C. Energia totală FAD, în principal energia sterică, crește cu temperatura. Cele două variante de căldură de formare pot reprezenta, întâmplător, stări de tranziție (Solomons și Fryhle, Wiley, 2004) ale FAD. Cu toate acestea, acest rezultat computațional poate reprezenta pur și simplu o defecțiune a câmpului de forță utilizat. Factorul B (sau factorul de temperatură) sugerează că GOx are cea mai mare flexibilitate la starea de eutermie. La starea de hipertermie, este de așteptat o mobilitate atomică acerbă, în funcție de scăderea valorilor B, probabil producând o scădere a activității enzimei. Cu alte cuvinte, datorită "imobilității" proteinelor, contactele dintre FAD și rețeaua de aminoacizi tind să crească, rezultând o creștere a energiei totale și sterice a sistemului FAD-Aa. Energia aminoacizilor nu corespunde energiei lor optime, astfel că FAD va avea o conformație nefavorabilă pentru catalizarea oxidării beta-D-glucozelor. Mutația în aminoacizii legați la buzunar poate modifica comportamentul FAD la variațiunile externe. FAD, după mutația internă a aminoacizilor, reacționează mai mult la schimbările interioare, fără a

"vedea" întreaga rețea. In figura de mai jos se ilustrează modul în care FAD este in contact cu aminoacizii. Diagrama prezintă FAD înconjurată de aminoacizi, în prezența moleculelor de apă.



FAD - aminoacid „ meshing ”: 1GPE, 2WDW, 4YNT, prin hidrofobicitate (coloana din stânga) și prin interacțiuni electrostatice (coloana din dreapta). FAD este reprezentat cu grupul de flavin orientat aproximativ în același mod.

II.2.4 Concluzii

FAD joacă un rol semnificativ în modularea flavoproteinelor (adică enzimele având FAD ca cofactor), determinând tipul de substrat și tipul de reacție. FAD poate lua diferite conformații; cu alte cuvinte, are o structură "adaptabilă" la aminoacidul "meshing", oferindu-și astfel "răspunsul" propriu, prin geometriile conformaționale și energetice diferite. Așa cum era de așteptat, condițiile exterioare pot produce schimbări în geometria FAD prin interacțiunea cu rețelele de aminoacizi interiori (la locul de legare) și exteriori (toți ceilalți aminoacizi). Optimizarea rețelei de aminoacizi poate masca sau face mai "vizibilă" (pentru FAD) o parte a rețelei interioare sau exterioare. Augmentarea acestor două rețele de aminoacizi permite schimbări în adaptabilitatea FAD și consecutiv în comportamentul enzimelor, în termeni de stabilitate, specificitate substrat și performanță.

Capitolul II.3

Prezicerea potenței

Potența și predicția situsului de legare a teixobactinei și a altor liganzi ai Lipidului II prin scorurile de bază statistice ale hărților spațiale conformaționale.

II.3.1 Introducere

Așa cum s-a discutat anterior, un buzunar de legare a receptorului poate fi ocupat de un ligand în diferite conformații plauzibile, dintre care doar puțini sunt legați energetic de o activitate biologică în domeniul eficienței fiziologice. Locul receptorului și eficiența acestei interacțiuni pot fi prezise. Aici este propusă o metodologie de predicție bazată pe statistici. Pentru a valida această metodologie, a fost studiată o serie de inhibitori ai Lipidului II. Această clasă de compuși a fost aleasă din cauza interesului recent pentru inhibitorii Lipidului II. Dintre acești compuși, moleculele de teixobactin, care inhibă sinteza peretelui bacterian prin interacțiunea cu Lipidului II, sunt cele mai studiate. O metodologie nouă, bazată pe evaluarea statistică a hărților conformaționale, pe gruparea dinamică moleculară și analiza principală a componentelor (PCA), este utilizată pentru atingerea acestui obiectiv. Metodologia utilizată este exemplificată într-un singur caz.

Lipidul II, un peptidoglican, este un precursor al sintezei celulelor bacteriene și are proprietăți atât hidrofiele, cât și lipofile. Molecula translocă o membrană bacteriană pentru a livra și încorporează "blocuri de construcție" din pentapeptidă dizaharidică în peretele de peptidoglican. Lipidul II este o țintă antibiotică validă (Wright, 2015), deși are o exprimare relativ modestă în celula bacteriană, mai puțin de 2000 de molecule pe bacterii (Heijenoort et al., 1992). Molecula trebuie să fie înclinată în afara membranei citoplasmice pentru a încorporează o unitate de peptidă dizaharidică în peptidoglican, fiind astfel relativ accesibilă unei molecule exterioare (adică, antibiotic). Lipidul II este sintetizat ca o moleculă funcțională și esențială chiar și în organismele fără perete celular (Henrichfreise et al., 2009) (cum ar fi Chlamydia, Mycoplasma, Wolbachia, etc.). Compușii antimicrobieni, care acționează cu ajutorul Lipidului II și sunt selectați în acest studiu, includ: Dalbavalin, Oritravacin, Telvanicin, Teicoplanin, Teixobactin (Wright, 2015), Telvanicin și Vancomicină. Alți compuși sunt cunoscuți în această privință: Ramoplanina (Heijenoort, 2007), unele peptide ca Nisin (De Gruijff et al., 2008), Copsin sau alfa defensin HNP-3 umană (Ganz et al., 1985).

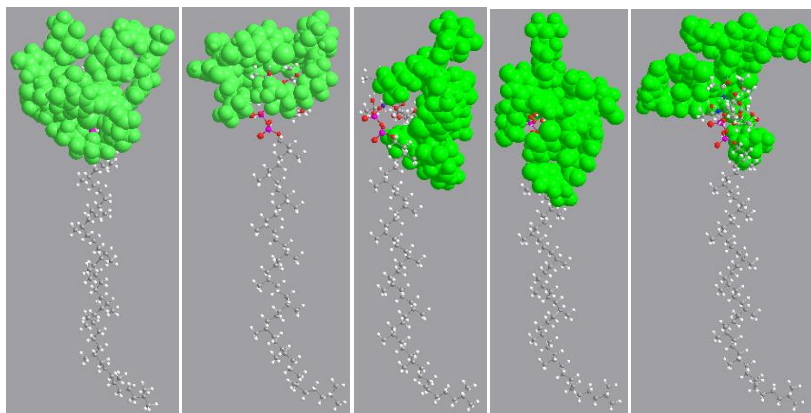
II.3.2 Metode computaționale

Pentru a studia computațional complexul dintre Lipidul II și liganzi, a fost efectuat mai întâi un studiu de andocare. Portul de andocare a fost preluat din literatură (Hart et al., 2016). Ca centru al cavității de andocare a fost ales atomul C6 cu coordonate carteziane $x = -13.353$, $y = -13.886$ și $z = 1.712$ (D-ala-D-ala motiv). Raza a fost setată la 15 Å. După andocare, au fost luate în considerare 5 conformații cu ligand și 5 complexe consecutive pentru fiecare moleculă, notată de la 00 până la 04.

Așa cum s-a procedat în cazul Lipidului II, a fost efectuată o analiză statistică a populației de pixeli. O metodă de notare a fost introdusă pentru a evalua potența ligandului în ceea ce privește efectul antibacterian. Metoda este compusă din 3 reguli/criterii de evaluare: (i) Evaluarea complexului receptor-ligand în funcție de "șansele" receptorului de a lega ligandul. Acest criteriu se referă la studiul de conformație a Lipidului II. (ii) Evaluarea complexului receptor ligand în termeni de eficiență de legare a ligandului. Această regulă explorează densitatea clusterelor pe baza studiului dinamic molecular. (iii) Evaluarea complexului care caracterizează ligandul prin PCA. Moleculele sunt aranjate folosind aceste criterii. Datele rezultate au fost comparate cu cele din literatura de specialitate.

II.3.3 Rezultate

Conformațiile obținute pentru Dalbavacin sunt prezentate în figura de mai jos. În fiecare imagine ligandul este reprezentat ca un “spacefilling” colorat în verde. Lipidul II este reprezentat în gri. Pentru situl de legare au fost selectate cinci conformații energetic fezabile. Pentru fiecare dintre aceste conformații, Lipidul II se "rotește" în interiorul ligandului în fiecare caz.



Complexul Dalbavacin (conformații, de la stânga la dreapta) 00,01,02,03,04.

Deviația standard scăzută în ceea ce privește analiza conformațională a Lipidului II este corelată cu o "populație" favorabilă din punct de vedere energetic a conformațiilor a Lipidului II. Datele noastre arată că Lipidul II are o populație de conformații energetice mai favorabile în interacția cu Teixoplamină (în conformație (structura) 01, cu cel mai mare scor al eficienței (15 puncte)) comparativ cu Vancomicina (din care structura cea mai favorabilă 02 are cel mai mic scor din seria de liganzi (3 puncte)).

II.3.4 Concluzii

Rezultatele obținute prin această metodă computațională sunt în concordanță cu datele experimentale publicate în literatura de specialitate, de exemplu, teixobactinul este raportat a fi puternic in vitro împotriva tuturor bacteriilor gram pozitive testate și eficient in vivo la șoarecii infectați cu *S. aureus* cu rezistență la methicilină. Necesarul pentru a obține o rată de supraviețuire de 50% împotriva MRSA a fost de numai 10% din doza de Vancomicină (Ling et al., 2015), PD50, un antibiotic tipic utilizat pentru MRSA. Astfel, raportul Teixobactin: Vancomicina, 1: 5 observat experimental este regăsit în acest studiu (Teixobactin este de 5 ori mai puternic decât Vancomicina 15: 3).

Capitolul II.4

Predicție și reprezentare a suprafeței biologice

Modelarea liganzilor în andocarea rigidă a inhibitorilor *MraY*. Discriminantul polinomial și operatorul Laplacian ca și predictor ai bioactivității

II.4.1 Introducere

Interacțiunea unei molecule mici (ligand) cu o structură proteică, adică receptor, reprezintă fundamentul mecanismului de acțiune al medicamentului pentru marea majoritate a substanțelor bioactive. Ligandul și receptorul își adaptează geometria și energia, în cadrul acestei interacțiuni, în beneficiul complexului receptor-ligand. Într-un mod de andocare inducție, structura ligandului este cea mai susceptibilă la schimbări în topologie și energie, comparativ cu receptorul. Aceste modificări pot fi descrise prin hipersuprafețe multiple, în termeni de operator polifuncțional discriminant și operator Laplacian. Astfel de suprafețe topologice au fost reprezentate pentru fiecare inhibitor *MraY* (fosfo-MurNAc-pentapeptidă translocază), studiat înainte și după andocarea cu *MraY*. Energiile de legare ale tuturor liganzilor au fost calculate prin această procedură. Pentru fiecare ligand, discriminantul Laplacian și polinomial au fost corelați cu concentrațiile minim inhibitorii (MIC) extrase din literatură. A fost înregistrată o corelație puternică între toate acestea.

II.4.2 Metode computaționale

Au fost studiate structurile a 5 membri ai clasei inhibitorilor reprezentativi ai *MraY*: Caprazamicin A, Liposidomicin B, Muraimicin CI, Mureidomicin A, Tunicamicina I.

Coordonatele topologice pentru toți liganzii și obiectivele lor farmacologice *MraY* au fost reprezentate folosind parcele de împrăștiere. Tendința pentru fiecare coordonată a fost exprimată ca o ecuație logaritmică de trend. Reunirea ecuațiilor logaritmice a fost reprezentată ca o funcție $\log(i)$ integrată. Procedura a fost aplicată tuturor moleculelor studiate. De exemplu, pentru Caprazamicin A, ecuația logaritmică de generare a suprafeței are forma:

$$Y = \int (0.9741 \ln(x) - 4.0486Ux^{0.1524} \ln(x) - 0.6333U - 3.588 \ln(x) + 14.913) dx.$$

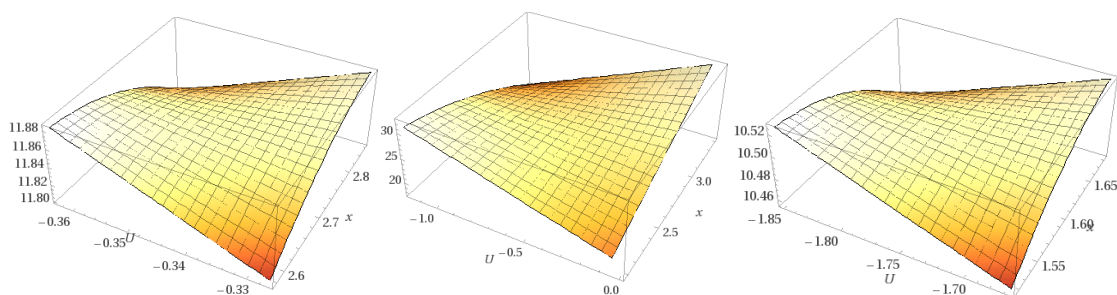
Folosind ecuația de mai sus, au fost generate grafice 3D pentru toate cele cinci structuri.

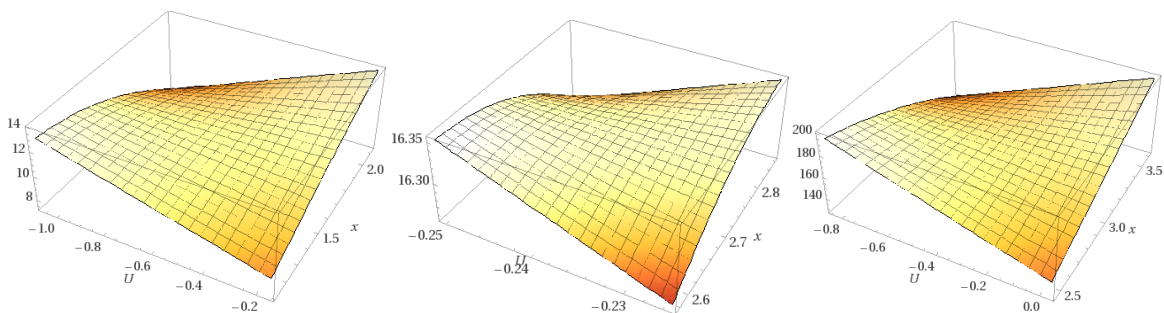
II.4.3 Rezultate

Procedura de andocare a fost efectuată cu succes. Receptorul (MraY) a fost considerat fix și liganzii au fost considerați mobili. Pentru fiecare ligand, cele mai bune poziții de conformație au fost reținute. Toți liganzii se fixează la locul de legare desemnat. În figura 2c, cele mai bune poziții pentru compușii studiați sunt colorate în verde, în buzunarul de legare MraY. Se observă că niciun compus nu este legat la un altul. Pentru testarea capacității de andocare pentru a prezice conformația corectă (adică bioactivă), re-docking-ul lui Muraimicin D pe MraY s-a dovedit a fi de succes.

Ecuatii logaritmice pentru liganzi liberi și legați.

Moleculă	Coordonata X	Coordonata Z	Coordonata Y
Caprazamicin A	$Y = 0.9741 \ln(x) - 4.0486$	$Y = 0.1524 \ln(x) - 0.6333$	$Y = -3.588 \ln(x) + 14.913$
Liposidomicin B	$Y = 0.2486 \ln(x) - 4.9995$	$Y = -2.49 \ln(x) + 8.0632$	$y = -2.371 \ln(x) + 6.8077$
Muraimicin Cl	$Y = 0.3637 \ln(x) + 8.2632$	$Y = -2.35 \ln(x) + 9.3795$	$Y = -0.105 \ln(x) + 0.4055$
Mureidomicin A	$Y = 2.3747 \ln(x) - 7.7925$	$Y = 1.7282 \ln(x) - 5.4429$	$Y = -0.13 \ln(x) + 0.4852$
Tunicamicin I	$Y = -1.382 \ln(x) - 1.382$	$Y = 1.219 \ln(x) + 3.022$	$Y = -1.325 \ln(x) + 1.95$
MraY	$Y = -0.991 \ln(x) + 34.353$	$Y = 3.639 \ln(x) - 12.969$	$Y = -6.486 \ln(x) + 56.661$
Moleculă după andocare	Coordonata X	Coordonata Z	Coordonata Y
Caprazamicin A	$Y = 1.1474 \ln(x) + 2.1222$	$Y = 2.2825 \ln(x) + 7.4555$	$y = 1.4935 \ln(x) + 4.3625$
Liposidomicin B	$Y = 0.6125 \ln(x) + 8.986$	$Y = 1.8278 \ln(x) + 9.8712$	$Y = 0.1306 \ln(x) + 9.6344$
Muraimicin Cl	$Y = 1.9153 \ln(x) + 2.4093$	$Y = -0.492 \ln(x) + 22.764$	$Y = 0.1996 \ln(x) + 7.3225$
Mureidomicin A	$Y = 0.9779 \ln(x) + 6.4303$	$Y = -0.93 \ln(x) + 19.552$	$Y = 0.6179 \ln(x) + 7.1176$
Tunicamicin I	$Y = 0.6101 \ln(x) + 10.26$	$Y = 1.5282 \ln(x) + 14.268$	$Y = 0.851 \ln(x) + 6.0062$
MraY	$Y = -0.991 \ln(x) + 34.353$	$Y = 3.639 \ln(x) - 12.969$	$Y = -6.486 \ln(x) + 56.661$





Colecții topologice, după andocare, reprezentate în ordine, forma de la stânga la dreapta: Caprazamicin A, Liposidomicin B, Muraimicin CI, Mureidomicin A, Tunicamicia I și MraY.

Spațiile topologice ale liganzilor, în ligandul liber (de ex., minimizat din punct de vedere energetic) și staționare (într-un complex cu MraY), sunt, așadar, spații euclidice Hausdorff, descrise ca varietăți topologice. Coordonatele carteziene și spațiile topologice ulterioare sunt modelate de forțele intramoleculare și intermoleculare. Aceste forțe, în funcție de tipul de interacțiune, sunt: (i) forțele electrostatice, datorate încărcăturilor rezidente în materie; (ii) forțele electrodinamice; (iii) interacțiunile van der Waals cu cea mai mare răspândire; (iv) forțele sterice, cauzate de entropie, manifestate, de exemplu, în procesele de solvatare (în special în deplasarea moleculelor de apă din locul de legare); (V) legături de hidrogen; (Vi) interacțiuni hidrofobe etc.

II.4.4. Concluzii

Suprafața topologică a ligandului, după andocare, este modelată de către receptor. Suprafața topologică a ligandului este o manifestare bidimensională, modelată de forțele intra și intermoleculare implicate în andocare. Operatorul Laplacian și discriminantul polinomial al ecuației carteziane de gradul al doilea (x, y, z -trends) pot fi utilizați pentru a caracteriza distinct suprafețele topologice ale fiecărui ligand. Ecuația de coordonate carteziene este în corelație puternică cu afinitatea de legare (calculată în silico) și MIC. Acești operatori, calculați pentru un distribuitor topologic de două grade al ligandului andocat, pot fi utilizați în predicția bioactivității pe o cale care implică complexul ligand-receptor (Lungu et al., 2017).

Capitolul II. 5

Plierea proteinelor și interacțiuni

Plierea alfa 1 antitripsinei și interacțiunea cu nanomaterialele

II.5.1 Introducere

Proteinele își pot desfășura acțiunea numai atunci când structura lor terțiară și cuaternară este intactă. În această stare, anumite regiuni ale proteinei localizate la locul de legare pot să se orienteze și să permită realizarea procesului de recunoaștere moleculară și formarea completă a complexului ligand-receptor. În condiții nefiziologice, cum ar fi: temperatură corporală ridicată sau scăzută, presiune osmotică mărită sau scăzută, radiații, reactivi chimici, proteinele sunt denaturate (Kang et al., 2000). Desfășurarea este un proces reversibil atunci când regiunile active ale proteinei (adică receptorul) se desfășoară și permit dezlipirea ligandului. În starea “dezvelită”, energia proteică și entropia sunt ridicate. În starea nativă pliată, energia și entropia sunt scăzute.

II.5.2 Metode computaționale

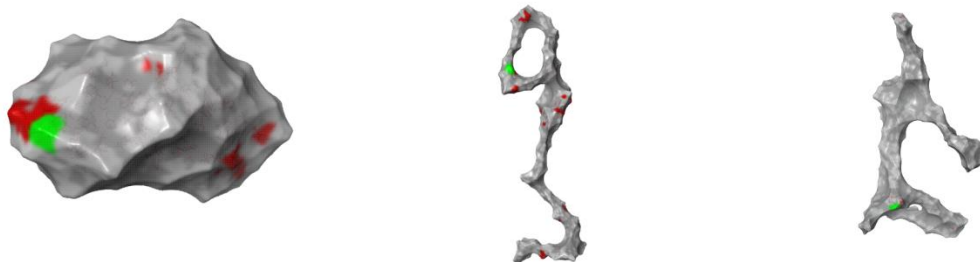
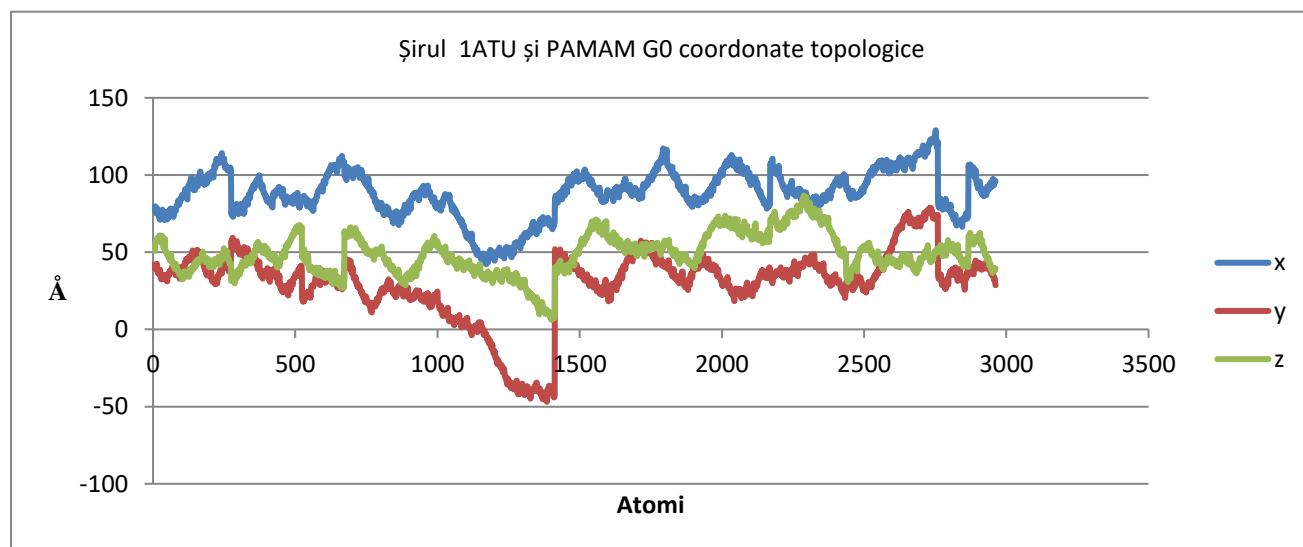
Proteina 1ATU cu o greutate moleculară de 41,97 kDa a fost aleasă să fie studiată. Interacțiunea cu proteine a fost studiată comparativ cu un monostrat de polimer PAMAM. PAMAM-urile luate în studiu au fost C₂₂H₄₈N₁₀O₄ (G0), C₆₂H₁₂₈N₂₆O₁₂ (G1), C₁₁₀H₁₉₂N₂₆O₄₄ (G1.5), C₁₄₂H₂₈₈N₅₈O₂₈ (G2), C₃₀₂H₅₁₂N₁₂₂O₆₀ (G3) și o serie de mai mulți dendrimeri de generație zero, cu nucleu aromatic: C₁₆H₂₈N₂O₄, C₂₀H₃₆N₂O₄, C₂₂H₄₀N₂O₄, C₂₄H₄₅N₃O₆, C₂₈H₅₂N₂O₄. Au fost construite un număr total de 10 sisteme de proteine PAMAM. Structurile au fost optimizate pentru starea intravasculară normală: NaCl 0,15M, 310.15K temperatură, o constantă dielectrică de 78 a fost aleasă în ceea ce privește datele publicate.

S-a studiat suprafața de agregare a proteinei. Agregarea de suprafață a fost studiată pe toate proteinele, șirurile rezultate plus cele „native” cu structura 1ATU și pe „liber” PAMAM rezultat, „string”-ul de proteine. Astfel pot fi descrise și comparate proprietățile de interacțiune biologică și topologia lor (în termeni de reacții biochimice, agregare). Procesul global de agregare a fost de asemenea caracterizat prin calcularea potențialului Zeta pentru un domeniu de

temperatură de la 273K la 320K și un domeniu de pH de la 7,4 la 7,8. Câmpul de forță folosit pentru a calcula suprafețele de agregare a fost OPLS3.

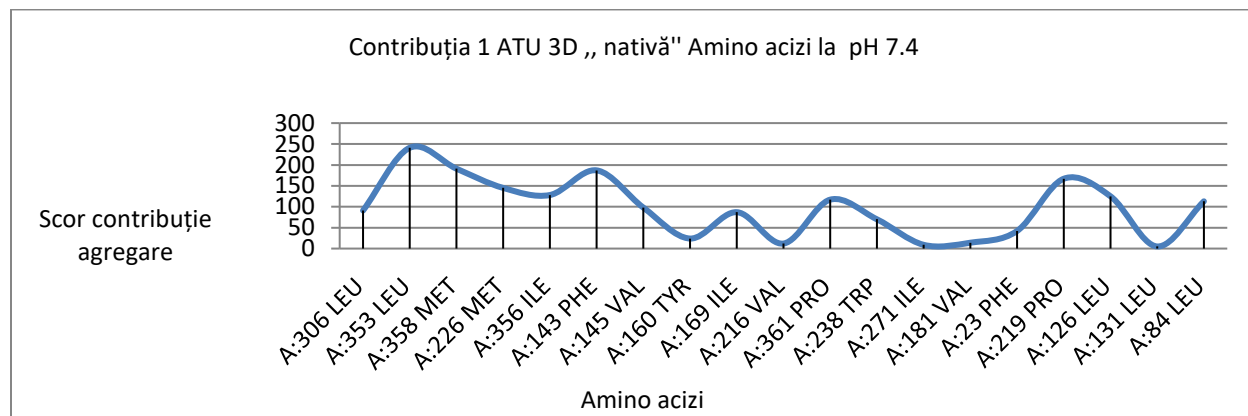
II.5.3 Rezultate

Coordonatele carteziene topologice ale șirului proteic au prezentat modele distincte pentru fiecare șir de sistem proteic-polimer corespunzător. Au fost distinse două tipuri majore de modele: un model corespunzător proteinei libere cu structură terțiară intactă și un al doilea model închis la dendrimer de generația 1. Fără intersecția coordonatelor carteziene la capătul terminalului, ultimele 500 de puncte topologice se corelează cu o rată mai mică de interacțiune cu stratul de polimer (au același model ca șirul proteic liber și proteina liberă cu structură terțiară).



Structura 1ATU 3D "nativă", "liberă" și respectiv G1.5. Suprafața de agregare a fost calculată în roșu; sunt reprezentați toți Aa care pot contribui potențial la un proces de agregare. În verde este reprezentat Aa cu cea mai mare șansă de a produce o agregare.

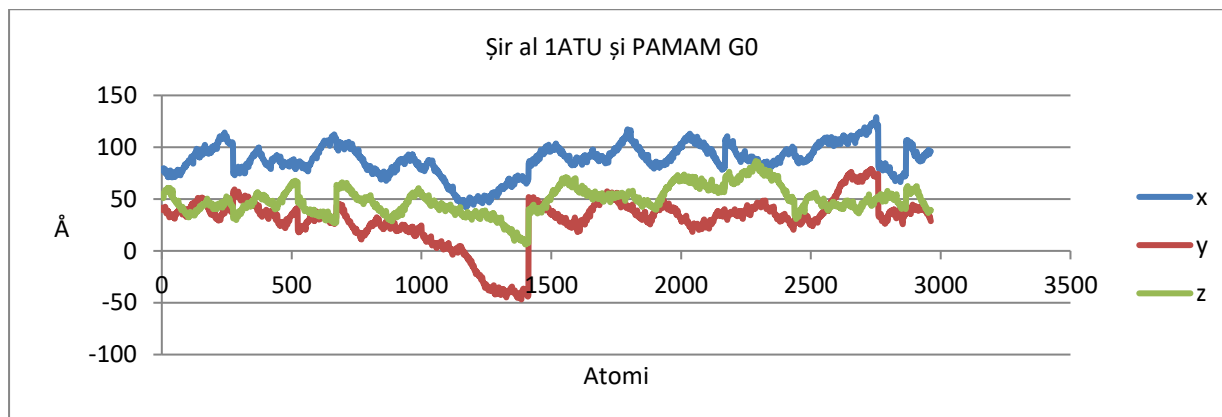
S-a calculat scorul de agregare a șirurilor de proteină (Saunders et al., 2016). Cel mai mic scor are șirul generat de stratul G1.5. În figură sunt reprezentate comparativ scorul nativ al proteinei, scorul liber al șirului și scorul G1.5.



Proteina sau acidul nucleic care se pliază sau se desfășoară este un proces-cheie în biologie. Denaturarea, procesul în care structura cuaternară este pierdută, are relevanță în divulgarea structurii proteice secundare și primare, prezentă în starea nativă a proteinei. Proteinele denaturate ilustrează un domeniu larg de proprietăți reprezentative din pierderea solubilității la agregare. Când proteinele sunt "fixate" pe suprafețe covalent sau necovalent, apare un fenomen similar denaturării. Nu există nici o îndoială că una dintre cele mai frecvent observate consecințe a atașării proteinelor la suprafața nanomaterialelor de carbon și a unor nanopolimeri, este apariția modificărilor conformaționale ale structurilor lor, ceea ce poate duce la expunerea noilor epitopi, modificări ale funcționalității și avidității proteinelor, prin urmare, să inducă un răspuns imun puternic și / sau toxicitate neintenționată. Fenomenul interacțiunii proteinelor cu suprafața nanomaterialelor este un proces foarte complicat, nu numai din cauza dinamismului schimbărilor observate, efect similar cu efectul Vroman, care nu poate ajunge niciodată în stare de echilibru in vivo, ci mai ales din cauza complexității parametrilor sistemului testat, care determină procesele de adsorbție și, astfel, se formează stratul de compoziție biomoleculară.

Pe scurt, "corona" de proteine este prezentată ca o structură multi-strat diferențiată în partea primară, compactă a interfeței proteine-nanomateriale. Interacțiunea este reprezentată de o parte "tare" a acestei structuri, formată din suprafața proteinelor de recunoaștere a nanomaterialelor cu afinitate ridicată la adsorbția lor și schimbul lent; și o parte dinamică secundară a tipului de schimbare "moale", scurt format de proteine și legat în mod reversibil la partea "dură". Un impact

semnificativ asupra proceselor de creare a coroanei de proteine va avea caracteristicile de suprafață unice ale nanosistemului și proteine care determină afinitatea de legare la planul interacțiunilor adsorbției și protein-proteinei, suprafața proteină a nanomaterialelor, proteină-apă.



Pentru fiecare șir de proteine, cele trei funcții logaritmice sunt unificate, integrate și reprezentate pe un grafic 3D. De exemplu, pentru șirul de proteine brute PAMAM G0, următoarea ecuație a fost utilizată în construirea graficului:

$$\int [(2.372 \log(x) + 71.411 U (0.01076 \log(x) + 28.956 U (2.8141 \log(x) + 29.356))] dx.$$

Șirurile de proteine rezultate din interacțiunea cu dendrimeri arată o topologie distinctă. Reprezentarea obținută arată aproximativ aceeași morfologie (aceeași curbura, unghi, orientare). Există diferențe în funcție de tipul de dendrimer utilizat. Atunci când proteina este denaturată în mod computațional fără graful stratului dendrimer, rezultă o „îndoire” opusă comparativ cu sistemul proteic dendrimer. Rezultatul grafic prin plasarea coordonatelor funcției logaritmice integrate pentru 1ATU 3D, fără a fi denaturat, prezintă o formă relativ plană cu unele regiuni mici pliate, care corespund regiunilor funcționale proteice.

II.5.4 Concluzii

Straturile de polimeri au un efect cuantificabil asupra proteinelor și favorizează reacții diferite. Acest efect este demonstrat de variația coordonatelor topologice. Variația proprietăților topologice determină variații ale proprietăților biochimice care favorizează diferite tipuri de reacții. Din punctul de vedere al 1ATU PAMAM G1.5 are probabil cea mai scăzută interacțiune cu proteinele și efectele toxice. Această proprietate este reflectată de analiza șirului de proteine -

numărătoarea clusterului și de analiza biochimică a G1.5 care a arătat că nu există reacții biochimice potențial obligatorii cu proteine. Potențialul Zeta sugerează o soluție coloidală mai puțin stabilă de proteină 1ATU. Analiza șirurilor de proteine demonstrează aici o metodă fezabilă de explorare a interacțiunii proteine polimeri. Structura de proteine este influențată de mediul de imobilizare. Tehnica folosită este adecvată în calcularea interacțiunilor proteinei cu medii diferite (nanostructuri de carbon, dendrimeri).

Prin operarea modificărilor mici în structura proteinei (receptorului), spațiul de bioactivitate a ligandului poate fi accesat de către liganzi. Când întreaga proteină este denaturată, adică redusă la structura sa primară și secundară, spațiul de bioactivitate nu poate fi abordat. Astfel, spațiul de bioactivitate poate fi accesat numai de o structură cu arhitectură terțiară și cuaternară.

Capitolul II.6

Explorarea spațiului bioactivității

Proba spațiului de bioactivitate poate fi făcută computațional, utilizând metode statistice în principal QSAR (regresie liniară multiplă, regresie parțială minimă pătrată, regresie vectorială, regresie rețea neuronală) sau prin metode convenționale - experimente: titrare calorimetrică (ITC), antibiograme în cazul compușilor toxici, etc.

II.6.1 Derivați imidazol piridinici: modele QSAR

II.6.1.1 Introducere

Imidazolul, piridina și dihidroxiacetofenul sunt esențe valoroase în chimia medicamentelor, având o mare varietate de activități biologice, cum ar fi activitățile antitumorale, antimicrobiene, antiinflamatorii, antihipertensive, anti-neuropatice și antihistaminice (Richaud et al., 2011; Zhang et al., 2014). Deși fiecare schemă discutată manifestă proprietăți promițătoare de tip medicamentos, în ceea ce privește farmacocinetica și farmacodinamica, noii compuși dezvoltați folosind aceste metode nu reușesc să se transforme în "hit"-uri. Majoritatea nu trec studiile preclinice, iar celelalte eșuează în studiile clinice de fază I sau II. Motivele sunt diferite: de la lipsa bioactivității in vivo, la interacțiunile farmacologice cu alte medicamente.

II.6.1.2 Metode experimentale

Substanțele hibride imidazol-piridină, fără schelet de dihidroxiacetofenonă, s-au obținut folosind o procedură de reglare în trei etape descrisă în altă parte (Mantu et al., 2016): N-acilare, N-alchilare și quaternizarea heterociclicilor care conțin azot. Substanțele derivate imidazol-piridină hibride cu schelet de dihidroxiacetofenonă s-au obținut utilizând o procedură analoagă. Compușii au fost testați pentru activitate antitumorală și antimicrobiană (împotriva *Mycobacterium tuberculosis*). Ecranul antitumoral a utilizat linia de ecran a celulelor NCI60 (Shoemaker, 2006). Rezultatele de screening au fost evaluate folosind software-ul COMPARE (<http://dtp.nci.nih.gov>). Activitatea antimicrobiană împotriva *Mycobacterium tuberculosis* a fost testată ca parte a screening-ului TAACF TB. Activitatea antimicrobiană împotriva *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, crescută în condiții aerobe, a fost evaluată prin determinarea concentrației minime inhibitoare (MIC) a compușilor. MIC-urile au fost determinate prin măsurarea creșterii bacteriene după cinci zile, în prezența rifampicinei ca martor. Pentru compușii potenți, testele au fost repetate la concentrații inițiale mai mici. Analiza se bazează pe măsurarea creșterii în mediu lichid a unei tulpini de marker fluorescent de H37Rv, unde citirea făcută fie ca densitatea optică (OD), fie ca fluorescența. Utilizarea a două citiri minimizează problemele cauzate de precipitații compuse sau auto fluorescență. A fost stabilită o relație liniară între OD și citirile fluorescente care justifică utilizarea fluorescenței ca măsură a creșterii bacteriene. Farmacocinetica acestor compuși a fost evaluată experimental ca solubilitate a compușilor într-un mediu microbiologic. Compușii au fost preparați ca diluții seriale de 2 ori în 10 puncte în DMSO și diluate în mediu 7H9-Tw-OADC în plăci cu 96 de godeuri. Cea mai mare concentrație de compuși a fost 200 pM. Pentru compușii cu o solubilitate limitată, concentrația cea mai mare a fost de 50 de ori mai mică decât concentrația stocului (de exemplu, 100 pM pentru stocul de DMSO 5 mM, 20 pM pentru 1 mM DMSO). Turbiditatea a fost măsurată utilizând un cititor de microplăci de la Nefeloskan Ascent. Un compus a fost considerat insolubil dacă turbiditatea a fost cu 300% mai mare decât cea a controlului negativ. Se înregistrează cea mai scăzută concentrație insolubilă. Fiecare placă de compuși de testat a inclus un control pozitiv (1 mM haloperidol) și un control negativ DMSO (DMSO 2% în 7H9-Tw-OADC). Fiecare experiment a inclus compușii de control: tartrat de metoprolol, rifampicină, fenitoină, haloperidol, simvastatină, dietilstilbestrol și tamoxifen.

II.6.1.3 Metode computaționale

Au fost luate în considerare interacțiunile liganzilor cu trei tipuri de țintă (receptori): receptorul 1, dodecamerul Dickerson Drew cu structura sa medie (PDB id 2DAU) și rezoluția atomică (PDB id 436D) (Tereshko et al., 1999); Receptorul 2, G-quadruplexul (PDB id 2F8U) (Chen et al., 2006) (dintre cei 10 conformeri furnizați de modelul cristalografic, cel cu cea mai mică energie a fost ales); Receptorul 3, care este un complex între dioxigenază și șirul ADN (PDB id 3S5A) (Chengqi și Chuan, 2013).

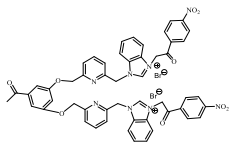
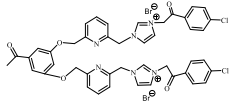
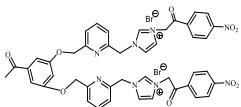
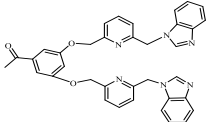
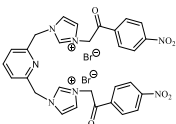
Descriptorii care evaluează farmacocinetica și proprietățile asemănătoare medicamentelor au fost calculați utilizând modulul QuickProp inclus în pachetul software Schrodinger.

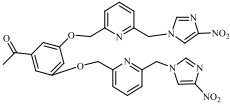
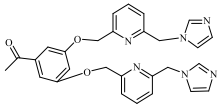
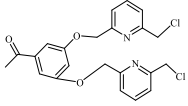
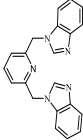
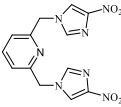

II.6.1.4 Rezultate

II.6.1.4.1 Rezultate experimentale

Compușii sintetizați # 1 - # 11, au fost testați împotriva *Mycobacterium tuberculosis*. Compușii (tabelul 1) au prezentat activitate anti-tuberculoasă semnificativă. Activitățile au fost exprimate în IC₅₀ (concentrație inhibitorie minimă) și IC₉₀ (concentrație inhibitoare de 90%).

Componente testate pentru activitatea antituberculoasă

#	Formula	Formula brută	MIC	IC ₅₀	IC ₉₀
1		C₅₂H₄₂Br₂N₈O₉	9.6	3.7	10
2		C₄₄H₃₈Br₂Cl₂N₆O₅	8.4	3.4	8.6
3		C₄₄H₃₈Br₂N₈O₉	4.8	2.7	5.2
4		C₃₆H₃₀N₆O₃	39	20	42
5		C₂₉H₂₅Br₂N₇O₆	58	38	71

6		$C_{28}H_{24}N_8O_7$	12	9.2	11
7		$C_{28}H_{26}N_6O_3$	100	43	69
8		$C_{22}H_{20}Cl_2N_2O_3$	>200	>200	>200
9		$C_{21}H_{17}N_5$	>50	43	>50
10		$C_{13}H_{11}N_7O_4$	92	77	100
11		$C_{13}H_{13}N_5$	>200	>200	>200

Compusul nr. 3 a prezentat cea mai bună activitate împotriva *Mycobacterium tuberculosis*.

Docking-ul efectuat pe receptorul R1 (structura medie) pentru compușii # 1 - # 11 a arătat următoarele: (i) Reziduul A: 1 tip DC, numărul de atomi grei 16 (atomi grei așteptați 19) (ii) Reziduul B: 13 tip DC, coordonatele de andocare x: -7,52, z: -10,00, y: 1,25. Poziția de legare este reprezentată în figura 2.

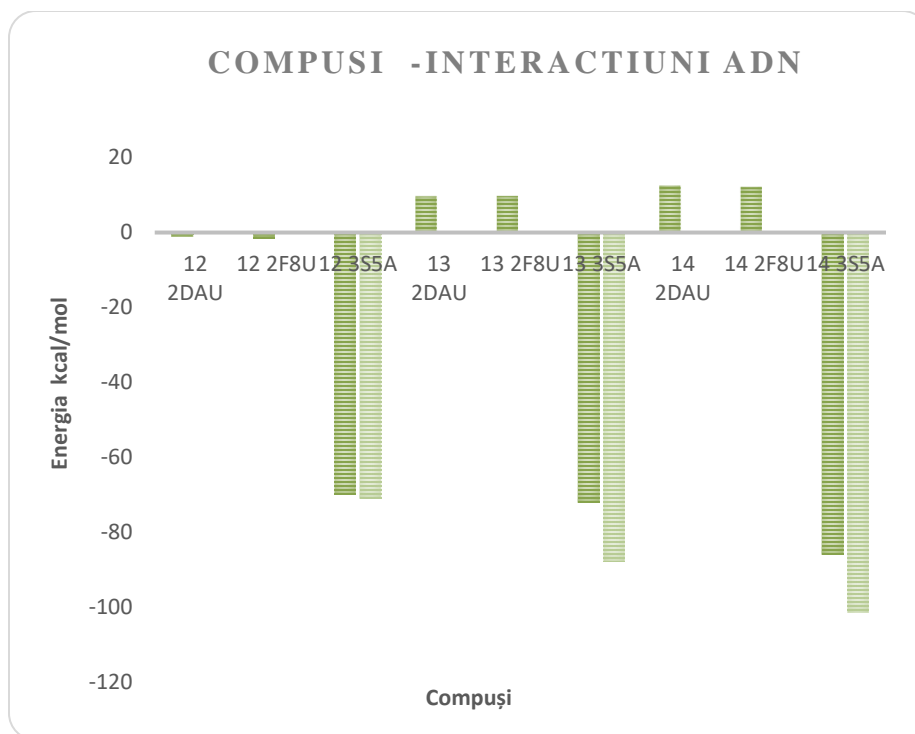


Diagrama de bare care arată energia complexă totală (verde închis) și energia de interacțiune externă ligand (verde deschis), în kcal / mol, a compușilor # 12 - # 14 și a receptorilor R1 la R3.

II.6.1.4.3 Modele QSAR

Folosind un algoritm de selecție a componentelor și ținând cont de dimensiunea redusă a setului de date (11 molecule), au fost selectați 3 descriptori dintr-un set de date de 177 descriptori: (1) indicele de conectivitate la distanță Balaban; (2) Indicele Balaban cu distanța ponderată în masă și (3) indicele de formă al traseului 2-Randić.

Modelul obținut are $r^2 = 0,9656$, $p = 0,9068$, $q^2 = 0,9656$; ecuația modelului: $y = 0.9657MIC_{\text{observat}} + 2.2917$ (figura 9). O listă a modelelor posibile luate în considerare este prezentată în tabelul 3.

II.6.1.5 Concluzii

Compușii dezbătuți aici au prezentat o activitate pro-antitumorală și antituberculoasă promițătoare, în comparație cu medicamentele aprobate standard utilizate ca martori în testele noastre experimentale. Moleculele dirivatizate și mai mari au prezentat o afinitate mai mare pentru tulpinile de ADN comparativ cu structurile mici, neramificate. Compușii cu energii de andocare

mai mici (energia negativă) au prezentat o activitate mai mare în ceea ce privește ADN-ul. ADME și proprietățile computaționale asemănătoare medicamentului s-au evidențiat în compuși mai mici, dar mai puțin la cei mai mari, ramificați.

În cele din urmă, poate fi explorată interrelația dintre secvența ADN și secvența peptidică. O secvență de peptide poate fi construită computațional pornind de la șirurile ADN alese. O astfel de secvență este construită in silico folosind nucleotide ADN. Pornind de la nucleotidele ADN, secvența de aminoacizi poate fi identificată computațional. Inhibitorii peptidelor, codificați prin secvența ADN, pot fi utili în metodele experimentale și computaționale, care urmează să fie dezvoltate.

II.6.2. Oxabutan benzamidele ca inhibitori ai UDP-3-O-acil-N-acetilglucozamină deacetilazei: un studiu QSAR

II.6.2.1 Introducere

Deacetilaza UDP-3-O-acil-N-acetilglucozamină (Jackman et al., 1999), UDP, (Uniprot ID O67648) este o enzimă care a transformat conversia UDP-3-O- [(3R) -3-hidroximiristoil] -N-acetilglucosaminei în prezența apei în UDP-3-O- [-3-hidroximiristoil] -D-glucozamină și acetat. UDP este o proteină Zn care participă la biosinteza Lipidului A (Li et al., 2008). Lipidul A este o componentă a unui endotoxin responsabil pentru toxicitatea bacteriilor gram negative. Lipidul este o componentă critică implicată în debutul răspunsurilor imune la infecția gram negativă. Este un stimulent puternic al sistemului imunitar fiind capabil să activeze monocitele sau marcofagele la concentrații pg / ml. Inhibarea sintezei lipidului A conduce la o scădere a scării răspunsului imun, consecutiv la infecția cu bacterii gram negative. În acest studiu, un model QSAR al inhibitorilor UDP este calculat pe o serie de 44 de molecule disponibile în comerț, cu efect inhibitor potențial asupra UDP determinat experimental. Modelul QSAR a fost utilizat împreună cu descriptorii chimici pentru clasificarea compușilor pe baza scorurilor de similitudine

II.6.2.2 Metode computaționale

Modelul QSAR se bazează pe date cu titrare calorimetrică (ITC) curate, care asigură afinitatea de legare exprimată ca și constante de disociere a echilibrului (K_d , nM). Datele măsurate la 25°C și pH -7, au fost extrase din CSARDock, CD (Dunbar et al., 2011). În acest sens, s-au preluat inițial 54 de compuși (vezi Materialele suplimentare), iar datele au fost inițial curate. În

acest proces s-au îndepărtat duplicatele de molecule cu aceeași structură și aceeași K_d (cu excepția celor cu K_d diferite pentru aceeași formulă chimică). După acest proces au rezultat 45 de compuși (vezi Materiale suplimentare). Pe datele disponibile K_d , s-au calculat deviația standard și eroarea standard.

Pentru a construi modelul QSAR, a fost utilizată regresia liniară multiplă. Un număr de descriptori chimici au fost utilizați: indicatori pentru atomii H, C, N, O, P, S, masa moleculară (MW), numărul total de atomi, numărul de atomi grei, numărul de limite de rotație, numărul de grupe donoare de hidrogen (HD), numărul de grupe acceptoare hidrogen (HA), numărul de inele, distanța minimă între două grupuri donoare de hidrogen, distanța maximă între două grupe donoare de hidrogen, distanța minimă între două grupuri acceptoare de hidrogen, distanța maximă între două grupuri acceptoare de hidrogen și indicele Wiener, comparativ cu afinitatea de legare obținută computațional și experimental ITC, K_d obținut având ca obiectiv UDP. În mod corespunzător, au fost construite două modele. Modelele au fost validate folosind tehnica LOO "leave one out". Modelul QSAR a fost utilizat pentru a caracteriza interacțiunea cu UDP a primilor trei compuși de rang înalt, bazată pe afinitatea de legare calculată după andocare și pe K_d experimentală. Pentru cele trei complexe de liganzi UDP, s-au calculat energiile și compusul cel mai favorabil din punct de vedere energetic a fost ales ca țintă pentru un screening de similitudine într-o bază de date disponibilă comercial. Modelul QSAR a fost utilizat pentru a prezice K_d pentru compușii extrași din baza de date comercială.

II.6.2.3 Rezultate

După optimizarea tuturor moleculelor disponibile, s-a obținut un set de date de 22 structuri, așa cum este prezentat în tabelul 1, împreună cu K_d și afinitatea de legare BA calculată. Moleculele sunt derivați de benzamidă și carboxamidă.

Modelele QSAR obținute sunt următoarele:

(1) afinitate de legare

$$BA = -0,0788093 + 0,0986589 * X,$$

$$N = 22; \text{ Pearson corelație pătrat } (R^2) = 0,9819; \text{ Eroare standard} = 0.2417$$

(2) constantă de disociere

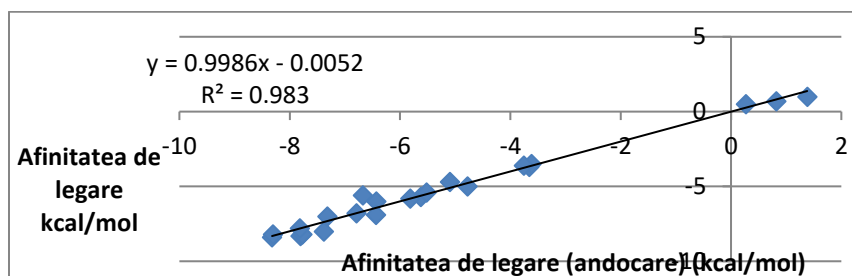
$$K_d = -6.13739 + 1.02618 * x,$$

N = 22; Pearson de corelare pătrat (R^2) = 0,9855; Eroare standard = 0.2393

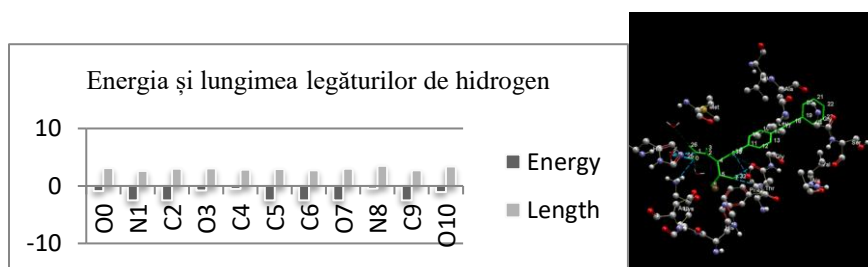
X este variabila observată. Valorile de-a lungul liniei de regresie sunt scorurile post testare anticipate. Linia de regresie cade în centrul graficului. Este linia de "best fit" pentru grafic.

Datele sunt reprezentate grafic, așa cum se arată în fig.1-3. Detaliile interacțiunii ligandului cu situsul de legare UDP sunt prezentate în fig.4 – 9.

Luând în considerare afinitatea experimentală K_d și afinitatea de legare (obținută prin andocare), au fost alese trei molecule pentru un studiu de similitudine: # 6, 16 și 22.



Afinitate de legare, andocare vs. datele QSAR prezise.



Ligandul # 22; Lungimea legăturii de hidrogen (Å) și energia (kcal / mol) și relația cofactorului Zn cu ligandul, energia-negru, lungimea –gri.

II.6.2.4 Concluzii

Afinitatea de legare calculată prin andocare și K_d -ul obținute experimental sunt în strânsă corelație. Regresia liniară multiplă este un instrument valoros în prezicerea afinității de legare.

Oxobutan benzamida în interacțiune cu UDP a dat o valoare precisă bună a K_d -ului, sugerând un rol potențial ca inhibitor al UDP.

II.6.3 Famotidina ca inhibitor de urokinază: un studiu QSAR

II.6.3.1 Introducere

Un studiu QSAR a fost efectuat pe o serie de derivați de naftalen ciclohexan amine cu determinarea experimentală a constantei de inhibiție a urokinazei (K_i) pentru a identifica un inhibitor potent de urokinază umană. Modelul QSAR a fost construit folosind rețele neuronale artificiale (ANN). Modelul a fost utilizat pentru găsirea de compuși cu proprietăți inhibitoare puternice de urokinază. Pentru compusul rezultat după screening, modelul ANN a fost folosit pentru a calcula K_i . Cel mai bun compus după K_i a fost ales pentru discuție. A fost utilizată o andocare indusă de fixare (ligand proteic) și o andocare cu proteină-proteină pentru a se obține o analiză a rezultatelor. Un derivat al bazei de izochinolin-diol a avut ca rezultat inhibarea urokinazei și proprietăți asemănătoare medicamentului.

II.6.3.2 Metode computaționale

Pentru a dezvolta un model QSAR al inhibitorilor de urokinază (Vincent, 1990) a fost aleasă o serie de compuși cu determinarea experimentală a constantei de inhibare (K_i) asupra urokinazei. Datele au fost prelucrate pentru a avea o valoare distinctă a lui K_i pentru o moleculă unică. De asemenea, structurile 3D au fost minimize energetice, sarcinile au fost corectate. Mai mult, trei molecule care conțin Br au fost eliminate din setul de date ca urmare a eșecului în calcularea încărcărilor parțiale

Rețelele neuronale artificiale (ANN) au fost utilizate pentru a construi modelul pentru eșecul metodei de regresie liniară multiplă (MLR) în predicția variabilei țintă (K_i) cu un $r^2 < 0,7$. Moleculele din setul de date au fost clasificate pe baza unui scor de similaritate. A fost aleasă molecula de acoperire în funcție de cel mai bun K_i și folosind corelarea ANN cu descriptorii și s-a efectuat screening-ul de similitudine pe o bază de date disponibilă comercial. Modelul QSAR a fost aplicat pe setul de molecule preluate pentru a calcula K_i . Pentru interpretarea rezultatelor a fost efectuat un studiu comparativ de andocare pe datele ligandului stabilit pe inhibitorii endogeni de urokinază API-1 și API-2.

În primul studiu de andocare, liganzii au fost andocați pe structura cristalografică a urokinazei cu PDB id 1C5Y. Portul de andocare a fost preluat din literatură și coordonatele sale precise au fost detectate computațional: x 8,84Å, y 3,18Å, z 29,94Å cu o rază de 15Å. Liganzii 9 și 24 au fost andocați pe urokinază folosind numărul maxim de conformații stabile de andocare pentru fiecare ligand. Un al doilea studiu de andocare a proteinei a fost realizat cu urokinază ca țintă și API-1 și API-2 ca liganzi. Structurile care compun modelul ANN au fost aranjate pe baza scorului de similitudine compus pe cel mai bun K_i și cea mai bună corelație cu modelul ANN.

II.6.3.3 Rezultate

A rezultat un set de date de 42 compuși moleculari distincți. Datele au fost împărțite utilizând un algoritm randomizat dintr-un set de antrenament (21 de compuși) utilizat pentru a construi modelul și un set de testare (21 de compuși) utilizat pentru a testa modelul. Variabila țintă a fost stabilită ca inhibitor constant (K_i). Descriptorii utilizați pentru a construi modelul au fost: distanța aromatică minimă între grupurile donoare de hidrogen, numărul de inele, numărul de atomi de hidrogen, distanța medie dintre două grupuri acceptoare de hidrogen, indicele Wiener, numărul de atomi C care sunt hibridizați sp^3 , sarcinile Andrews, numărul grupurilor de sisteme de operare, numărul total de atomi. Neuronii, inclusiv șirul de învățare a stratului de ieșire folosit, a fost de 0,3, intervalul inițial de greutate a fost de 0,5. Ecuația modelului este $y = 53.4084 + 0.956756 * x$. Pătratul de corelație Pearson (r^2) este 0.9614 și CC pătrat validat (q^2) este 0.960921. Corelația dintre K_i folosită în formarea modelului și predicția K_i a setului de antrenament este prezentată în figura 1.

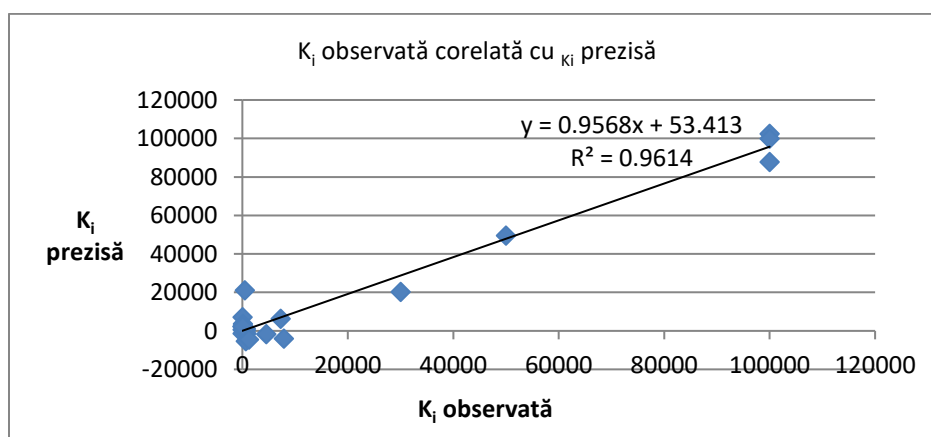
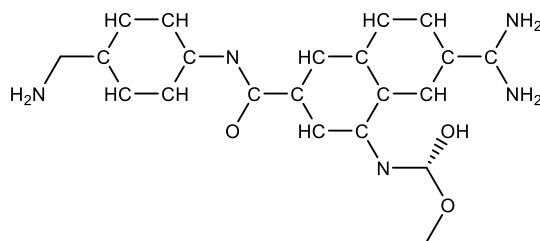


Figura 1. Constanta de inhibare (K_i) introdusă versus predicția modelului ANN.

Relevanța descriptorilor utilizați în model este următoarea, în ordine descrescătoare: aromatic, numărul de atomi de carbon h3 hibridizați, sarcini Andrews, numărul de inele, numărul de atomi de H, distanța minimă dintre un grup donor și unul acceptor de hidrogen, indicele Wiener, numărul OS, distanța medie minimă dintre grupurile donoare de hidrogen.

Clasificarea similarității cu compusul cu formula moleculară C₂₁H₂₂N₅O₃ (K_i = 0,9) este prezentată în figura de mai jos.



Ligand 9 hexahidro-naftalen metanol.

Adesea, compușii care au fost proiectați prin design-ul pe bază de structură a medicamentelor (în care structura proteinei și a complexului proteină-ligand a fost utilizată pentru proiectarea unor inhibitori mai buni) suferă de biodisponibilitate slabă și de toxicitate remarcabilă. Problema biodisponibilității este adesea asociată cu o solubilitate scăzută: inhibitorii buni sunt de cele mai multe ori "acasă" în mediul majoritar hidrofob al unui situs activ enzimatic tipic și astfel au adesea câteva grupuri polare pe ele. Creșterea numărului de grupări polarizate pe ligand va îmbunătăți deseori solubilitatea acestuia cu două ordine de mărime sau mai mult. Eficacitatea ligandului ca inhibitor va fi în mod obișnuit diminuată - un inhibitor cu K_i de 10 nM ar putea fi schimbat într-unul cu K_i = 50 nM - dar acesta este adesea văzut ca un compromis acceptabil. Creșterea solubilității va reduce adesea toxicitatea, deoarece compusul este mai puțin probabil să se acumuleze ca o masă insolubilă. Reducerea toxicității unui medicament nu este o sarcină ușoară. Unele molecule recuperate din screening în funcție de regula Lipinski de cinci au proprietăți asemănătoare unui medicament # 4 ce este cunoscut ca Famotidină și # 11 ca d-Phe-d-Phe-d-Nle-d-Arg-NH₂. Este o secvență de peptide bine cunoscută cu efect de agonist opioid kappa.

II.6.3.4 Concluzii

ANN au fost superioare în predicția bioactivității în comparație cu regresia liniară multiplă (MLR). Un model cu r² de 0,9614 a rezultat folosind o bibliotecă de 42 de compuși. Modelul ANN

a fost utilizat cu succes în clasarea similarității bibliotecii de date. Modelul ANN a prezis într-un domeniu realist faptul că K_i nu a obținut nici o eroare și nici o valoare de părtinire, toate fiind prezise în domeniul activității lui K_i . Interacțiunea famotidinei cu urokinaza a fost prezisă cu succes de valorile K_i care au sugerat o acțiune farmacologică și necesitatea administrării sale IV în reacția anafilactoidă asociată urokinazei.

II.6.4 Inhibitorii Ciclin dependent kinazei 2: un studiu de regresie neuronală artificială QSAR

II.6.4.1 Introducere

Ciclin dependent kinaza (CDK) joacă un rol major în reglarea dinamicii celulare. Kinazele sunt prezente în toate eucariotele cunoscute, iar calea lor funcțională de reglementare a fost conservată evolutiv, sugerând că această cale joacă un rol dominant în controlul creșterii celulelor și întreruperea ei poate duce la moartea celulelor. Au fost aplicate strategii de simulare a 3D-QSAR, strategiile de simulare moleculară și dinamică moleculară (MD) pentru investigarea interacțiunii moleculare între liganzii activi și kinaza dependentă de ciclina 2 (CDK2). Un model QSAR a fost calculat folosind regresia rețelei neuronale (ANN), cu o bună capacitate de predicție în validarea internă și externă. Rezultatele au fost comparate cu prototipul inhibitor al CDK, Staurosporine. O analiză mixtă care încorporează modelul QSAR, andocarea moleculară și dinamica moleculară a permis definiția farmacoforului de înaltă definiție. Datele furnizate de MD au fost în concordanță cu rezultatele modelului 3D-QSAR.

Activitatea biologică principală a Staurosporinei constă în legarea competitivă a protein kinazei, împotriva ATP, fiind un model al inhibitorului kinazei ATP competitiv; totuși, ea exprimă o mare afinitate și pentru multe alte CDK-uri. Cu alte cuvinte, lipsa ei de specificitate, a împiedicat utilizarea Staurosporine în clinică (Chae et al., 2000). În ciuda progresului în descoperirea mai multor inhibitori de tip CDK2, există încă un spațiu chimic disponibil pentru inhibitorii puternici și selectivi ai CDK2. Dificultățile constau în atingerea specificității izomorfe (Eaton la al., 1995), care vizează celule sau țesuturi specifice și asigură un grad corect de inhibiție (Elmore, 2007). Până în prezent, interacțiunea dintre CDK2 și liganzi nu este complet înțeleasă și mecanismul asociat nu este încă explicat. Variația mare a afinităților de legare a acestor compuși cu CDK2 și

relația dintre activitatea biologică și mișcarea cu “clapetă” a enzimei, precum și modificările conformaționale în situsul catalitic al CDK2, au fost investigate folosind o abordare combinată care include andocarea și dinamica moleculară. Datele de activitate au fost preluate dintr-o serie originală de 264 de compuși (Liu et al., 2007), obținută prin calorimetrie de titrare izotermică (Pierce et al., 1999) (ITC) împotriva CDK2. Structurile au fost tratate după cum urmează: s-au considerat numai compușii foarte activi, cu $K_d < 10\ 000$ nM. Izomerii structurali nu au fost luați în considerare. Urmând aceste etape, au rezultat 26 de compuși finali. Selecția de mai sus a fost făcută pentru obținerea unui model bazat pe compuși non-congenerici pentru a extinde spațiul chimic. Totuși, compușii inactivi nu au fost luați în considerare la construirea modelului.

II.6.4.2 Metode computaționale

Un set de date de 26 de molecule cu K_d măsurat (nM) pe ciclina dependent kinaza umană 2 a fost utilizat pentru a calcula un model QASR prin metoda regresiei ANN. Variabila țintă a fost setată ca K_d (nM). Variabilele dependente au fost după cum urmează: energie potențială (kcal / mol), greutate moleculară (GM), AlogP, aria suprafeței polare (PSA), raza moleculară (MR), polaritate moleculară, primul index Zagreb (ZI1) (Khalifeh et al., 2009), indicele Wiener (Wiener, 1947), indicele de Xu (Doucet și Panaye 2010), descriptorul topologic Gutman (GTM = ZI2) (Agnes, 2015), excentricitatea (ECC) (Delilers et al., 1999), regula lui cinci a lui Lipinski (

II.6.4.3 Rezultate

Au fost elaborate și analizate 20 de ipoteze. După analizarea alinierii liganzilor activi și a ipotezelor generate, ipoteza AADRR19 a fost selectată. Ipoteza selectată conținea un donator de atom de hidrogen (D4), doi acceptori ai legăturii de hidrogen (A2 și A3) și două inele aromatice (R10 și R12), figura 1.

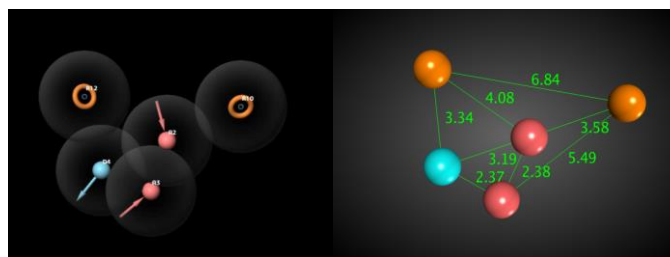


Figura 1. a. Common Pharmacophore pentru liganzi activi. Caracteristicile farmacoforului sunt colorate: donator albastru H, acceptor H roz, inel aromatic portocaliu; b. Distanța dintre caracteristicile farmacoforului este prezentată în angstromuri.

II.6.4.4 Concluzii

Pe scurt, a fost utilizată o strategie bazată pe mai multe tehnici de calcul pentru a explora procesul de inhibare a structurii de bază pentru o serie de inhibitori CDK2. Atașarea a fost utilizată pentru a genera moduri ipotetice de legare pentru liganzi. Dinamica moleculară "low" a fost utilizată pentru a evalua modul de legare din perspectiva receptorului. Ambele, Staurosporine și compusul # 9 au un miez lipofilic realizat din inele aromatice coplanare care se încadrează în buzunarul de legare. Așa cum sugerează modelul QSAR, este de o importanță redusă. Ambele, Staurosporina și # 9 au o regiune externă care se leagă cu aminoacizi marginali care acționează ca un "cârlig" în fixarea compusului la locul său. În plus, acordul satisfăcător între experiment și teorie și între modelul QSAR și modelul farmacofor (construit independent) a sugerat că modelul QSAR are o bună corelație și putere predictivă.

II.6.5 Inhibitori ai fosfodiesterazei cGMP 3', 5'-ciclic 10A: un studiu QSAR.

II.6.5.1 Introducere

Au fost studiate o serie de compuși cu IC_{50} , determinat experimental (nM) care vizează fosfodiesteraza 10A (PDE10A). Recent, PDE10A a fost propusă ca țintă pentru cancerul de colon. Un model QSAR a fost construit folosind compușii având ca variabilă țintă efectul lor inhibitor asupra PDE10A exprimat ca IC_{50} (nM). A fost utilizată o tehnică de corelare multiplă pentru a selecta descriptorii adecvați pentru construirea unui model de regresie. Descriptorii utilizați au fost descriptorii bazați pe grupuri funcționale și anumiți descriptori de centralizare. Modelul de regresie a fost construit utilizând regresia neurală artificială (ANN). A fost construit un model cu $r^2 = 0,9769$ și o deviație standard de eroare de 0,41.

II.6.5.2 Metode computaționale

Pentru a construi un model de farmacofor, a fost utilizat un set de date de determinare experimentală a activităților inhibitorii asupra compusului PDE10A (Liu et al., 2007). Compușii au fost utilizați pentru a genera o ipoteză farmacoforă comună. LigPrep a fost utilizat pentru

prepararea liganzilor utilizând câmpul de forță OPLS 2005, pH-ul setat la 7.4. În construirea farmacoforului, compușii care au IC_{50} de peste 100 nM, s-au considerat inactivi pentru ca ipoteza să aibă putere dicriminantă, adică să poată favoriza compușii care acționează în mod specific asupra PDE10A și au efect inhibitor, în contrast cu alți compuși care inhibă toate PDE-urile. Ipotezele au fost validate folosind o bancă de falși andocatori (Bauer et al., 2013). Cea mai bună ipoteză a fost aleasă pentru screening-ul inhibitorilor specifici ai PDE10A. Baza de date ZINC a fost utilizată cu o constrângere MRSD de 0,7; 10 limite rotative și greutate moleculară între 100-500 Daltoni. Structurile rezultate au fost reprezentate într-un tabel împreună cu IC_{50} prognozat (nM). Scorul vectorului de fază a fost utilizat pentru evaluarea liganzilor (Murugesan et al., 2014).

II.6.5.3 Rezultate

Ipoteza farmacoforului (figura 1) recuperată de către Prism, selectată după clasarea celor 12 ipoteze rezultate, a fost ARRRH 67. Caracterile farmacofere sunt: A1 x -1,40; y 2,12; z -2,79; R7 x -2,79; y 2,37; z -0,68; R8 x 0,55; y -1,33; z 1,37; R10 x 1,36, y -2,73, z 3,04; H4 x 1,11; y -3,19; z 5,80. Liganzii utilizați sunt prezentați în tabelul 1.

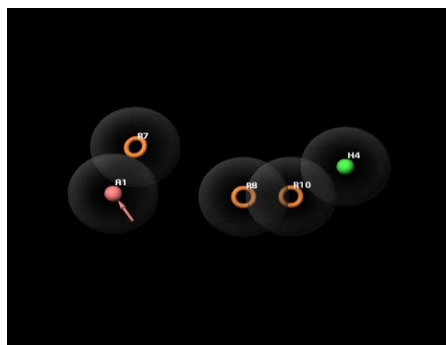
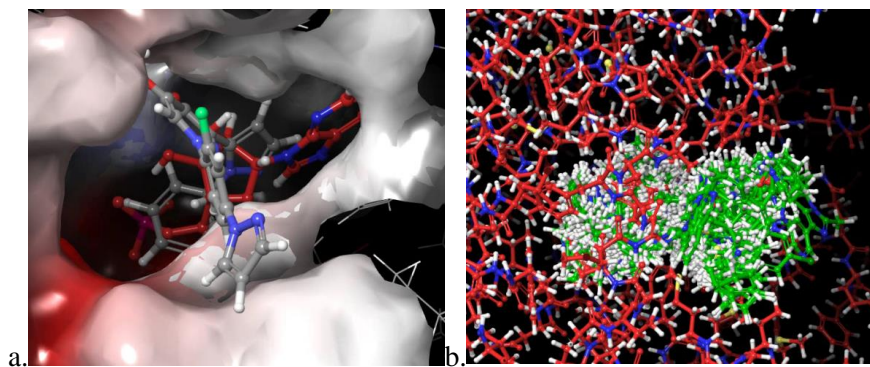


Figura 1. A1 acceptor de H, H4 verde grup hidrofob, R inel grup aromatic

Procedura de andocare a avut succes. Nici unul dintre compuși nu a fost scos în afara buzunarului de legare (vezi figura). O andocare a fost suprapusă pe modelul cristalografic al PDE10A (PDB id 2OUN) în complex cu AMP, care a confirmat fiabilitatea pozițiilor (a se vedea figura).



a. PDE10A buzunar de legare care conține AMP (roșu) suprapuse cu TAK-069; b. Toți compușii din buzunarul de legare PDE10A.

II.6.5.4 Concluzii

Atât modelul QSAR, cât și farmacoforul au arătat rolul major al grupărilor HA în acțiunea biologică a ligandului ca inhibitori selectivi ai PDE10A. Modelul QSAR susține această presupunere cu o contribuție de r^2 0,7 a HA (HA, HA-HA-Max, HA-HA-Mean) la model și corelația valorilor estimate a modelului față de valorile experimentale. Descriptorii centralizării au explicat restul corelației. Farmacoforul a reluat o ipoteză în care grupul HA joacă un rol major. Studiul de andocare a evidențiat rolul interacțiunilor Pi-Pi cu Phe 696.

II.6.6 Explorarea bioactivității - spațiul toxicității

Un studiu teoretic de toxicitate asupra unor macromolecule biologice “prietenose”

II.6.6.1 Introducere

Polietilenaimina (PEI) și poliamidoamina (PAMAM) sunt utilizate pe scară largă în domeniul precum biochimia, biotehnologia și nanotehnologia. Aceste molecule, prin administrarea intravenoasă vin în contact cu sisteme biologice sau cu organisme întregi. Proprietățile ADME ale acestora, toxicitatea și reactivitatea sunt testate pe scară largă. Astfel de molecule sunt subiecți de funcționalizare și derivatizare.

Toxicitatea și reactivitatea compușilor congenerici pot fi determinate prin metode computaționale, cum ar fi QSAR. În acest studiu, modele de toxicitate bazate pe QSAR și screening-ul virtual al toxicității (vHTTS) se aplică pe unii (noi) dendrimeri sintetizați de generație zero pentru a evalua toxicitatea acestora. Mai mulți dendrimeri "ZAC" de miez de generație zero,

sintetizați în laborator, au fost studiați în mod computațional pentru evaluarea toxicității. Sinteza chimică a dendrimerilor a fost realizată utilizând trei derivați diferiți de bromometilbenzen ca miez aromatic și dialcanolamine ca unități de ramificare cu lungimea lanțului de carbon diferită. Datorită prezenței grupărilor multiple de hidroxil la periferia dendrimerilor, acești compuși au arătat

II.6.6.2 Metode computaționale

Dendrimerii ZAC studiați au fost sintetizați chimic conform procedurii din literatură, descrisă de Füstös et al. 1,4-bis (bromometil) benzen, 1,3,5-tris (bromometil) benzen și 1,3,5-tris (bromometil) -2,4,6-trimetilbenzen au fost utilizați ca miez aromatic. Derivatizarea a fost efectuată cu dietanolamină disponibilă comercial (DEA) și dipropanolamină preparată "ad-hoc", dibutanolamină și dipentanolamină.

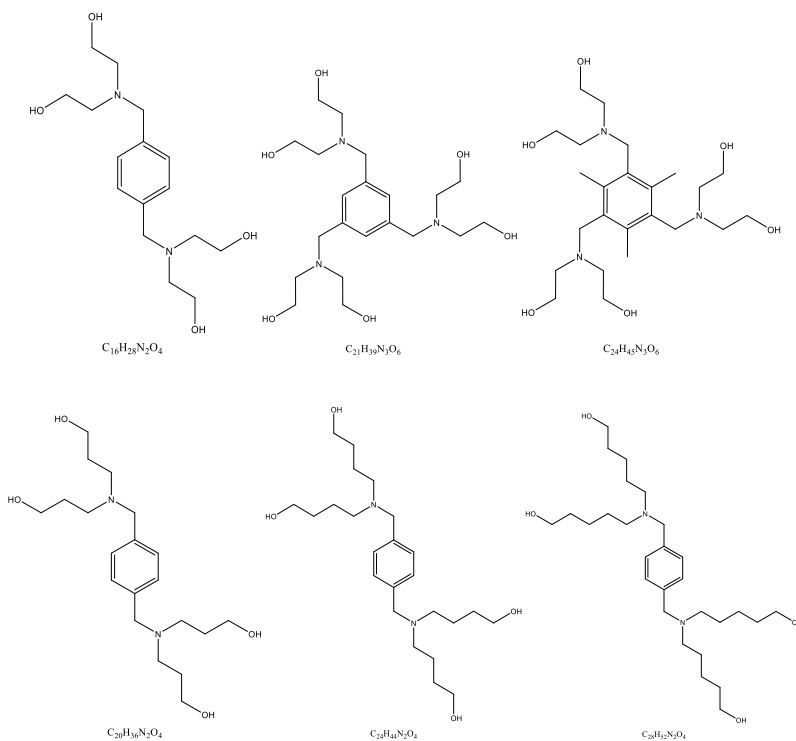


Figura 1. Dendrimeri ZAC sintetizați pentru vHTTS.

pe G0, G1, C16H28N2O4 și C20H36N2O4.

II.6.6.3 Rezultate

Proprietățile PAMAM și PEI au fost analizate. Figura 2 ilustrează spațiul proprietății QSAR (Hansch et al., 2004). Formele chimice ale spațiului sunt relativ identice pentru toate dendrimerii PEI, PAMAM și ZAC.

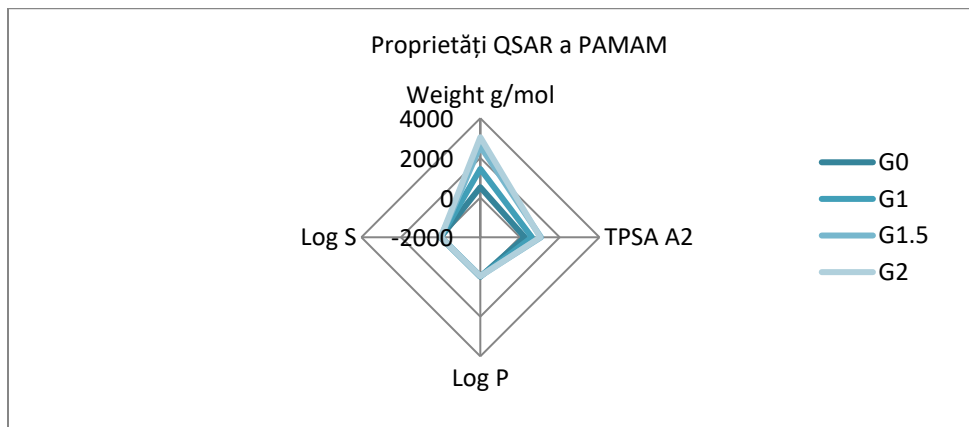
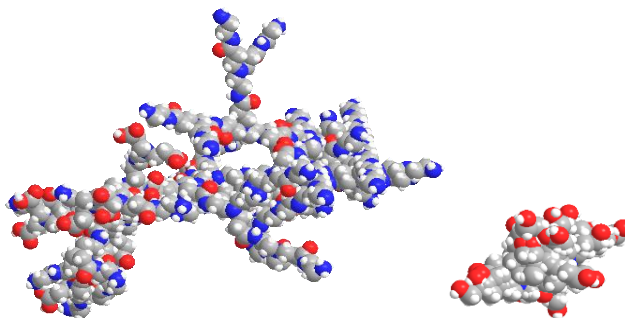


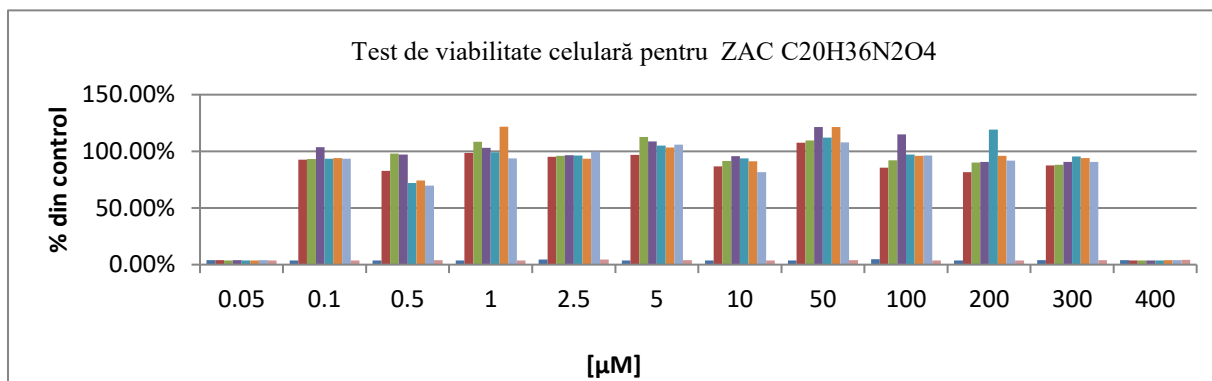
Figura 2. Proprietăți QSAR ale dendrimerilor PAMAM / PEI și ZAC.

PAMAM și PEI analizate pentru efectul genotoxic și carcinogenic s-au dovedit a nu avea un astfel de efect. Testul Ames a fost negativ pentru toți compușii (efectuat pe *S. typhimurium*). Testul de biodegradabilitate al structurii a arătat pentru toți compușii o substanță chimică persistentă din clasa 2 (amină terțiară). Testele pentru C 450 au arătat pentru PAMAM N-dealchilarea și N-oxidarea. Analiza in vitro a micronucleului a arătat o cale de acceptor de H clasă 1 pentru seria PAMAM. Un model de regresie liniară multiplă a fost calculat utilizând PEI și PAMAM. Farmacoforii calculați sunt arătați în figura 3.

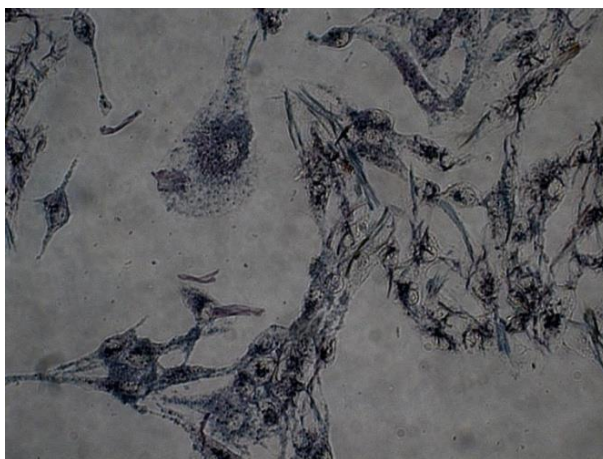


Structurile farmacoforilor de la stânga la dreapta: PEI / PAMAM și farmacoforul ZAC

Datele arată că dendrimerii ZAC sunt mai puțin recomandați decât compușii PAMAM / PEI. Testul de toxicitate efectuat pe G0, G1, C16H28N2O4 și C20H36N2O4 nu a arătat toxicitate. Toate celulele de cultură au fost viabile. Mai mult, s-a observat că ZAC a arătat și aport intracelular fără a prezenta nici un efect toxic.



Analiza viabilității celulare care arată o linie celulară neafectată de concentrațiile crescute de C20H36N2O4.



Celule viabile (albastru colorat) în mediu care conține ZAC.

II.6.6.4 Concluzii

PEI și PAMAM nu au reactivitate chimică în organism și nici proprietăți genotoxice și citotoxice. Toți compușii sunt chimici persistenti din clasa 2 (amină terțiară) și sunt excretați așa cum sunt. Testele pentru C 450 au arătat pentru reacțiile de N-dealchilare și N-oxidare PAMAM posibile interacțiuni cu medicamentele metabolizate de același citocrom P450. " In vitro " testul micronucleului computațional a arătat o cale de acceptare a H-receptorului 3 H-clasa 1 pentru seria PAMAM care exprimă interacțiunea sa potențială cu materialul genetic. Dendrimerii ZAC sintetizați sunt de 1000 de ori mai puternice decât PAMAM / PEI în ceea ce privește doza și doza

zilnică de administrare, așa cum a fost prevăzut de modelul QSAR, care a arătat o scădere a dozelor dendrimerilor ZAC comparativ cu PEI și PAMAM. Spațiul chimic al proprietăților QSAR ale modelului și al compușilor ZAC (vezi figura 2) are aceeași formă și, astfel, prezicerea modelului este probabil corectă. Mai mult, prin proprietățile topologice calculate ale ambilor farmacofori, s-a sugerat o ușoară suprapunere a farmacoforului de formare (PAMAM / PEI) și a farmacoforului dendrimerilor ZAC.

II.6.7 Explorarea spațiului de bioactivitate - activitate antimicrobiană

Proteina de legare a penicilinei în mecanismul de rezistență la *Staphylococcus aureus*

II.6.7.1 Introducere

Din anul 1961 a apărut *Staphylococcus aureus* rezistent la meticilină (MRSA). Prezența legării de proteină penicilină: proteina 2A (PBP2A) este responsabilă pentru rezistența la antibiotic a MRSA-ului. În prezent, medicația de alegere pentru tratamentul infecțiilor cu MRSA sunt Vancomicina, Daptomicina, Ceftarolina și Linezolidul. Chiar și în cazul utilizării controlate, au apărut tulpini care prezintă sensibilitate redusă sau rezistență directă la aceste medicamente (Stapleton și Taylor, 2002). Oxacilina este o β -lactamină rezistentă la penicilinază. Deoarece este rezistentă la enzimele penicilinazei, cum ar fi cea produsă de *Staphylococcus aureus*, este utilizată pe scară largă clinic în SUA pentru a trata infecția cu *Staphylococcus aureus* rezistent la penicilină (Lowy, 2003). Cu toate acestea, odată cu introducerea și utilizarea pe scară largă atât oxacilină și cât și a meticilinei, tulpinile de *Staphylococcus aureus* rezistente la antibiotice sunt MRSA / ORSA (rezistente la meticilină și/ sau oxacilina) și au devenit din ce în ce mai răspândite în întreaga lume. MRSA / ORSA este tratat folosind vancomicină. În acest studiu a fost luat în considerare ORSA. Sensibilitatea la antibiotice a fost efectuată prin metoda de difuzie a discului Kirby-Bauer și prin determinarea

II.6.7.2 Metode experimentale

Sensibilitatea la antibiotice a tulpinilor de *S. aureus* a fost efectuată utilizând metoda de difuziune a discului Kirby-Bauer. Toate izolatele au fost testate utilizând difuzia de disc cu cefotoxină (Cefotoxin 30 μ g / disc) și metodele MIC de oxacilină (1 μ g / disc). Criteriile interpretative (în μ g / ml) pentru Oxacilina MIC conform CLSI au fost: ≤ 2 (μ g / ml) susceptibile

la sensibilitate la oxacilină - MSSA; 2-4 mg / ml intermediar N / AB puncte reversibile; ≥ 4 (μg / ml) rezistente la oxacilina MRSA.

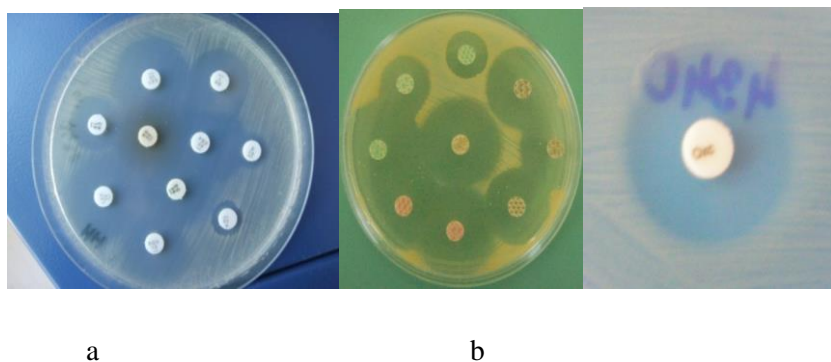
II.6.7.3 Metode computaționale

Complexele de oxacilină cu PBP 1,2a, 3,4 au fost analizate comparativ. Complexele au fost obținute prin andocare folosind Autodock. O analiză conformațională a regiunii alosterice a fost efectuată prin introducerea mișcării regiunii în jurul valorii de O4414 (prin ștergerea lui O4104 și O44145). A fost obținută o diagramă a energiei conformației (Kcal / mol). Recunoașterea moleculară este tratată aici precum cantitatea de apă deplasată de ligand (Oxacilin). S-au studiat situsurile de legare ale tuturor celor patru tipuri de PBP potențial găsite în *S. aureus*. Pentru fiecare tip de PBP s-au analizat 6 situsuri de legare. Punctele de legare au fost tratate ca cavități. Fiecare cavitate a fost populată cu un număr maxim de molecule de apă în ceea ce privește caracteristicile fluidului (adică număr / unitate volum / moleculă apă a fost respectată) pentru a imita inundarea fiecărei cavități cu apă. Clusterelor de apă rezultate au fost analizate în continuare. Un studiu de dinamică moleculară (MD) a fost realizat pe PBP2a, pentru a explica caracteristicile site-ului obligatorii. Clusterelor au fost minimizezate folosind Amber 10 câmp de forță, moleculele de apă au fost considerate rigide, RMS a fost setată la $0.1 \text{ kcal / mol / \AA}^2$. MD a fost efectuat după protonarea clusterilor la 320°K , pH 7,4 și o concentrație de sare de 0,0154 M. Această etapă a fost necesară pentru ca atomii să se clusteze și să se orienteze corect fiecare moleculă de apă. Ținta de temperatură pentru MD a fost setată la 320° K , cu un punct de pornire de $320,15^\circ \text{ K}$, și s-a folosit același parametru cu aceeași parametrizare. Ecuația de mișcare utilizată a fost (Noise-Poincare-Andresen) cu un punct de echilibru echivalent de 250 iterații și un timp de eșantion de 0,5 picosecunde. Moleculele de apă au fost considerate flexibile, iar pasul de timp a fost ales 0,001 NPA cu 57 de pași. Aceste procedee au fost utilizate pentru a obține 57 de clusterelor de apă corespunzătoare MIC-urilor observate. Teoretic pentru fiecare MIC trebuie să existe un exponent în termeni de clusterelor. În fiecare etapă numărul de clusterelor diferă.

În scopul de a stabili o corespondență între MIC și proprietățile clusterului de apă, s-au normalizat în acest fel pentru obținerea unei distribuții Gauss. A fost calculată o regresie multiplă având ca variabilă țintă MIC și folosind ca variabile dependente datele derivate de la MD. În continuare se corelează MIC-urile observate experimental cu caracteristicile grupurilor de apă. Pentru fiecare grupă de cluster de apă au fost calculate următoarele proprietăți (în fiecare pas MD

calculat rezulta mai multe linii de cluster) de energie internă (Kcal / mol), presiune (Pa), temperatură (K), energie solvatare (E_{sol} kcal / mol), energie liberă (E_{nb} kcal / mol), suprafața polară totală (ASAP), globularitatea, diferența absolută a suprafeței (DASA), diferența absolută în zona de sarcină ponderată (DCASA), (ASA), suprafața accesibilă (ASA +), suprafața accesibilă negativă (ASA -), componenta principală 1 a valorilor energetice interne (PCA1 (U)), numărul clusterelor de apă (Cluster (U)), globularitatea moleculară. De asemenea, a fost luată în considerare interacțiunea dintre variabile. Interacțiunile au fost generate ca multiplicare a două variabile: Cluster (U) * Cluster (U), Cluster (U) * PCA1 (U), Cluster (U) * U, PCA1 (U) * PCA1 (U), P * P, U * U. Pentru a identifica corelația între toate variabilele, corelația multiplă MIC a fost utilizată. A fost construit un model de regresie pentru a valida corelația obținută.

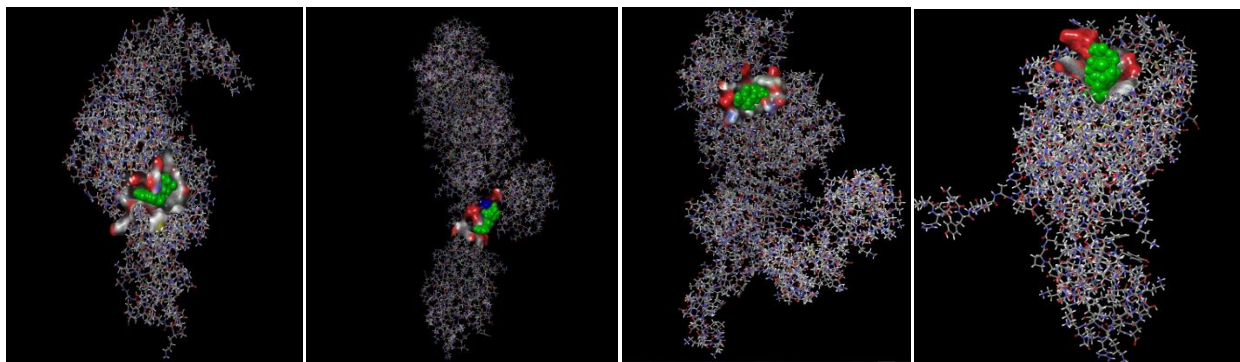
II.6.7.3 Rezultate



De la stânga la dreapta a.b. S.aureus tulpina MIC lui. c. MIC de Oxacilină pentru S. aureus tulpini MIC - concentrațiile minime inhibitoare.

MIC-urile de Oxacilină ale tulpinilor studiate au variat de la (I) 0,38-2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ pentru 21 tulpini (44,68%) identificate ca MSSA; (II) 2-4 mg / ml pentru 1 estină (2,13%) identificată ca S. aureus rezistent la meticilină la limită (BL MRSA); (III) $\geq 4 \mu\text{g} / \text{ml}$ pentru 25 tulpini (53,2%) identificate ca MRSA.

Rezultatele oxacilinei andocate cu fiecare tip de PBP sunt arătate în figura 4. Se observă că PBP2a are cea mai mare cavitate în ceea ce privește volumul, dar și cel mai adânc site "care nu este accesibil pentru ligand".



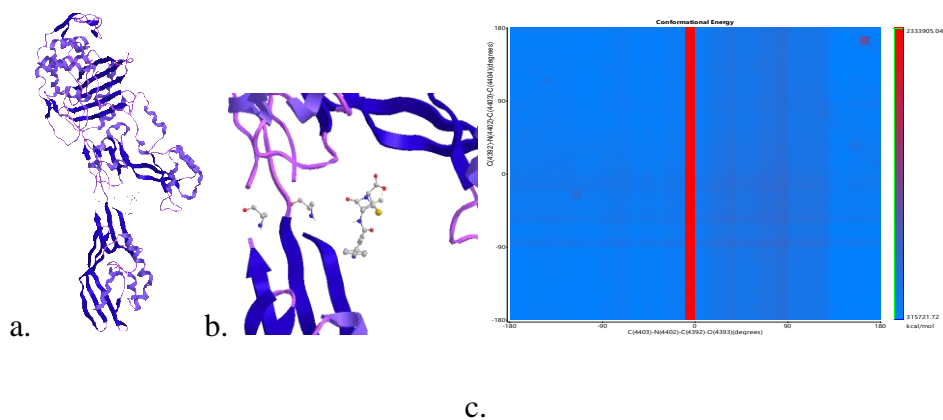
Oxacilina în complex cu PBP 1,2a, 3,4 de la stânga la dreapta. Oxacilina este prezentată în verde.

Analiza cavității unei unități unice (unitatea A a fost aleasă) a fiecărui PBP 1,2a, 3 și respectiv 4 au prezentat legarea Oxacilinei preferențial la nivelul cavității 1, care are cel mai mare volum.

Principalele cavități pentru PBP *S. aureus* reprezentate ca grupuri de apă sunt prezentate în cele ce urmează.

Datele de dinamică moleculară au arătat că sunt puternic corelate cu valorile MIC. Mai multe analize de regresie liniară au arătat următoarele:

Mai mult, un studiu conformational efectuat pe PBP2a prin mobilizarea buclei responsabile de rezistența la Oxacilina, a evidențiat o hartă a energiei conformaționale, hartă împărțită în două domenii: un domeniu larg avantajos din punct de vedere energetic (albastru) și un domeniu de energie conformațional nefavorabil (roșu).



Proteina de legare a peniclinei în complex cu Oxacilina-imagine de ansamblu(a) și detaliu(b).Harta energetică conformă a regiunii alosterice a PBP2a(c).

II.6.7.4 Concluzii

Studiul de dinamică moleculară și regresia liniară multiplă explică, folosind un grup de modele de apă, mecanismul de acțiune al Oxacilinei pe *S. aureus* și, în consecință, rezistența acestuia. Aceste rezultate se corelează cu datele experimentale. Modelul calculat a arătat un $r^2 = 0,9119$.

Concluzii generale

Spațiul topologic al bioactivității este format în jurul procesului de recunoaștere moleculară. Spațiul de bioactivitate este reglementat prin spațiul ligand și receptorul chimic. Aplicarea virtuală în întregime a spațiului de bioactivitate a unui anumit complex bioactiv, înseamnă că ligandul va avea 100% specificitate și selectivitate pentru receptor. Mai mult decât atât, concluzia complementară este că situsul activ al receptorului cavității va "reacționa" numai la acest ligand unic specific și nu vor exista alte situsuri de legare pentru alte molecule pentru ligandul respectiv. Mai departe, în legătură cu aceste presupuneri ipotetice, efectul biologic al unui astfel de complex format pe țesutul viu va fi precis localizat, foarte specific și permanent; țesutul implicat nu va arăta nici o "saturație" a complexului.

Conceptul recunoașterii moleculare a fost dezvoltat în 1990 din punctul de vedere al ligandului „Zauberkuigel” - glonțul magic (Heynick, 2009). Aceasta a fost principala paradigmă utilizată în proiectarea și descoperirea moleculelor terapeutice. De-a lungul anilor, acest concept a fost schimbat în "magic metil" atunci când s-au dezvoltat abordările QSAR / QSPR. În ultimele decenii acest concept de modelare a spațiului de bioactivitate al ligandului a evoluat. Ligandul este acum privit ca un complex care va interacționa cu ținta lui.

În ultimul an s-au făcut progrese în proiectarea dispozitivelor moleculare - nano dispozitive care sunt compuse dintr-o secțiune de recunoaștere a țintei (de obicei anticorp specific), un element activ (enzimă, ligand propriu) și un purtător (particulă nano), părți într-un dispozitiv bio nano activ. Aceste mașini complicate sunt construite în scopul accesării spațiului de bioactivitate exclusiv din punct de vedere al ligandului. Contrar rezultatelor așteptate care cresc specificitatea ligandului pentru ținta sa până la un anumit prag, rezultă creșterea efectelor adverse. Clonidina este un astfel de exemplu. Molecula este prototipul agonistului "perfect" pentru agonistul α_2 adrenergic (Cristea, Medical Publishing, 2012). Așa cum este prezentat în capitolele 1 și 2 (contribuții originale), atât ligandul, cât și receptorul pot accesa spațiul de bioactivitate. În esență, ligandul poate modela cavitatea receptorului și așa cum se arată în cazul

enzimei FAD, fragmentul de aminoacizi din jurul FAD determină funcția complexă. În consecință, spațiul total de bioactivitate (absolut) pentru a avea o "bioactivitate" perfectă, trebuie să fie accesat simultan de ambele componente (ligand și receptor). În condiții fiziologice reale, spațiul de bioactivitate nu este în întregime accesibil. Forma bioactivității seamănă cu un spațiu topologic format atât de ligand cât și de receptor. Prin urmare, acest spațiu nu este un homeomorf cu spațiul cavității principale a receptorului (locul de legare). Este o intersecție a interacțiunilor. Așa cum se arată în capitolul patru, această suprafață topologică a bioactivității poate fi reprezentată de suprafața topologică generată folosind coordonatele carteziane ale liganzilor. După cum se așteaptă ca receptorii de suprafață să aibă un efect riguros de modelare, ei trebuie luați în considerare. Cunoscând topologia bioactivității, orice proprietate în legătură cu aceasta poate fi prezisă.

În capitolul trei, o mică parte a spațiului de bioactivitate, și anume spațiul conformațional, este prezentată ca fiind utilizată în prezicerea potenței unui anumit ligand. Capitolul patru utilizează descriptorii suprafeței de bioactivitate pentru o predicție exactă a bioactivității care se corelează cu datele experimentale.

Recent, optimizarea receptorului este luată în considerare pentru a maximiza accesibilitatea spațiului bioactiv. Din cauza imposibilității tehnice de a modela toți receptorii, această optimizare tinde să fie proiectată pe ligandul însuși. Deci, un ligand de ultimă oră trebuie să acceseze nu doar spațiul de bioactivitate, ci și spațiul receptorului. În mod remarcabil în termeni absoluți, ligandul "perfect" ca medicament trebuie să aibă capacitatea de a accesa și spațiul de bioactivitate al receptorilor.

Astfel de tehnici experimentale sau computaționale de explorare a spațiului de bioactivitate al receptorilor sunt modelarea omologiei și pliarea proteinei așa cum este tratată în capitolul cinci. După cum s-a demonstrat în capitolul patru, coordonatele carteziane pot fi folosite pentru a localiza coordonatele bioactivității și anume pentru a descrie locația acesteia.

Pe ambele molecule există regiuni privilegiate cu coordonate carteziane cunoscute, care sunt cruciale în accesarea spațiului de bioactivitate. În cazul ligandului, aceste regiuni sunt situate la nivelul grupurilor de acceptare / donoare de H, regiunile inelului aromatic, regiunile hidrofobe, heteroatomii. La nivelul receptorului, acel punct este localizat la aminoacizii care se leagă cu ligandul, la motivele de aminoacizi. Aceste puncte (regiuni) cu poziție cunoscută sunt folosite pentru a dezvolta ipoteza cu privire la o anumită proprietate a moleculei (ligand, receptor). Aceste ipoteze sunt folosite pentru a construi farmacoforii (construcții virtuale care sunt probabil instrumente "perfecte" în accesarea spațiului de bioactivitate). Luând în considerare în ultimul timp reciprocitatea topologiei bioactivității, astfel de

construcții sunt disponibile pentru receptorul însuși, algoritmul de construcție a farmacoforului folosind forma suprafeței de legare a unui anumit ligand al receptorului este deja implementat.

Topologia bioactivității este transpusă în lumea reală prin utilizarea metodologiei QSAR / QSPR care permite, așa cum se arată în capitolul șase, explorarea rațională a spațiului bioactivității topologice și explică conceptul de bază al QSAR conform căruia molecule similare au bioactivități similare. Exemple excelente sunt date de Patany și Brown (Patany, 1996 și Brown, Wiley, 2012) în recenziile privind bioizosterismul.

Explorarea spațiului de bioactivitate poate fi efectuată utilizând metode computaționale sau experimentale. Frecvent aceste metode sunt combinate, așa cum se arată în capitolul șase unde toxicitatea și activitatea antimicrobiană este explorată, pentru îmbunătățirea topologiei imaginii bioactivității.

Problema fundamentală este de a defini o mică diferență la nivel molecular - și de a evita paradoxul SAR acela că „nu toate moleculele similare au activități similare” (Chen et al., 2013). Paradoxul ar putea fi rezolvat prin utilizarea suprafeței topologice (inclusiv ligand și receptor) ca un instrument pentru definirea recunoașterii moleculare și predicția unei anumite proprietăți topologice (topologie bioactivitate).

În cele din urmă, se desprind următoarele concluzii:

1. Adaptabilitatea ligandului este un pas cheie în recunoașterea moleculară. Adaptabilitatea depinde de structura ligandului. Liganzii linari sunt favorizați comparativ cu liganzii ramificați.
2. Porțiunea de aminoacid are o funcție cheie într-o funcție complexă activă. Variația fragmentului în jurul aceluiași ligand determină proprietăți enzimactice diferite. Funcția GOx este dependentă de temperatură și de pH.
3. Energia conformațională (a ligandul) este un factor-cheie în prezicerea conformării obligatorii și a potenței unui ligand. Dinamica moleculară bazată pe clustere este un instrument valoros în evaluarea potenței unei conformații bazate pe un algoritm de notare.
4. Coordonatele carteziene pot fi utilizate pentru a genera o suprafață topologică a unui complex ligand-receptor. Discriminantul polinomial și operatorul Laplacian sunt predictorii buni ai bioactivității.
5. Plierea proteinei are un rol cheie în recunoașterea moleculară. Nanostructurile interacționează cu bioactivitatea enzimelor prin modificarea capacității de pliere și consecutiv a fragmentului de aminoacizi.
6. QSAR / QSPR sunt un instrument prețios în proiectarea moleculară.

7. Regresia liniară multiplă este o metodologie relevantă în explorarea spațiului de bioactivitate al derivaților de oxobutan benzamidă.
8. Rețelele neuronale artificiale au prezis cu acuratețe bioactivitatea inhibitorilor de urokinază.
9. Metodele de regresie pot fi utilizate în procesul de exploatare a "medicamentului". Aceste metode utilizate au arătat noi compuși cu rol inhibitor potențial, CDK2 și PDE10A.
10. Metodele bazate pe activitatea de structură utilizate ca instrumente de predicție, au fost validate prin rezultatele experimentale în cazul PEI / PAMAM în care, atât metodele computaționale cât și cele experimentale, au arătat că polimerii nu prezintă toxicitate.
11. Descriptorii moleculari , topologici și energetici, au ajutat la optimizarea proprietăților ADN ale liganzilor "intercalari de ADN".
12. Simularea dinamică moleculară, combinată cu studiile de andocare și rezultatele experimentale, a explicat cu succes mecanismul de rezistență al S. aureus. Modelul de regresie multiplu utilizat a stabilit o corelație între grupurile de apă de legare a locului și MIC al Oxacilinei.

Lista de publicații

O parte din rezultatele prezentate în această teză fac obiectul mai multor articole de cercetare, iar o parte dintre rezultate au fost expuse la conferințe internaționale sub formă de comunicări sau postere.

Publicații:

1. **Lungu CN.**, Bratanovici BI., Antoci GM., Mangalagiu II., Hybrid imidazole-pyridine derivatives: an approach to novel anticancer DNA intercalators. *Curr. Med. Chem.* 2018, doi 10.2174/0929867326666181220094229
2. **Lungu C N.**, Diudea M V., Putz M V., Grudziński I P., Linear and Branched PEIs (Polyethylenimines) and Their Property Space. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 555. doi 10.3390/ijms17040555

3. **Lungu C N.**, Diudea M V., Putz M V., Ligand Shaping in Induced Fit Docking of MraY Inhibitors. Polynomial Discriminant and Laplacian Operator as Biological Activity Descriptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1377., doi :10.3390/ijms18071377
4. **Lungu C N.**, Diudea M V., Binding site and potency prediction of Teixobactin and other Lipid II ligands by statistical base scoring of conformational space maps, *CCADD* **2018**, *14* (1): 29-34. doi: 10.2174/1573409913666170927113813
5. **Lungu CN.**, C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 3 INHIBITORS: BIOACTIVITY PREDICTION USING LOCAL VERTEX INVARIANTS BASED ON THERMAL CONDUCTIVITY LAYER MATRIX. *Studia UBB Chemia.* **2018.**, *63*(1):177-188., doi10.24193/subbchem.2018.1.13
6. **Lungu CN.**, Ersali S., Szeffler B., Moldovan AP., Basak SC., Diudea MV. DIMENSIONALITY OF BIG DATA SETS EXPLORED BY CLUJ DESCRIPTORS. *Sudia UBB Chemia.***2017**, *62*(3): 197-204., doi: 10.24193/subbchem.2017.3.16
7. **Lungu CN.**, Paisz C., Füstös ME.,Orza A., Diudea VM., Grudzinski IP., A PREDICTIVE TOXICITY STUDY OF peiS, PAMAMA AND ZAC DENDRIMERS. *Studia UBB Chemia.* **2019**, *64* (2):499-508., doi: 10.24193/subbchem.2019.2.42
8. Majumdar S., Basak CS., **Lungu CN.**, Diudea MV., Grunwald D., Finding needles in a haystack: determining key molecular descriptors associated with the blood-brain barrier entry of chemical compounds using machine learning. *Mol. Inform.* **2019**, doi: 10.1002/minf.201800164.
9. Majumdar S, Basak SC, **Lungu CN.**, Diudea MV., Grunwald GD. Mathematical structural descriptors and mutagenicity assessment: a study with congeneric and diverse datasets. *SAR QSAR Environ. Res.* **2018**, *29*(8):579-590., doi: 10.1080/1062936X.2018.1496475
10. Diudea MV., **Lungu CN.**, Nagy CL. Cube-rhombellane related bioactive structures. *Molecules.* **2018**, *23*(10) E2533., doi: 10.3390/molecules23102533

Referințe

1. Carlson A H., McCammon A J., (1999), Accomodating protein flexibility in computational drug design, *Molecular Pharamacology* 57: 213-218
2. Berg J M., Tymoczko L J., Lubert Stryer L., (2002), *Biochemistry* 5th edition, New York, W.H.Freeman, ISBN-10:0-7167-3051-0
3. Atkins P., De Paula J., (2006). *Atkins' Physical Chemistry* (8th ed.). W. H. Freeman.:200–202.
4. Lo K M., Tilgner M., Shi P-Y.,(2003), Potential High-Throughput Assay for Screening Inhibitors of West Nile Virus Replication, *J Virol.* 77(23): 12901–12906.
5. Nantasenamat C., Isarankura-Na-Ayudhya C., Naenna T., Prachayasittikul V., (2009), A practical overview of quantitative structure-activity relationship". *Excli J.* 8: 74–88.
6. Todeschini R., Gramatica P., (1998), New 3D Molecular Descriptors: The WHIM and QSAR Applications. *Perspectives in Drug Discovery and Design.* 9-11, 355-380.
7. Mukherjee S., Zhang Y.,(2011), Protein-protein complex structure predictions by multimeric threading and template recombination, *Structure.* 13; 19(7): 955–966.
8. Diudea M V., (1997a) Cluj matrix invariants. *J Chem. Inf Comput Sci* 37:300-305
9. Diudea M V., Florescu M S., Khadikar P V., (2006), *Molecular Topology and Its Applications*, Eficon, Bucharest
10. Leskovic V., Trivić S., Wohlfahrt G., Kandrac J., Pericin D., (2005), *Int J Biochem Cell Biol* 37(4):731-50.
11. Metzler D E., Metzler C M., Sauke D J.,(2003), *Biochemistry*, Academic Press, ISBN 978-0-12—492541-0
12. Henrichfreise B., Schiefer A., Schneider T., (2009), Functional conservation of the lipid II biosynthesis pathway in the cell wall-less bacteria Chlamydia and Wolbachia: why is lipid II needed., *Mol Microbiol.* 73 (5): 913–23.
13. Gualerzi O., Brandi L., Fabbretti A., Pon L C., *Antibiotics Targets, Mechanism and Resistance* Claudio, ISBN: 978-3-527-33305-9 Wiley: 137
14. Kang E S., Ford K., Grokulsky G., Wang Y B., Chiang T M., Acchiardo S R., (2000), Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins, *J Lab Clin Med.* 135(6):444-51.