



In silico Ορθολογικός Σχεδιασμός για την Εξεύρεση Παραγώγων Φουλερενίων που φέρουν Κατεχολική Ομάδα με πιθανή HIV-PR Ανασταλτική Δράση.

Χαράλαμπος Πετράκος, Δημοσθένης Awad¹, Θωμάς Μαυρομούστακος^{1*}

¹Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:

HIV; πρωτεάση;
αναστολέας; φουλερένιο;
βιοϊσοστέρεια

ARTICLE INFO:

Received: March 5, 2024

Revised: May 19, 2024

Accepted: June 6, 2024

Available on line: September 30, 2024

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πρωτεάση του ιού HIV διαχρονικά έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για την εύρεση βιοδραστικών ενώσεων – φαρμάκων για την καταπολέμηση του AIDS. Μια ομάδα ενώσεων με υποσχόμενα αποτελέσματα σε αυτόν τον τομέα αποτελούν τα φουλερενικά παράγωγα. Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε και παρουσιάζουμε μία νέα σειρά φουλερενικών παραγώγων, που περιέχουν την ομάδα της κατεχόλης, για την ικανότητα τους να δρουν ως αναστολείς της πρωτεάσης του HIV αξιοποιώντας *in silico* μεθόδους. Ακόμη μελετήσαμε μια πληθώρα βιοϊσοστερών δομών των φουλερενικών αυτών παραγώγων τόσο για την ισχύ πρόσδεσης με την πρωτεάση του HIV όσο και για τις ακριβείς αλληλεπιδράσεις που εμφανίζουν με αυτήν, τις οποίες και οπτικοποιήσαμε.

1. Εισαγωγή

Στις μέρες μας η εύρεση νέων ενώσεων οδηγών για την παραγωγή φαρμάκων πραγματοποιείται με πολλούς τρόπους. Δύο από τις κύριες μεθόδους που χρησιμοποιούνται είναι ο σχεδιασμός με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή (*in silico*) και η μοριακή μοντελοποίηση.¹ Σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους, η αξιοποίηση αυτών προσφέρει μια πληθώρα σημαντικών πλεονεκτημάτων, όπως η μείωση του κόστους και του χρόνου για την εύρεση νέων υποψήφιων ενώσεων και η ελάττωση του αριθμού των φυσικών πειραμάτων που απαιτούνται. Επίσης αξιοποιούν τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου του στόχου και προσφέρουν εναλλακτικές στη χρήση πειραματό-

* CORRESPONDING

AUTHOR:

Θ. Μαυρομούστακος, Εργαστήριο
Οργανικής χημείας,
tmavrom@chem.uoa.gr

ζων με δημιουργία αντίστοιχων *in silico* μοντέλων.

Οι υπολογιστικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται για την ανακάλυψη νέων δομών-οδηγών (hits) και ενώσεων-οδηγών (leads) αλλά και για τη βελτιστοποίηση αυτών ως προς τις ιδιότητες τους.^{1,2} Η μοριακή μοντελοποίηση αξιοποιείται για ελαχιστοποίηση της ενέργειας των μορίων και τον προσδιορισμό της θερμοδυναμικά ευνοϊκότερης διαμόρφωσης τους είτε είναι ελεύθερα είτε προσδεμένα σε άλλα μόρια και λειτουργεί συμπληρωματικά με τις *in silico* μεθόδους. Παράλληλα χρησιμοποιείται και για την πρόσδεση μορίων στον στόχο τους, την οπτικοποίηση τριδιάστατων δομών και τον προσδιορισμό φυσικοχημικών και μοριακών παραμέτρων.¹

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η αξιοποίηση των παραπάνω υπολογιστικών μεθόδων για την εύρεση βιοδραστικών ενώσεων, για χρήση κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας.

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human Immunodeficiency Virus – HIV) ανήκει στην κατηγορία των ρετροϊών. Η ωρίμανση του μέσα στα κύτταρα του ξενιστή πραγματοποιείται με τη συμβολή δύο ενζύμων του, την αντίστροφη μεταγραφή και την πρωτεάση. Λόγω του καθοριστικού ρόλου που λαμβάνουν τα βιομόρια αυτά έχουν αποτελέσει στόχο ερευνών για την εύρεση ενώσεων που θα αποτρέψουν τη δράση τους.

Η πρωτεάση του HIV (HIV PR) αποτελεί ένα συμμετρίας C2 ομοδιμερές συνολικού βάρους 22 kDa και, όπως υποδεικνύει και το όνομά της, παρουσιάζει την ικανότητα να υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς.^{3,4} Ανήκει στην κατηγορία των πρωτεασών ασπαρτικού οξέος, εξαιτίας του καθοριστικού ρόλου που διαδραματίζει το ζεύγος αμινοξέων Asp25/Asp25' στη δράση της. Το ζεύγος αυτό είναι ένα από τα τρία της καταλυτικής τριάδας του ενεργού κέντρου του ενζύμου, η οποία συμπληρώνεται από τα ζεύγη Thr26/Thr26' και Gly27/Gly27'. Έρευνες που επιτελέστηκαν σχετικά με την ειδικότητα αυτού του ενζύμου έδειξαν πως η αναγνώριση των φυσικών υποστρωμάτων Gag και Gag-Pol βασίζεται στα δομικά χαρακτηριστικά τους χωρίς να υπάρχει προτίμηση για κάποια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων.⁵⁻⁷

Η πρώτη δημοσίευση για τη χρήση του φουλερε-

νίου C60 και παραγώγων του κατά του HIV έγινε το 1993 από την ομάδα των Simon H. Friedman, *et al.*^{8,9} Η πλούσια χημεία των φουλερενίων σε συνδυασμό με την ανακάλυψη αυτή ώθησε έκτοτε πολλές ερευνητικές ομάδες να προσπαθήσουν να εντοπίσουν τους υποκαταστάτες εκείνους που αν προστεθούν στο φουλερένιο θα του δώσουν νέες ιδιότητες και θα βελτιστοποιήσουν τις ικανότητες του απέναντι στον HIV.

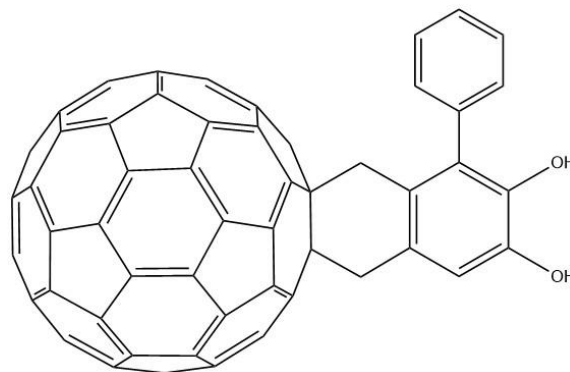
Με το ίδιο σκεπτικό αποφασίσαμε να εξετάσουμε μια νέα σειρά φουλερενικών παραγώγων ως προς την ισχύ πρόσδεσης τους με την πρωτεάση του HIV με την προοπτική χρήσης αυτών, ως αναστολείς της πρωτεάσης, φαρμακευτικά για την καταπολέμηση του AIDS.

2. Πειράματα και μετρήσεις

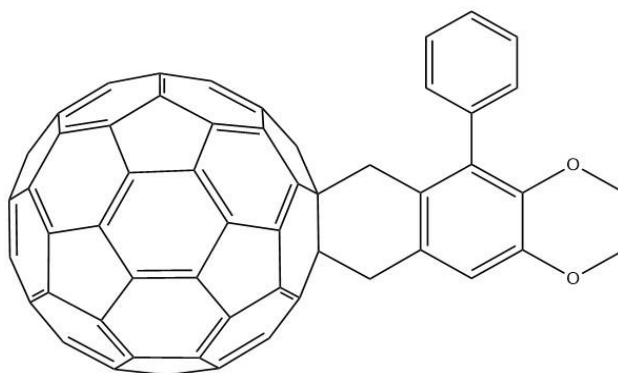
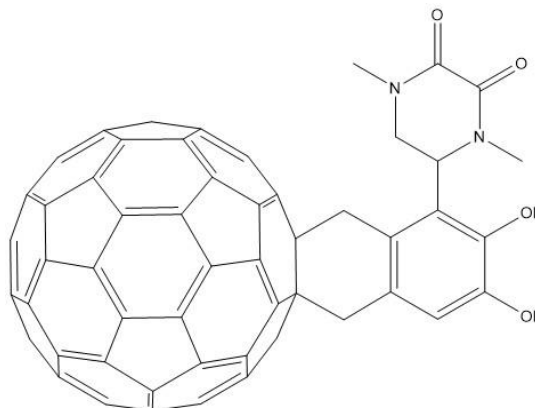
2.1 Φουλερενικά παράγωγα με ομάδα κατεχόλης ως αναστολείς της HIV-PR

Ξεκινήσαμε με το φουλερενικό παράγωγο της εικόνας 1, το οποίο ονομάσαμε ligma40. Σε αυτό μία ομάδα κατεχόλης βρίσκεται συνδεδεμένη με το φουλερένιο και φέρει μια φαίνυλο ομάδα ως υποκαταστάτη στον δακτύλιο της, σε όρθο- και μέτα- θέση ως προς τις δύο υδροξυλομάδες της αντίστοιχα.

Η συγκεκριμένη δομή επιλέχθηκε διότι εμφανίζει ποικιλία ως προς την παραγωγοποίηση που μπορεί να δεχτεί. Τόσο οι υδροξυλομάδες της κατεχόλης όσο



Εικόνα 1: Διδιάστατη απεικόνιση της ligma40

Εικόνα 2: Διδιάστατη απεικόνιση της *ligma43*.Εικόνα 3: Διδιάστατη απεικόνιση της *ligma40_71*.

και η ομάδα φαινυλίου μπορούν να συμμετέχουν σε πληθώρα αντιδράσεων οδηγώντας σε πολλαπλά παράγωγα. Παράλληλα έχουμε μία αρχική ένωση που μπορεί να εμφανίσει ένα ευρύ φάσμα αλληλεπιδράσεων με τον στόχο. Η φαινυλο ομάδα μπορεί να αναπτύξει υδροφοβες και π-π αλληλεπιδράσεις ενώ τα υδροξύλια έχουν τη δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και πολικών αλληλεπιδράσεων. Έτσι η επιλογή αυτής της δομής, ως ένωση οδηγός, αυξάνει τις πιθανότητες εύρεσης αποδοτικών, ως προς την επιθυμητή λειτουργία της αναστολής, ενώσεων. Προκειμένου όμως αυτή η ένωση να λάβει τον ρόλο της ένωσης οδηγού, πρέπει πρώτα να διερευνηθεί η βιοενεργότητα της ως προς την αναστολή της πρωτεάσης.

Αρχικά σχεδιάσαμε την τριδιάστατη δομή του φουλερενικού παραγώγου, με τη χρήση του προγράμματος Chem3D 16.0 στην κατάλληλη μορφή αρχείου (.mol2), η οποία υποστηρίζεται από το πρόγραμμα μοριακής μοντελοποίησης που χρησιμοποιήσαμε για τις προσομοιώσεις που εκτελέσαμε. Αξιοποιήσαμε επίσης τη λειτουργία MM2 του Chem3D ώστε να ελαχιστοποιηθεί η ενέργεια του προσδέτη και να καταλήξουμε στην ενεργειακά ευνοϊκότερη διαμόρφωση του. Για τα πειράματα πρόσδεσης του υποψήφιου αναστολέα στην πρωτεάση χρησιμοποιήσαμε το AutoDockTools 1.5.7, το οποίο μας παρείχε την ενέργεια πρόσδεσης της ένωσης στην κοιλότητα του ενεργού κέντρου της πρωτεάσης. Στις προσο-

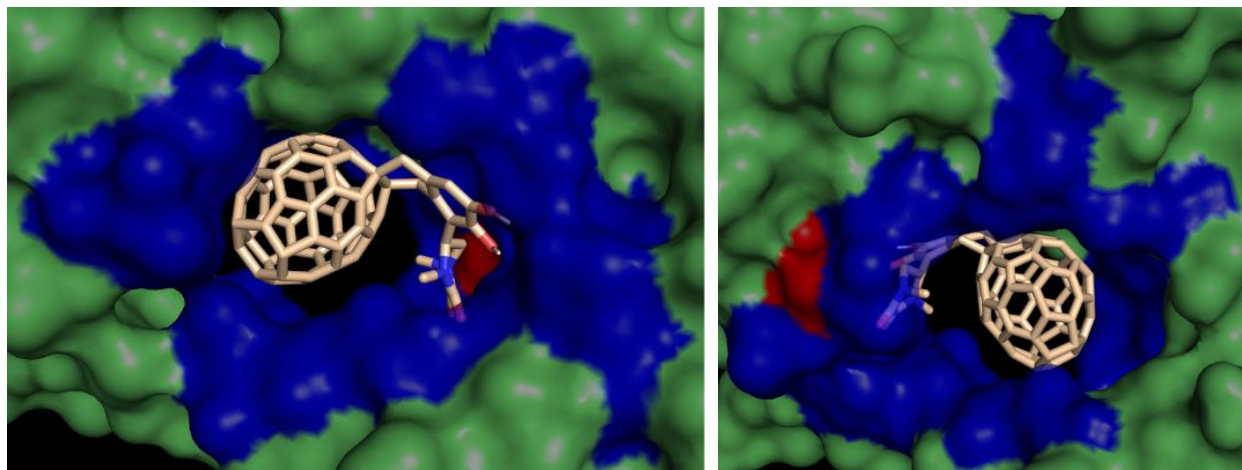
μοιώσεις, ως κρυσταλλογραφικό μοντέλο της HIV-1 PR, αξιοποιήθηκε το αρχείο PDB 1AID.¹⁰ Από αυτό το μοντέλο αφαιρέσαμε τα μόρια νερού, προσθέσαμε μόνο τα πολικά υδρογόνα της δομής και επιλέξαμε ως συντεταγμένες για την πρόσδεση του φουλερενικού παραγώγου να χρησιμοποιήσουμε τις x: 63.84, y: 38.186 και z: 0.208, αφού εξετάσαμε τη θέση των προσδετών που υπήρχαν ήδη στο αρχείο PDB.

Ακολουθώντας την παραπάνω πορεία υπολογίσαμε την ενέργεια πρόσδεσης για τη *ligma40* -8.61 kcal/mol. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει μία ισχυρή πρόσδεση με το ενεργό κέντρο της πρωτεάσης και συνεπώς η *ligma40* αποτελεί ευνοϊκή ένωση για χρήση ως αναστολέας της HIV PR.

2.2 Βιοϊσοστερεία

Αφού το αποτέλεσμα για τη *ligma40* ήταν ενθαρρυντικό, θελήσαμε να εξετάσουμε την επίπτωση που θα είχαν, για την πρόσδεση με τον στόχο, βιοϊσοστερείς μετατροπές των ομάδων που περιέχονται στη δομή της.

Η πρώτη αλλαγή που ερευνήσαμε ήταν η αντικατάσταση των υδροξυλομάδων με μεθοξυ ομάδες για να εξετάσουμε αν οι υδροξυλομάδες συμμετέχουν στην πρόσδεση με την πρωτεάση συγκεκριμένα μέσω δεσμών υδρογόνου. Από αυτήν τη μετατροπή προέκυψε η δομή της εικόνας 2, την οποία ονομάσαμε *ligma43* και της οποίας η ενέργεια πρόσδεσης της



Εικόνα 4: Προσδεμένη η *ligma40_71* στο εσωτερικό της κοιλότητας της HIV-1 PR. Με κόκκινο παρουσιάζονται τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν πολικά και με μπλε τα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν μη πολικά με τον προσδέτη.

με την HIV PR μετρήθηκε -8.85 kcal/mol. Η ενέργεια αυτή αντιστοιχεί επίσης σε ισχυρή πρόσδεση με τον στόχο, αλλά δε διαφέρει ιδιαίτερα από την ενέργεια πρόσδεσης της *ligma40* και συνεπώς συμπεράναμε πως δεν αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου με την κοιλότητα του ενζύμου.

Λόγω της μικρής μεταβολής στην ισχύ πρόσδεσης αποφασίσαμε να ερευνήσουμε στη συνέχεια βιοϊσοστερείς μετατροπές για τη φαίνυλο ομάδα. Μελετήσαμε συνολικά 194 βιοϊσοστερείς δομές, 52 της *ligma40* και 142 της *ligma43* και καταγράψαμε την ενέργεια πρόσδεσης που παρουσιάζουν αυτές οι δομές με την πρωτεάση. Πηγή των βιοϊσοστερών ομάδων του φαίνυλίου που εξετάσαμε αποτέλεσε το άρθρο των *Subbaiah M. A. M.* και *Meanwell N. A.*¹¹ Οι 163 από αυτές τις βιοϊσοστερείς ενώσεις, 44 της *ligma40* και 119 της *ligma43*, παρουσίασαν ισχυρότερη πρόσδεση με την πρωτεάση σε σχέση με τις αντίστοιχες αρχικές *ligma40* και *ligma43*. Οι 38 από τις 163 εμφάνισαν ενέργεια πρόσδεσης ≤ -10 kcal/mol και μελετήθηκαν εκτενέστερα για να προσδιοριστούν οι αλληλεπιδράσεις που εμφανίζουν με τον στόχο και παρακάτω αναλύουμε τις 2 από αυτές που παρουσίαζαν την ευνοϊκότερη ενέργεια.

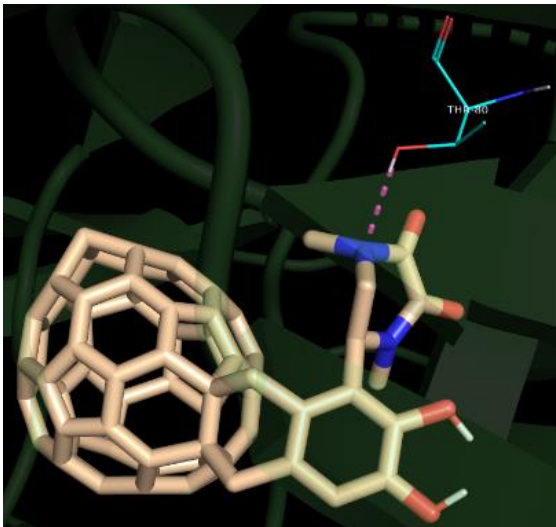
Η οπτικοποίηση και ανάλυση των αλληλεπιδράσεων αναστολέα-ενζύμου πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος PyMOL. Για την απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων ρυθμίσαμε στο PyMOL τις αποστάσεις για πολικές αλληλεπιδράσεις σε ≤ 3.2 angstrom και για τις μη πολικές σε ≤ 5 angstrom. Στο κείμενο παρακάτω με τόνο συμβολίζονται τα αμινοξέα της B αλυσίδας της πρωτεάσης ενώ τα αμινοξέα της A αλυσίδας δίχως τόνο.

Η δομή αυτή, η οποία εμφανίζεται στην εικόνα 3, χαρακτηρίζεται από ενέργεια πρόσδεσης με την HIV-1 PR -11.23 kcal/mol. Η διαμόρφωση που λαμβάνει εντός της κοιλότητας για να επιτύχει αυτήν την ισχυρή πρόσδεση παρουσιάζεται στην εικόνα 4. Στην εικόνα 5 απεικονίζεται η μοναδική πολική αλληλεπίδραση ανάμεσα στον προσδέτη και την πρωτεάση, ένας δεσμός υδρογόνου με δότη το άζωτο του δακτυλίου της *ligma40_71* και δέκτητη την υδροξυλομάδα της πλευρικής αλυσίδας της THR80 του ενζύμου.

Ligma40_71

Η δομή αυτή, η οποία εμφανίζεται στην εικόνα 3, χαρακτηρίζεται από ενέργεια πρόσδεσης με την HIV-1 PR -11.23 kcal/mol. Η διαμόρφωση που λαμβάνει εντός της κοιλότητας για να επιτύχει αυτήν την ισχυρή πρόσδεση παρουσιάζεται στην εικόνα 4. Στην εικόνα 5 απεικονίζεται η μοναδική πολική αλληλεπίδραση ανάμεσα στον προσδέτη και την πρωτεάση, ένας δεσμός υδρογόνου με δότη το άζωτο του δακτυλίου της *ligma40_71* και δέκτητη την υδροξυλομάδα της πλευρικής αλυσίδας της THR80 του ενζύμου.

Τα αμινοξέα του ενζύμου που συμμετέχουν στις μη πολικές αλληλεπιδράσεις είναι τα: ARG8, ASP25, GLY27, ALA28, ASP29, ASP30, VAL32, LYS45, ILE47, GLY48, GLY49, ILE50, ILE54, LEU76, PRO79, THR80, PRO81, VAL82, ILE84, ASP25', GLY27', ALA28', ASP29', GLY48', GLY49', ILE50', THR80', PRO81', VAL82' και ILE84' (εικόνα 6).



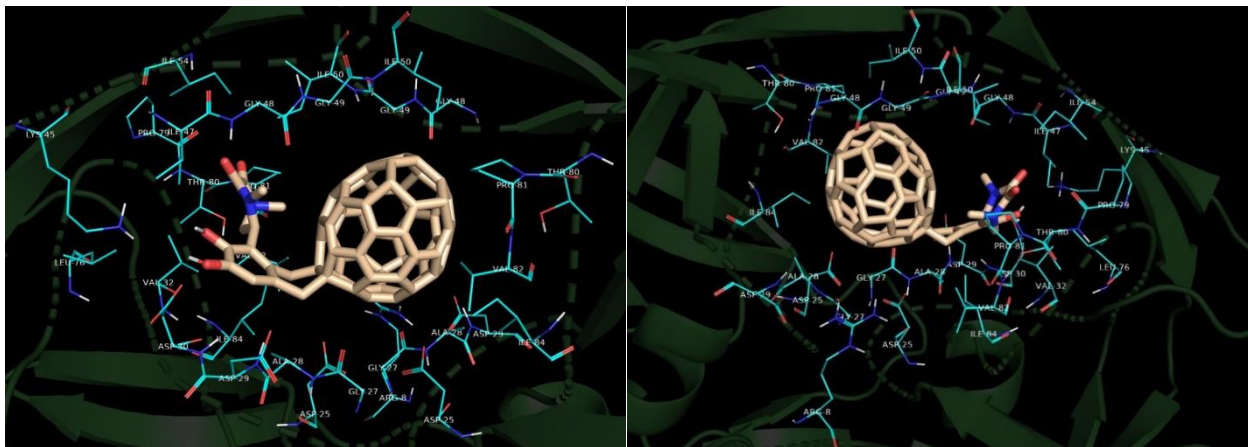
Εικόνα 5: Πολικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη *ligma40_71* και την πρωτεάση. Εμφανίζεται μόνο ένας δεσμός υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα της THR80.

στο εσωτερικό της κοιλότητας του ενεργού κέντρου της.

Η *ligma40_81* εμφανίζει ως πολικές αλληλεπιδράσεις έναν δεσμό υδρογόνου και δύο αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου (εικόνα 9). Ο δεσμός υδρογόνου αναπτύσσεται μεταξύ του οξυγόνου της μίας υδροξυλομάδας του προσδέτη (δότης) και της αμινομάδας του ASP30' (δέκτης). Οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου εμφανίζονται μεταξύ του καρβονυλίου του προσδέτη και των καρβονυλίων των ILE47' και GLY48'. Στην εικόνα 10 απεικονίζονται η *ligma40_81* με τα αμινοξέα που αλληλεπιδρά μη πολικά. Αυτά είναι τα: ARG8, LEU23, ASP25, GLY48, GLY49, ILE50, PRO81, VAL82, ILE84, ASP25', GLY27', ALA28', ASP29', ASP30', THR31', VAL32', ILE47', GLY48', GLY49', ILE50', ILE54', LEU76', THR80', PRO81' και ILE84'.

Συμπεράσματα - Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί παρα-



Εικόνα 6: Μη πολικές αλληλεπιδράσεις της *ligma40_71* με την HIV-1 PR.

Ligma40_81

Η *ligma40_81* παρουσιάζει ενέργεια πρόσδεσης με τον στόχο -11.13 kcal/mol. Η δομή αυτή παρουσιάζεται στην εικόνα 7. Στην εικόνα 8 απεικονίζεται η πρωτεάση σε χωροπληρωτικό μοντέλο με τη *ligma40_81*

τηρήσαμε πως όλες οι δομές που εξετάσαμε με το PyMOL εμφάνιζαν αλληλεπίδραση με το ενεργό κέντρο της πρωτεάσης. Κάθε δομή εμφάνισε μη πολικές αλληλεπιδράσεις και με τα δύο αμινοξέα του ζεύγους ASP25/ASP25' και με ένα τουλάχιστον αμινοξύ από το ζεύγος GLY27/GLY27'.

Η συμπεριφορά αυτή μας δείχνει πως η λειτουργία αυτών ως αναστολείς δε βασίζεται μόνο στη στερεοχημική παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου, αλλά και στην απευθείας αλληλεπίδραση με τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας του. Έτσι, ο συνδυασμός των δύο καθιστά τα αμινοξέα ανίκανα να δράσουν στους μηχανισμούς υδρόλυσης των στόχων τους.

Μέσα από την έρευνα μας προβάλλαμε μία νέα σειρά φουλερενικών παραγώγων με υποσχόμενη συμπεριφορά για χρήση ως αναστολείς της πρωτεάσης του ιού του AIDS. Συγκεκριμένα η ένωση ligma40 παρουσιάζει ισχυρή πρόσδεση με τον στόχο και λειτούργησε ως ένωση οδηγός για τη μελέτη μας. Οι βιοϊσοστερείς αλλαγές που πραγματοποιήσαμε οδήγησαν, στη συντριπτική πλειοψηφία τους, σε αύξηση της ισχύος πρόσδεσης, φέροντας έτσι στο φως ακόμα περισσότερες ενώσεις με την

επιθυμητή συμπεριφορά της αναστολής της HIV-PR. Από τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύεται και ο πρωταρχικός ρόλος της βιοϊσοστερείας στην ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών, καθώς από μία αρχική δομή, που εμφάνιζε την επιθυμητή συμπεριφορά, καταλήξαμε σε πολλαπλές ισχυρότερες.

Τέλος, παρουσιάζεται συνολικά η αξία και η χρησιμότητα των *in silico* μεθόδων και της μοριακής μοντελοποίησης καθώς αναλύθηκε ένας μεγάλος αριθμός πιθανών φαρμακευτικών ενώσεων σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και προέκυψαν πολλές με την επιθυμητή συμπεριφορά, οι οποίες χρίζουν περαιτέρω μελέτης και με *in silico* πειράματα φαρμακοκινητικής, φαρμακοδυναμικής και τοξικότητας καθώς και *in vitro* πειράματα για να εξεταστεί η αποτελεσματικότητά τους και η μη τοξικότητά τους. □

***In silico* Rational Design to Discover new Fullerene Derivatives bearing a Catechol Group to Serve as HIV-PR Inhibitors**

Charalabos Petrakos¹, Dimosthenis Awad¹, Thomas Mavromoustakos^{1*}

¹Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece

KEY WORDS:
HIV; protease; inhibitor;
fullerene; bioisosterism

*** CORRESPONDING
AUTHOR:**
Thomas Mavromoustakos
tmavrom@chem.uoa.gr

ABSTRACT

The HIV protease has, for a long time, sparked interest within the scientific community as a great target for potential drugs to fight against AIDS. A group of chemical compounds that show great potential in this regard are fullerene derivatives. In this study we examined and presented a new series of fullerene derivatives that carry a catechol group. Using *in silico* approaches and molecular docking we carried out experiments to investigate the potential of these derivatives to act as inhibitors for the HIV protease and therefore as drugs for AIDS. The results were very encouraging and so we also examined a plethora of bioisosteres to discover new molecules that showed even greater inhibition of the target enzyme. The exact interactions of these bioisosteres

were examined and visualized using PyMOL and through this we were able to discover that these compounds inhibit the active site of the protease by both steric hindrance and direct interaction with the enzyme's active site amino acids. The overall results showed a discovery of many new potential drugs against HIV.

Βιβλιογραφία:

1. Demopoulos, V.; Tsantili-Kakoulidou, A. *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού Και Ανάπτυξης Φαρμάκων; ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ*: Athens, 2015.
2. Durdagi S., Supuran C. T., Strom T. A., Doostdar N., Kumar M. K., Barron A. R., Mavromoustakos T., Papadopoulos M. G. *In Silico Drug Screening Approach for the Design of Magic Bullets: A Successful Example with Anti-HIV Fullerene Derivatized Amino Acids. J. Chem. Inf. Model.* 49 (5), 1139–1143, 2009. <https://doi.org/10.1021/ci900047s>.
3. Mager P. P. The Active Site of HIV-1 Protease. *Med. Res. Rev.* 21 (4), 348–353, 2001. <https://doi.org/10.1002/med.1012>.
4. Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E. A., Romano K., Schiffer C. A. Mechanism of Substrate Recognition by Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Variants Revealed by a Novel Structural Intermediate. *J. Virol.* 80 (7), 3607–3616, 2006. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3607-3616.2006>.
5. Lawal M. M., Sanusi Z. K., Govender T., Maguire G. E. M., Honarparvar B., Kruger H. G. From Recognition to Reaction Mechanism: An Overview on the Interactions between HIV-1 Protease and Its Natural Targets. *Curr. Med. Chem.* 27 (15), 2514–2549, 2020. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181113122900>.
6. Özer N., Özen A., Schiffer C. A., Haliloğlu T. Drug-resistant <sc>HIV</sc> -1 Protease Regains Functional Dynamics through Cleavage Site Coevolution. *Evol. Appl.* 8 (2), 185–198, 2015. <https://doi.org/10.1111/eva.12241>.
7. King N. M., Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E. A., Schiffer C. A. Combating Susceptibility to Drug Resistance. *Chem. Biol.* 11 (10), 1333–1338, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.08.010>.
8. Martinez Z. S., Castro E., Seong C.-S., Cerón M. R., Echegoyen L., Llano M. Fullerene Derivatives Strongly Inhibit HIV-1 Replication by Affecting Virus Maturation without Impairing Protease Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (10), 5731–5741, 2016. <https://doi.org/10.1128/AAC.00341-16>.
9. Friedman S. H., DeCamp D. L., Sijbesma R. P., Srdanov G., Wudl F., Kenyon G. L. Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification. *J. Am. Chem. Soc.* 115 (15), 6506–6509, 1993. <https://doi.org/10.1021/ja00068a005>.
10. 1AID. RCSB PDB PROTEIN DATA BANK. <https://www.rcsb.org/structure/1AID> (accessed 2023-04-15).
11. Subbaiah M. A. M., Meanwell N. A. Bioisosteres of the Phenyl Ring: Recent Strategic Applications in Lead Optimization and Drug Design. *J. Med. Chem.* 64 (19), 14046–14128, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01215>.