

تطبيق طرق النمذجة الجزيئية في تصميم مثبطات محتملة لأنزيم HIV-1 Protease

د. فائق الشب *، علي الشيخ **، مايا رجب ***

* (كلية الصيدلة، جامعة المنارة، البريد الإلكتروني: faten.alchab@manara.edu.sy)** (كلية الصيدلة، جامعة المنارة، البريد الإلكتروني: alialshekh748@gmail.com)*** (كلية الصيدلة، جامعة المنارة، البريد الإلكتروني: mayarajab52@gmail.com)

الملخص

يعد مرض عوز المناعة المكتسب (AIDS) الذي يسببه فيروس عوز المناعة البشري (HIV) من أكثر الأمراض انتشاراً وخطورة في العالم، حيث يقدر حدوث نحو 85 مليون إصابة و 40 مليون وفاة عالمياً منذ اكتشافه عام 1981م. تمثل الإصابات بالنمط (HIV-1) حوالي 90% من إجمالي الإصابات حول العالم. تم بذل جهود مكثفة لمكافحة هذا الوباء الخطير، وعلى رأسها الأدوية المضادة للفيروسات القهقرية (ART) مثل مثبطات أنزيمات البروتياز، ولكن تواجه هذه الأدوية العديد من العقبات أهمها المقاومة الدوائية التي تبديها الفيروسات الطافرة، التوافر الحيوي المنخفض، والتأثيرات الجانبية السامة. تهدف هذه الدراسة إلى تصميم مثبطات HIV-1 Protease تتخطى هذه العقبات بتطبيق استراتيجيات مختلفة للنمذجة الجزيئية. تم أولاً مسح قاعدة بيانات Pubchem لتحديد مركب lead بواسطة معاملات Tanimoto للتشابه الكيميائي، ومن ثم فلتر المركبات عبر عدة مراحل من دراسات الحرائك الدوائية والإرساء الجزيئي من أجل تحديد مركب Lead. أخيراً تم تطوير مركب lead الناتج عبر تغيير المتبادلات من أجل الحصول على المثبطات النهائية.

كلمات مفتاحية – داء عوز المناعة المكتسب، البروتياز، النمذجة الجزيئية، أنزيم CYP3A4، الإرساء، ADMET.

Summary

Acquired immunodeficiency disease (AIDS), caused by the human immunodeficiency virus (HIV), is one of the most widespread and dangerous diseases in the world, with an estimated 85 million infections and 40 million deaths worldwide since its discovery in 1981. HIV-1 infections represent about 90% of all infections around the world. Intense efforts have been made to combat this dangerous epidemic, most notably antiretroviral drugs (ART) such as protease enzyme inhibitors, but these drugs face many obstacles, the most important of which are drug resistance exhibited by mutant viruses, low bioavailability, and toxic side effects. This study aims to design HIV-1 Protease inhibitors that overcome these hurdles by applying different molecular modeling strategies. The Pubchem database was first scanned to identify the lead compound by Tanimoto chemical similarity coefficients, and then the compounds were filtered through several stages of pharmacokinetic and molecular docking studies in order to identify the lead compound. Finally, the resulting lead compound was developed by changing the reciprocals in order to obtain the final inhibitors.

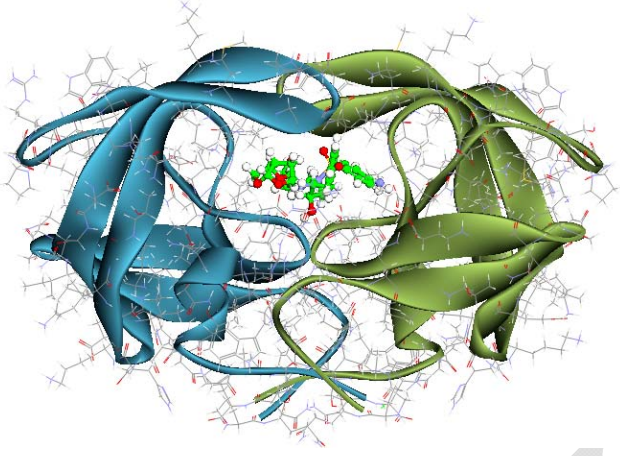
Keywords - acquired immunodeficiency disease, protease, molecular modeling, CYP3A4 enzyme, docking, ADMET.

1. المقدمة:

51.3 مليون شخص بسبب المضاعفات المرتبطة به، بالإضافة إلى وجود بين 33.1 و 45.7 مليون شخص مصابين وذلك في نهاية عام 2022 [1]. يتواجد فيروس نقص المناعة البشرية بشكل

تقدر منظمة الصحة العالمية إصابة ما بين 65 إلى 113 مليون شخص بفيروس نقص المناعة البشرية، ووفاة ما بين 32.9 إلى

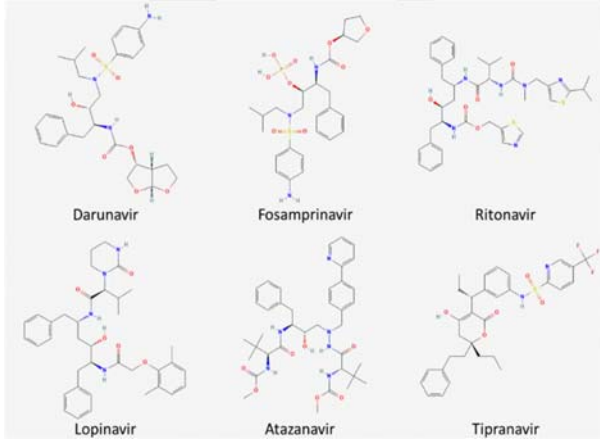
مناطق رئيسية في بنية الأنزيم البروتيني: الموقع النشط، "اللوحات" المرنة، والسطح الفاصل بين المونوميرين [9]. يبين الشكل 1 الهيكل البلوري للبروتياز.



الشكل 1: البنية البلورية لأنزيم بروتياز HIV-1 مرتبط بالمركب الدوائي Darunavir (PDB: 2IEN)

b. مثبطات البروتياز (PIs): Protease Inhibitors

تعمل PIs من خلال التثبيط التنافسي لبروتياز فيروس نقص المناعة البشرية عن طريق الارتباط بثمالات الموقع الفعال [10]. تمت الموافقة على العديد من PIs لعلاج عدوى فيروس نقص المناعة البشرية مثل Atazanavir و Darunavir (الشكل 2).



الشكل 2: البنى الكيميائية لبعض مثبطات البروتياز الحاصلة على موافقة الـ FDA

نمطين رئيسيين، الأول HIV-1 هو الأكثر ضراوة وانتشاراً ويشكل نحو 90% من الإصابات المسجلة. أما النوع الثاني HIV-2 فهو أقل انتشاراً وقدرة على العدوى [2, 3]. تعد مضادات الفيروسات القهقرية (Antiretroviral Medication) أو ART على رأس الجهود المبذولة لمكافحة مرض الإيدز، وتتضمن هذه الأدوية مجموعة مثبطات أنزيمات البروتياز التي أثبتت نجاعتها في علاج المرض. يوجد حالياً 24 دواء فريد معتمد من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية FDA من أجل علاج الإيدز [4]. لكن للأسف تعاني هذه الأدوية من عقبات متعددة مثل المقاومة الدوائية الناتجة عن الطفرات الفيروسية، انخفاض التوافر الحيوي، نقص قدرتها على الوصول إلى المخازن الفيروسية في الجسم، والتأثيرات الجانبية السامة [5, 6].

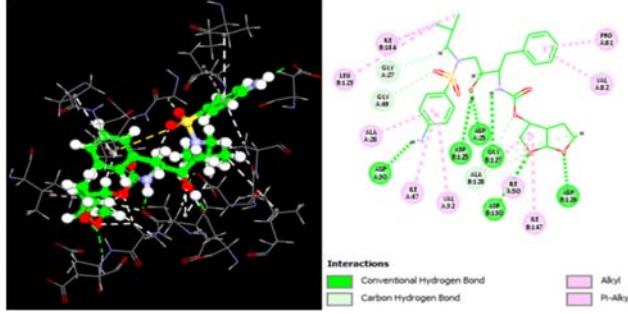
تهدف هذه الدراسة إلى تصميم أدوية جديدة فعالة مضادة للفيروسات القهقرية تتغلب على هذه العيوب باستخدام نهج النمذجة الجزيئية.

a. بروتياز فيروس عوز المناعة البشري-1 (HIV-1): Protease

كما هو الحال عند الفيروسات القهقرية الأخرى، يعد بروتياز فيروس نقص المناعة البشرية أحد الإنزيمات الثلاثة الرئيسية اللازمة لتكاثر الفيروس، حيث يعمل جنباً إلى جنب مع أنزيمي Reverse Transcriptase و Integrase وأنزيم النسخ العكسي. يلعب البروتياز دوراً مفصلياً في إنتاج الفيروسات الناضجة المعدية [5]. وهو يعمل عن طريق التحلل البروتيني لسلائف عديدات الببتيد Gag و Gag-Pol لإنتاج المكونات الهيكلية للفيروسات المعدية [6-8]. وبالتالي، فإن الفئة الرئيسية من الأدوية المضادة للفيروسات القهقرية (ART) المستخدمة لعلاج عدوى فيروس نقص المناعة البشرية هي مثبطات بروتياز فيروس نقص المناعة البشرية.

أنزيم البروتياز HIV-1 هو ثنائي جزئي متجانس مكون من سلسلتين متماثلتين تتكون كل منهما من 99 حمض أميني تشكل ثمالي ASP25 و ASP125 (واحدة من كل مونومير) الموقع الفعال الرئيسي للأنزيم [6, 9]. هناك ثلاث

سلالات فيروس نقص المناعة البشرية المعروفة المقاومة لمثبطات البروتياز [13, 15].



الشكل 3: تمثيل ثنائي وثلاثي الأبعاد لتوضع دارونافير ضمن الجيب الفعال للبروتياز والتداخلات المتشكلة معه

ومع ذلك، فقد تبين أن دارونافير متورط في بعض حالات تسمم الكبد تتراوح من ارتفاع عابر غير عرضي في مستويات أنزيمات أمينوترانسفيراز المصلية، إلى التهاب كبد حاد شديد [12, 16]. سيتم تجنب هذه السمية من خلال دراسات محاكاة للحرائك الدوائية والسمية ADMET على المثبطات الجديدة مع التركيز بشكل كبير على السمية الكبدية. علاوة على ذلك، يمتلك دارونافير توافراً حيوياً منخفضاً نتيجة الاستقلاب العالي بأنزيم CYP3A4 من أنزيمات السيتوكروم الكبدية [17]، حيث تتم تفاعلات الاستقلاب هذه بواسطة جزيئة الهيم المرتبطة بالأنزيم [18, 19]، ولذلك سيتم دراسة ألفة المركبات الجديدة لهذا الأنزيم واستبعاد المركبات التي تبدي ألفة عالية وتداخلات مهمة مع جزيئة الهيم على وجه الخصوص، وذلك عن طريق مقارنة ألفة الارتباط مع CYP3A4 للمثبطات الجديدة مع تلك لدارونافير وتقاربها مع جزيئة الهيم، والتي سيتم دراستها عبر عمليات الإرساء ضمن أنزيم CYP3A4 مرتبط مع مثبط معروف لأنزيم CYP3A4 يمتلك نواة كيميائية مشابهة للدارونافير وهو ريتونافير Ritonavir، حيث بينت الدراسات قدرته على زيادة التوافر الحيوي للدارونافير بسبب إلفته العالية للارتباط مع CYP3A4 ومنع ارتباطه مع الدارونافير [18, 20]. كما ذكرنا سابقاً، فإن معظم PIs لديها قابلية اختراق BBB منخفضة، مما يتسبب في وصول كميات قليلة من الدواء إلى الجهاز العصبي المركزي، والذي قد يشكل مستودعات فيروسية

يؤدي توضع المثبط في الموقع الفعال - حيث تتداخل مجموعة الهيدروكسيل الخاصة بالمثبط بثمالات ASP25 و ASP125 - وإغلاق اللوحات إلى منع الأنزيم من الارتباط مع ركانزه وتنشيط فعاليته. تتداخل المثبطات أيضاً مع الثمالات المجاورة الأخرى مثل Gly27، Asp29، Asp30، و Gly48 [11]. لكن مع الأسف، فإن الطفرات المقاومة للأدوية تقلل من تداخلات المثبط مع البروتين من خلال آليات متعددة، مثل تغيير شكل الموقع الفعال والذي يقلل من التداخلات الكارهة للماء مع المثبط، أو إدخال ثمالات أكبر حجماً إلى الموقع الفعال مما يزيد من التنافرات الفراغية [5, 6, 11]. علاوة على ذلك، يمكن أن تعزى مقاومة الأدوية إلى التراكيز الدوائية المحدودة ضمن المستودعات الفيروسية مثل الجهاز العصبي المركزي، وذلك بسبب الاختراقية المنخفضة للحاجز الدماغي الدموي BBB [6]. إضافة إلى ذلك، تمتلك بعض المثبطات تأثيرات جانبية قد تكون خطيرة مثل الإسهال، فرط شحوم الدم، الحصى الكلوية، والتهاب الكبد [6, 12].

c. منهجية تصميم المثبطات الجديدة Work methodology:

تم اعتماد عدة استراتيجيات من أجل التغلب على التحديات المذكورة أعلاه في تصميم مثبطات فعالة ذات حرائك دوائية مناسبة، بالإضافة إلى كونها أقل تأثراً بالطفرات الفيروسية. تبين بالدراسات أن تعزيز التداخلات القوية مع الهيكل الأساسي لأنزيم البروتياز (Protein Backbone)، وبشكل خاص ثمالاتي ASP25 و ASP125، يمثل استراتيجية فعالة في التغلب على المقاومة الدوائية [13, 14]. وعلى هذا النحو، ستأخذ هذه الدراسة في عين الاعتبار ألفة الارتباط، بالإضافة إلى عدد وقوة التداخلات الإيجابية بين المثبطات المحتملة وهيكل البروتين. تم اختيار الدواء Darunavir الحاصل على موافقة FDA، وهو من الجيل الثاني من مثبطات البروتياز، كمركب مرجعي لمسح قاعدة البيانات ومركب ضبط إيجابي، حيث يرتبط دارونافير ارتباطاً قوياً بثمالاتي الموقع الفعال بالإضافة إلى الهيكل البروتيني الأساسي [13] (الشكل 3). أدى هذا إلى أن امتلاك دارونافير فعالية عالية ضد

minimization من أجل تخفيض المستوى الطاقى للبروتين إلى أدنى مستوى مناسب (عملية استرخاء للبروتين)، وذلك باستخدام حقل القوة الافتراضي CHARMM [28]، وأخيراً، تم حذف جميع جزيئات الماء.

أما بالنسبة لأنزيم CYP3A4 فقد تم استخدام البنية البلورية ذو رمز التعريف (PDB ID: 3NXU)، حيث تمتلك دقة جيدة تبلغ $2\text{\AA}$ ، وربطة متبلورة مناسبة هي ريتونافير. تم تحضير أنزيم CYP3A4 بمنهجية مشابهة لأنزيم البروتياز المذكورة أعلاه.

b. مسح قاعدة البيانات وإعداد الربائط Database :Screening and Ligand Preparation

تم اختيار دارونافير كمركب مرجعي لفحص قاعدة بيانات Pubchem [29]، وهي قاعدة بيانات مصدقة للمركبات الكيميائية تابعة لمؤسسات الصحة الأميركية تحتوي عدد كبير جداً من المركبات الكيميائية النوعية المختلفة. وتم استخدام مقياس تشابه الكيميائي Tanimoto [30] وهو مقياس تشابه يعتمد على مبدأ البصمة الكيميائية للمركبات، وذلك بعتبة تشابه تبلغ 70% للحصول على المركبات المشابهة لدارونافير. تم بعد ذلك تحضير المركبات المستردة باستخدام معالج تحضير الربائط في Discovery Studio. تمت إضافة ذرات الهيدروجين وتصحيح التكافؤ الذري، بالإضافة إلى توليد الماكبات الفراغية والحالات المتأينة ضمن مجال pH يتراوح بين (6.5 و 8.5).

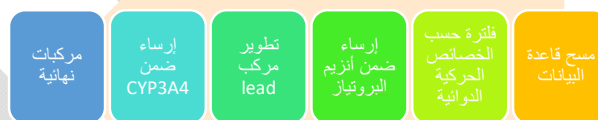
c. دراسات الحرائك الدوائية والسمية ADMET:

تم فلتر المركبات المحضرة من خلال توافقتها مع قواعد ليبينسكي الخمسة وقاعدة فيبر، حيث لم يسمح بأكثر من مخالفة واحدة. كما تم حساب المواصفات الجزيئية وواصفات ADMET للمركبات المُفلترة، والتي بدورها تم فلترتها مرة أخرى من خلال اختراقية BBB ومستويات الامتصاص المعوي والسمية الكبدية. تم الاحتفاظ فقط بالمركبات ذات اختراق BBB المتوسط أو العالي، والامتصاص المعوي المعتدل أو العالي، وعدم وجود سمية كبدية متوقعة (الجدول 1). أما بالنسبة لدراسة التوافر الحيوي، فسيتم اعتماد الألفة

[5]. اعتماداً على ذلك، ستكون قدرة المركب على اختراق الحاجز الدماغي الدموي جزءاً رئيسياً من دراسات ADMET لضمان نفاذية جيدة إلى الجهاز العصبي المركزي. بالإضافة إلى ذلك، سيتم اختبار خواص المركبات المناسبة للإعطاء الفموي بالاعتماد على قواعد ليبينسكي الخمسة وقاعدة فيبر (Lipinski's Rule of Five and Veber Rule) من أجل ضمان خصائص حركية دوائية مناسبة للإعطاء الفموي [21-24].

II. المواد والطرائق MATERIALS AND METHODS:

تم استخدام برنامج BIOVIA Discovery Studio [25] لإجراء دراسات النمذجة الجزيئية. يبين الشكل 4 مخططاً مبسطاً لمنهجية العمل.



الشكل 4: مخطط مبسط لمنهجية العمل المتبعة

a. تحضير البروتين Protein Preparation:

أولاً، تم فحص قاعدة بيانات البروتين RCSB [26, 27]، بحثاً عن البنية البلورية المناسبة لبروتياز فيروس HIV-1. تم اختيار البروتياز غير الطافر المرتبط بدارونافير ذو رمز التعريف (PDB ID: 2IEN)، لأنه يتمتع بدقة عالية تبلغ $1.3\text{\AA}$ ، ويحتوي المركب الدوائي المناسب. يجب أولاً تحضير البنية البلورية باستخدام البرمجيات المناسبة قبل استخدامها في دراسات النمذجة. لهذا الغرض، تم استخدام معالج إعداد البروتين التلقائي في Discovery Studio لإعداد البنية البلورية لـ 2IEN. تم بناء الغرى البروتينية، وإضافة ذرات الهيدروجين عند الـ pH الفيزيولوجي (7.4 = pH)، ومن ثم تم إجراء عملية

لأنزيم CYP3A4 كمقياس لتقدير قابلية الاستقلاب بواسطة، حيث سيتم اعتماد دراسات الإرساء اللاحقة لتقدير هذه الألفة.

الجدول 1: معايير تقييم معدلات اختراقية الحاجز الدماغي الدموي والامتصاص المعوي

معدل الامتصاص المعوي	معدل اختراق الحاجز الدماغي الدموي
0 (جيد)	0 (عالي جداً)
1 (متوسط)	1 (عالي)
2 (سيء)	2 (متوسط)
3 (سيء جداً)	3 (منخفض)
	4 (غير محدد)

d. الإرساء الجزيئي Molecular Docking:

تم إرساء المركبات المتبقية من خلال عملية مكونة من خطوتين. في كلتا الخطوتين، تم تحديد موقع للإرساء باستخدام الرابطة المتبلورة (دارونافير) كمركز للكرة المحددة للموقع الفعال، وتم ضبط حجم هذه الكرة بحيث تمتلك نصف قطر يساوي $11\text{\AA}$. واعتمد دارونافير كمركب ضبط إيجابي. تم بداية إجراء عملية الإرساء الأولى باستخدام بروتوكول Libdock وهو بروتوكول مسح افتراضي عالي الأداء (High-Throughput Virtual Screening) [31]، حيث يعتمد على الخواص القطبية وغير القطبية (المسماة بالنقاط الساخنة) لتحديد التداخلات بين المستقبل والرابطة، وذلك من أجل إرساء عدد كبير من المركبات في فترة زمنية قصيرة. تم بعد ذلك إخضاع المركبات التي حصلت على قيم Libdock score متشابهة أو أعلى من تلك لدارونافير إلى المرحلة الثانية من الإرساء باستخدام بروتوكول CDOCKER [32]، وهو بروتوكول إرساء أكثر دقة يعتمد على تشكيل شبكة طاقية من نقاط مختلفة الخصائص، معتمداً في ذلك على حقل القوة CHARMM، وذلك من أجل تحديد التداخلات بين المستقبل والربائط وتقييمها. ولذلك، فهو أكثر موثوقية ودقة في تحديد وتقييم تداخلات المعقد مستقبل-رابطة. يقوم بروتوكول CDOCKER بتحديد ألفة الرابطة للبروتين عن طريق حسابات تعتمد على

مجموع الطاقة الحرة للتداخلات CDOCKER ENERGY. من أجل التحقق من موثوقية عمليات الإرساء، تم إعادة إرساء دارونافير ضمن البنية البلورية للبروتين، حيث كان الانحراف المعياري النسبي الوسطي لوضع الإرساء بالنسبة إلى الوضع المتبلور هو $\text{RMSD} = 0.62\text{\AA}$ ، مما يشير إلى دقة إرساء عالية.

e. تحديد مركب رأس السلسلة Lead Determination:

تم اختيار أفضل المركبات ذات قيم إرساء CDOCKER-ENERGY ضمن الموقع الفعال للبروتينات مماثلة أو أعلى مقارنة بدارونافير، وذلك من أجل دراسة توضعها ضمن الموقع الفعال للبروتينات والتداخلات المتشكلة مع البروتين. تم استخدام معالج تحليل الوضعيات لبرنامج Discovery Studio لتحليل تداخلات مستقبل-رابطة بشكل أفضل، ومن ثم تم اختيار المركب الذي شكل أكبر عدد من الروابط القوية مع شمالات الموقع الفعال بالإضافة إلى ألفة عالية للبروتين، من أجل استخدامه كمركب lead الذي سيتم استخدامه لتصميم مثبطات جديدة.

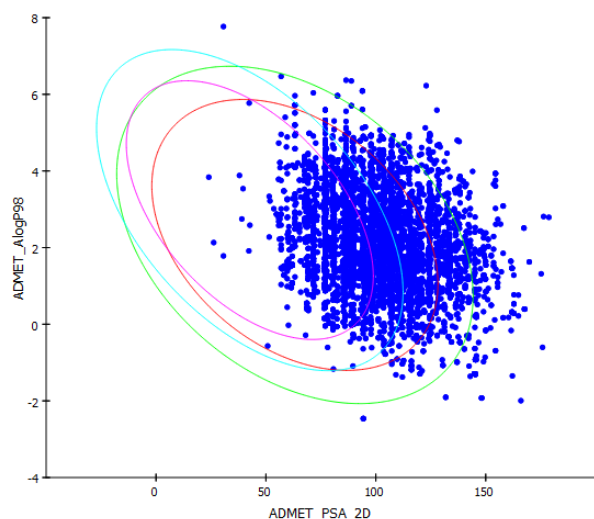
f. تحسين مركب رأس السلسلة Lead optimization:

تم تحسين مركب lead المختار عن طريق إجراء تغييرات على المتبادلات الغير مهمة للفعالية، حيث تم توليد مركبات جديدة ابتداءً من مركب lead باستخدام مكتبة برنامج Discovery Studio للمتبادلات الكيميائية. ومن ثم تم اتباع النهج السابق نفسه من أجل الاحتفاظ بالمركبات المتوافقة مع قواعد ليبينسكي وفيرر، والمركبات التي لم تبدي أي سمية كبدية وأبدت امتصاصية معوية واختراقية ل BBB عالية. أخيراً تم إرساء هذه المركبات الجديدة ضمن البروتينات باتباع بروتوكول CDOCKER المذكور سابقاً لتحديد المركبات ذات الألفة الأعلى والتي تشكل الروابط الأقوى مع البروتينات.

g. اختبار الألفة للاستقلاب بواسطة أنزيم CYP3A4:

من أجل تقدير حساسية المثبطات الجديدة للاستقلاب بـ CYP3A4، تم إرساء هذه المركبات ضمن الموقع الفعال لهذا الأنزيم، والذي تم تحديده بالاعتماد على موقع مركب ريتونافير المرتبط مع جزيئة الهيم الأساسية للفعالية الموجودة ضمن الأنزيم.

الامتصاص المعوي. يظهر الشكل 5 مخطط ADMET للامتصاص المعوي واختراقية BBB لهذه المركبات بنسب موثوقية مختلفة. تم الاحتفاظ فقط بالمركبات ذات اختراقية عالية لـ BBB وامتصاص معوي عالي، واستبعاد جميع المركبات التي أبدت سمية كبدية، مما أدى إلى الاحتفاظ بـ 127 مركباً لإجراء دراسات الإرساء.



الشكل 5: مخطط واصفات ADMET للمركبات الـ 7037 الناتجة عن الجولة الأولى من الفلترة. حيث يمثل الإهليلجين الأحمر والأخضر موثوقية بنسبة 95% و 99% على التوالي من أجل الامتصاص المعوي، ويمثل الإهليلجين الوردي والأزرق موثوقية 95% و 99% على التوالي من أجل اختراقية BBB

تم إرساء المثبطات الجديدة ضمن أنزيم (PDB: CYP3A4 3NXU) باتباع نفس المعايير المستخدمة في بروتوكول CDOCKER المذكور سابقاً، مع تحديد الرابطة المتبلورة ريتونافير كمركز للكرة المحددة لموقع الإرساء بحجم 11Å³ أيضاً، وتم التحقق من دقة الإرساء أيضاً بشكل مشابه لأنزيم البروتياز، عن طريق إعادة إرساء الرابطة المتبلورة، حيث تم الحصول على $RMSD = 1.06\text{\AA}$ مما يدل على دقة عالية.

III. النتائج والمناقشة RESULTS AND

:DISCUSSION

a. مسح قاعدة البيانات وإعداد الرابطة Database

:Screening and Ligand Preparation

تم فحص قاعدة بيانات Pubchem باستخدام مقياس تشابه Tanimoto مع عتبة 70% من التشابه مع دارونافير. حيث تم الحصول على 20931 مركب من قاعدة البيانات وتحضيرها باستخدام معالج تحضير الرابطة.

b. دراسات الحرائك الدوائية والسمية ADMET:

تم فلترة المركبات المحضرة تبعاً لتوافقها مع قواعد ليبينسكي الخمسة وقاعدة فيبر مع السماح بمخالفة واحدة كحد أقصى، مما أدى إلى الاحتفاظ بـ 7037 مركباً. بعد ذلك، تم توليد واصفات ADMET، وفلتر المركبات المتبقية من خلال الاختراقية لـ BBB ومستويات

الجدول II: نتائج إرساء المركبات الثمانية الأفضل المرشحة لتصبح مركب lead ضمن الجيب الفعال لأنزيم البروتياز مقارنة بـ

Darunavir

المركب *	-CDOCKER Energy	عدد الروابط القوية **	Libdock Score	معدل الامتصاص المعوي	معدل اختراق الحاجز الدماغي الدموي
110327740	50.73	(0)4	135.15	0	1
110327851	50.51	(2)4	135	0	1
163466442	46.55	(1)1	134.3	0	1
110327845	46.23	(0)0	133.74	0	1

1	0	132.87	(0)6	45.16	19385025
1	0	139.47	(2)3	44.29	141494110
1	0	137.26	(0)1	42.66	68345819
1	0	132.12	(0)0	40.67	68951706
4	2	167	(3)7	46.91	Darunavir

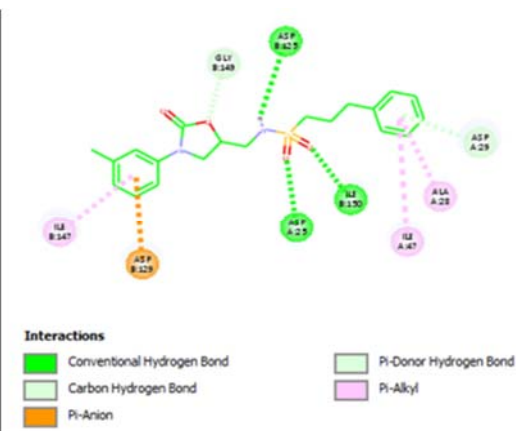
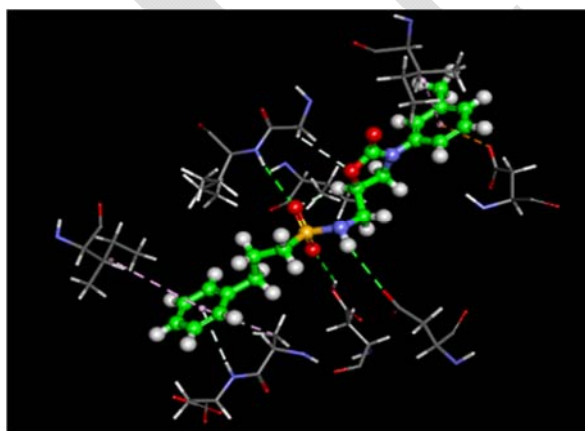
*رمز تعريف المركب في قاعدة بيانات Pubchem. ** عدد الروابط القوية (هيدروجينية، تجاذب كهربائي...) بين الربطة والبروتين، مع تحديد عدد الروابط مع ثمالي ASP125, ASP25 المهمتين للفعالية بين قوسين.

d. تحديد مركب رأس السلسلة Lead Determination:

أبدت جميع المركبات معدلات امتصاص معوي واختراقية ل BBB عالية. أما بالنسبة لتحديد ألفة وقوة الارتباط بالبروتين، فقد تم إجراء تحليل دقيق لتوضع وتداخل المركبات الثمانية الأخيرة مع المستقبل، وذلك من أجل تحديد أفضل مركب ليكون بمثابة lead لتصميم المشتبات الجديدة. أبدى المركب الأول 110327740 أعلى ألفة ارتباط، لكن لم يشكل أي روابط قوية مع ASP25 أو ASP125 الأساسيين للفعالية، من ناحية أخرى، شكل المركب الثاني 110327851 أربع روابط قوية مع هيكل البروتين من ضمنها رابطتان هيدروجينيتان مع ASP25 و ASP125 (الشكل 6) بالإضافة لامتلاكه ألفة عالية أكبر من تلك لدارونافير. بناءً على ذلك، تم استخدام المركب الثاني ليكون مركب lead سيتم استخدامه لتطوير المشتبات الجديدة.

c. الإرساء الجزيئي Molecular Docking:

أولاً، تم إرساء المركبات الـ 127 المتبقية ضمن بروتياز HIV-1 المحضر مسبقاً (PDB: 2IEN) باستخدام بروتوكول Libdock. تم إرساء دارونافير باستخدام نفس المنهجية مما أدى إلى الحصول على قيمة Libdock score قدرها 167. وبما أن Libdock هو بروتوكول مسح افتراضي عالي الإنتاجية، فهو يتصف بدقة منخفضة نسبياً، لذلك تم استخدام عتبة قدرها 130 لفصل المركبات ذات الارتباط المشابه نسبياً أو الأعلى من دارونافير. تم الانتقال بعدها إلى الجولة الثانية من الإرساء باستخدام بروتوكول CDOCKER، حيث تم إرساء 59 مركباً باستخدام CDOCKER، نجح منها 41 مركباً في التوضع ضمن الجيب الفعال للبروتين، وأظهرت 8 مركبات قيم CDOCKER ENERGY جيدة مقارنةً بدارونافير (CDOCKER-ENERGY = 46.91)، إضافة لامتلاكها خصائص حركية دوائية مناسبة. يظهر الجدول II نتائج عمليات الإرساء.



الشكل 6: تمثيل ثنائي وثلاثي الأبعاد لتوضع وتداخلات المركب المختار ليكون lead ضمن الموقع الفعال للبروتين

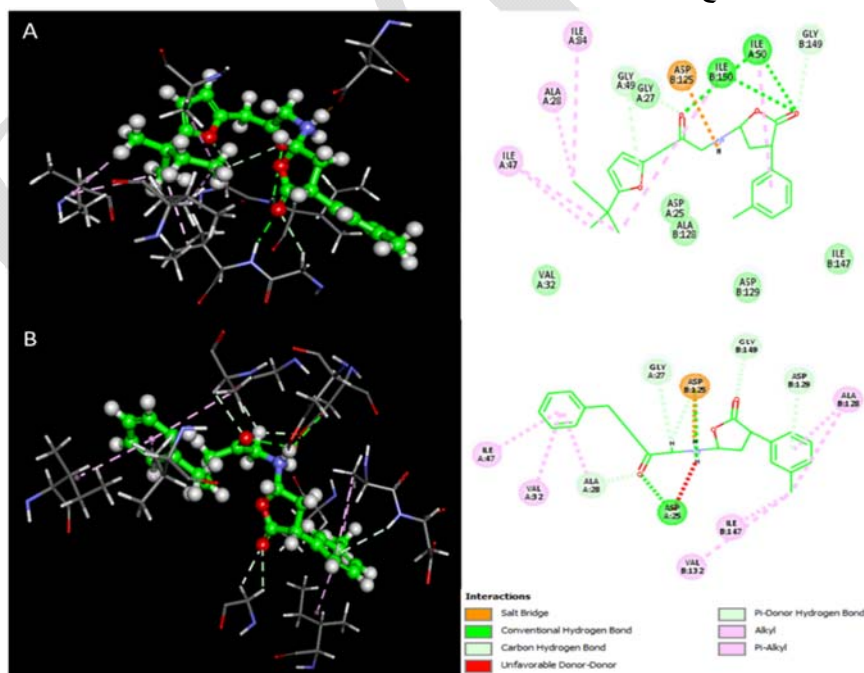
نلاحظ تشكل 3 روابط قوية مع شمالي ASP25 و ASP125 (رابطة هيدروجينية و رابطتي تجاذب كهربائي)، مما يمنح المركب ارتباط قوي مع البروتياز واحتمال أقل للتأثر بالطفرات الفيروسية.

f. اختبار الألفة للاستقلاب بواسطة أنزيم CYP3A4:

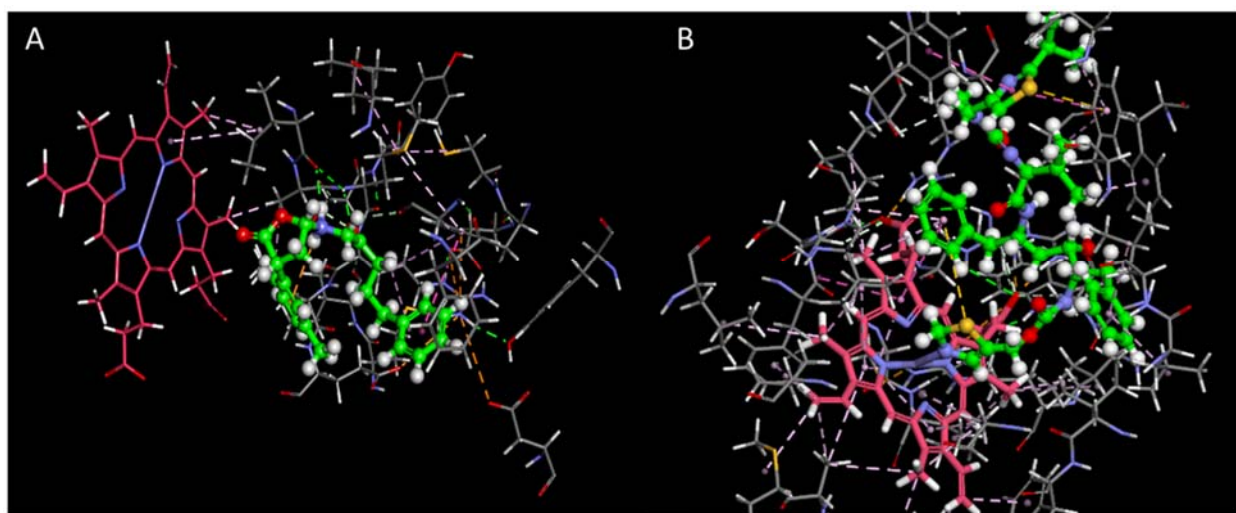
تم إرساء المركبات الجديدة ضمن الموقع الفعال لأنزيم CYP3A4، ومن ثم استبعاد جميع المركبات التي أبدت تقارباً أو شكلت روابط مع جزيئة الهيم في الموقع الفعال. يبين الشكل 8 مقارنة بين توضع مركب الدارونافير (باللون الأخضر) الذي يتم استقلابه بواسطة CYP3A4 والمركب 3 (باللون الأخضر) الذي أبدى ألفة منخفضة للتفاعل مع هذا الأنزيم وتقارب قليل مع جزيئة الهيم (باللون الوردي) الفعالة حيث لم يشكل أي رابطة معها على عكس الريتونافير الذي شكل رابطة قوية مع ذرة الحديد في وسط الجزيئة. لم تبدي المركبات العشرة أي تداخل مهم مع جزيئة الهيم.

e. تحسين مركب رأس السلسلة Lead optimization:

من أجل زيادة الروابط القوية المتشكلة مع شمالات الموقع الفعال وهيكل البروتين الأساسي، تم تعديل المركب الثاني 110327851 باتباع مقارنة تغيير المتبادلات. تم اختيار المجموعات التي لم تشكل روابط مهمة أو لم تلعب دوراً مهماً في الألفة وتوضع المركب ضمن الجيب الفعال، من أجل استبدالها بمجموعات أفضل. تم توليد 1431 مركب جديد، ومن ثم فلتر هذه المركبات بناء على معايير الحركية الدوائية والسمية المذكورة سابقاً من امتصاص معوي، اختراقية للحاجز الدماغي الدموي، والسمية الكبدية، مما أدى للاحتفاظ بـ 26 مركباً. أخيراً، تم إرساء هذه المركبات باستعمال بروتوكول CDOCKER، ومن ثم دراسة التوضع والتداخلات المتشكلة مع البروتياز. يبين الجدول III بنية المركبات العشرة الجديدة الأفضل، ويبين الجدول IV نتائج الإرساء لهذه المركبات. المركب 3 أبدى أفضل خصائص حيث يمتلك ألفة عالية للبروتياز ($-CDOCKER\ Energy = 60.19$)، بالإضافة إلى امتصاصية معوية واختراقية BBB عالية. يبين الشكل 7 توضع المركب 3 ضمن الموقع الفعال للبروتياز، حيث



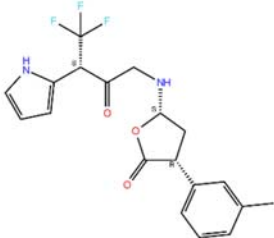
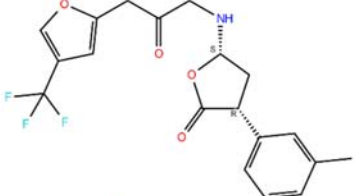
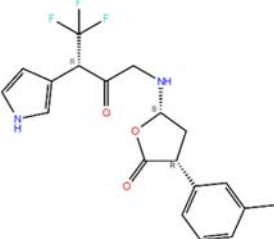
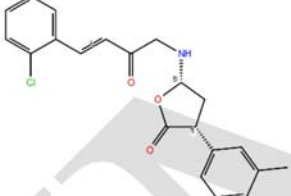
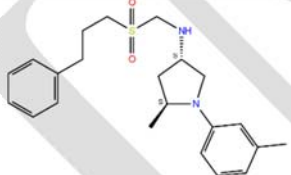
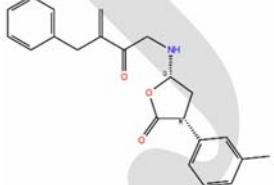
الشكل 7: تمثيل ثنائي وثلاثي الأبعاد لتوضع المركبين 1 (A) و 3 (B) ضمن الموقع الفعال لـ HIV-1 Protease



الشكل 8: مقارنة بين توضع المركب 3 (A) والريتونافير (B) (ملونان بالأخضر) ضمن الموقع الفعال لأنزيم CYP3A4 وتفاعلهما مع جزيئة الهيم (باللون الوردي)

الجدول III: بنية المركبات العشرة الأفضل الناتجة عن النواة المقترحة:

المركب	البنية الكيميائية
1	
2	
3	
4	

البنية الكيميائية	المركب
	5
	6
	7
	8
	9
	10

الجدول IV: نتائج إرساء المركبات العشرة الجديدة ضمن البروتياز:

المركب *	-CDOCKER Energy	عدد الروابط القوية **	معدل الامتصاص المعوي	معدل اختراق الحاجز الدماغي الدموي	تداخل مع الهيم
1	66.69	(1)4	0	1	لا
2	63.62	(3)3	0	3	لا
3	60.19	(3)3	0	1	لا
4	56.80	(3)3	0	2	لا
5	56.29	(1)4	0	2	لا
6	56.07	(2)5	0	2	لا
7	54.33	(3)3	0	2	لا
8	50.46	(2)2	0	1	لا
9	49.70	(2)5	0	1	لا
10	48.19	(2)2	0	1	لا

IV. خاتمة :

المراجع:

- [1]. The World Health Organization. <https://www.who.int/>. Accessed: 15 October 2023.
- [2]. 2 Hemelaar, J., et al. (2006), Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. Aids. 20(16): p. W13-23.DOI: 10.1097/01.aids.0000247564.7.3009bc.
- [3]. 3 Shao, Y. and C. Williamson (2012), The HIV-1 epidemic: low- to middle-income countries. Cold Spring Harb Perspect Med. 2(3): p. a007187.DOI: 10.1101/cshperspect.a007187.
- [4]. 4 The US National Institution of Health. <https://hivinfo.nih.gov>. Accessed: 15 October 2023
- [5]. 5 Bandera, A., et al. (2019), Phylogenies in ART: HIV reservoirs, HIV latency and drug resistance. Curr Opin Pharmacol. 48: p. 24-32.DOI: 10.1016/j.coph.2019.03.003.
- [6]. 6 Ghosh, A.K., H.L. Osswald, and G. Prato (2016), Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. Journal of Medicinal Chemistry. 59(11): p. 5172-5208.DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01697.
- [7]. 7 Blood, G.A.C. (2016), Human Immunodeficiency Virus (HIV). Transfus Med Hemother. 43(3): p-203 . .22DOI: 10.1159/000445852.
- [8]. 8 Engelman, A. and P. Cherepanov (2012), The structural biology of HIV-1: mechanistic and

تم تطبيق طرق النمذجة الجزيئية لتصميم مثبطات بروتياز فيروس نقص المناعة البشرية-1 جديدة، حيث تم اتباع استراتيجيات مختلفة من أجل التغلب على التحديات المختلفة التي تواجه الأدوية المضادة لفيروس نقص المناعة البشرية، أهمها المقاومة الدوائية، الآثار الجانبية السامة، انخفاض قدرتها على الوصول إلى الجهاز العصبي المركزي، واستقلابها العالي بأنزيمات السيتوكروم. أولاً، تم تحديد مركب lead المناسب من قاعدة بيانات Pubchem من خلال بحث تشابه بمقياس Tanimoto، ومن ثم فلتر المركبات عبر دراسات ADMET، مرحلتين من الإرساء الجزيئي، وتحليل التوضع ضمن الموقع الفعال. بعد ذلك، تم تحسين مركب lead من خلال تغيير المتبادلات. أظهرت المركبات الناتجة ألفة عالية وتداخلات إيجابية مع ثملات الموقع الفعال. علاوة على ذلك، تمتلك هذه المركبات حرائك دوائية جيدة مناسبة للإعطاء الفموي، اختراقية عالية ل BBB، ألفة قليلة للاستقلاب بأنزيم CYP3A4، مع عدم وجود سمية كبدية متوقعة.

- [20]. 20 Vermeir, M., et al. (2009), Absorption, metabolism, and excretion of darunavir, a new protease inhibitor, administered alone and with low-dose ritonavir in healthy subjects. *Drug Metab Dispos.* 37(4): p. 809-20.DOI: 10.1124/dmd.108.024109.
- [21]. 21 Benet, L.Z., et al. (2016), BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Adv Drug Deliv Rev.* 101: p. 89-98.DOI: 10.1016/j.addr.2016.05.007.
- [22]. 22 Lipinski, C.A., et al. (2001), Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* :3(1)46 .p. 3-26.DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
- [23]. 23 Lipinski, C.A. (2000), Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 44(1): p. 235-49.DOI: 10.1016/s1056-8719(00)00107-6.
- [24]. 24 Veber, D.F., et al. (2002), Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 45(12): p. 2615-23.DOI: 10.1021/jm020017n.
- [25]. 25 BIOVIA, D.S. (2016), Discovery Studio 2016, San Diego: Dassault Systèmes.
- [26]. 26 Berman, H.M., et al. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research.* 28(1): p. 235-242.DOI: 10.1093/nar/28.1.235.
- [27]. 27 The RCSB protein database. <http://www.rcsb.org/>. Accessed: 19 October 2023
- [28]. 28 Kuczera, K., J. Wiorkiewicz, and M. Karplus (1993), CHARMM. Harvard University.
- [29]. 29 Kim, S., et al. (2022), PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Research.* 51(D1): p. D1373-D1380.DOI: 10.1093/nar/gkac956.
- [30]. 30 Bajusz, D., A. Rácz, and K. Héberger (2015), Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *Journal of Cheminformatics.* 7(1): p. 20.DOI: 10.1186/s13321-015-0069-3.
- [31]. 31 Rao, S.N., et al. (2007), Validation Studies of the Site-Directed Docking Program LibDock. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 47(6): p. 2159-2171.DOI: 10.1021/ci6004299.
- [32]. 32 Gagnon, J.K., S.M. Law, and C.L. Brooks, 3rd (2016), Flexible CDOCKER: Development and application of a pseudo-explicit structure-based docking method within CHARMM. *J Comput Chem.* 37(8): p. 753-62.DOI: 10.1002/jcc.24259.
- [33]. therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol.* 10(4): p. 279-90.DOI: 10.1038/nrmicro2747.
- [9]. 9 Weber, I.T. and J. Agniswamy (2009), HIV-1 Protease: Structural Perspectives on Drug Resistance. *Viruses.* 1(3): p. 1110-36.DOI: 10.3390/v1031110.
- [10]. 10 Farady, C.J. and C.S. Craik (2010), Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. *Chembiochem.* 11(17): p. 2341-6.DOI: 10.1002/cbic.201000442.
- [11]. 11 Lv, Z., Y. Chu, and Y. Wang (2015), HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl).* 7: p. 95-104.DOI: 10.2147/hiv.S79956.
- [12]. 12 Boesecke, C. and D.A. Cooper (2008), Toxicity of HIV protease inhibitors: clinical considerations. *Curr Opin HIV AIDS.* 3(6): p. 653-9.DOI: 10.1097/COH.0b013e328312c392.
- [13]. 13 Ghosh, A.K., et al. (2012), Enhancing Protein Backbone Binding—A Fruitful Concept for Combating Drug-Resistant HIV. *Angewandte Chemie International Edition.* 51(8): p. 1778-18.02DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201102762>.
- [14]. 14 Koh, Y., et al. (2003), Novel bis-tetrahydrofuranylurethane-containing nonpeptidic protease inhibitor (PI) UIC-94017 (TMC114) with potent activity against multi-PI-resistant human immunodeficiency virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(10): p. 3123-9.DOI: 10.1128/aac.47.10.3123-3129.2003.
- [15]. 15 Wensing, A.M.J., N.M. van Maarseveen, and M. Nijhuis (2010), Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Research* :1(85).p. 59-74.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.003>.
- [16]. 16 Diseases, B.M.N.I.o.D.a.D.a.K. (2012-2023), LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet].
- [17]. 17 Rittweger, M. and K. Arasteh (2007), Clinical pharmacokinetics of darunavir. *Clinical Pharmacokinetics.* 46: p. 739.+
- [18]. 18 Gong, Y., et al. (2019), Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cytochrome P450 inhibitors for HIV treatment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 15(5): p. 417-427.DOI: 10.1080/17425255.2019.1604685.
- [19]. 19 Sevrioukova, I.F. and T.L. Poulos (2013), Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. *Dalton Trans.* 42(9): p. 3116-26.DOI: 10.1039/c2dt31833d.