

In silico μελέτες αναστολέων της
μεταλλαγμένης ογκοπρωτεΐνης
BRAFV600E

*ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΩΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»*

ΕΥΓΕΝΙΟΥ ΜΙΧΑΗΛ

ΑΘΗΝΑ ΜΑΡΤΙΟΣ 2018



1 Περιεχόμενα

2	Ευχαριστίες.....	- 5 -
3	Περίληψη	- 7 -
4	Summary.....	- 9 -
5	Οδηγός Εικόνων	- 12 -
6	Οδηγός πινάκων.....	- 15 -
7	Εισαγωγή.....	- 16 -
7.1	Ιστορικά Στοιχεία.....	- 16 -
7.1.1	Από τον πάπυρο στον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων.....	- 16 -
7.1.2	Ο σχεδιασμός φαρμάκων μετά τον 19ο αιώνα μέχρι σήμερα.....	- 20 -
7.2	Υπολογιστικός Σχεδιασμός Φαρμάκων	- 22 -
7.2.1	Γενικά στοιχεία	- 22 -
7.2.2	Φαρμακοφόρα μοντέλα.....	- 28 -
7.2.3	Επικύρωση φαρμακοφόρων μοντέλων	- 29 -
7.2.4	Καμπύλη Δέκτη λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROCcurve).....	- 32 -
7.2.5	Βιβλιοθήκες χημικών ενώσεων.....	- 34 -
7.2.6	Μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking)	- 36 -
7.3	Ογκοπρωτεΐνη BRAF – γενικά στοιχεία	- 40 -
7.3.1	Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK.....	- 40 -
7.3.2	Μεταλλάξεις των RAF στον καρκίνο	- 41 -
7.3.3	Δομή της BRAF και κατανόηση του μηχανισμού ενεργοποίησης της	- 44 -
7.3.4	Αναστολείς της BRAF ^{V600E}	- 47 -
7.3.5	Παράδοξη ενεργοποίηση του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού... ..	- 50 -
8	Σκοπός.....	- 55 -
9	Μέθοδοι.....	- 56 -
9.1	Ligand Scout	- 56 -
9.2	Knime	- 58 -
9.3	Perl	- 58 -
10	Αποτελέσματα-Συζήτηση	- 59 -
10.1	Δημιουργία φαρμακοφόρων μοντέλων	- 60 -
10.1.1	Φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση το dabrafenib.....	- 60 -
10.1.2	Βελτιστοποίηση του φαρμακοφόρου μοντέλου	- 61 -
10.1.3	Φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση το plx7904	- 67 -
10.1.4	Συνδυασμός των δύο φαρμακοφόρων μοντέλων	- 69 -
10.2	Εικονική σάρωση.....	- 70 -

10.2.1	Προετοιμασία βιβλιοθήκης μορίων	- 70 -
10.2.2	Διαδικασία εικονικής σάρωσης	- 71 -
10.2.3	Φιλτράρισμα των ενώσεων που αναδείχθηκαν από την εικονική σάρωση με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους.	- 72 -
10.3	Insilico μοριακή πρόσδεση.....	- 74 -
10.3.1	Προετοιμασία της πρωτεΐνης BRAF ^{V600E}	- 74 -
10.3.2	Προετοιμασία προσδετών	- 74 -
10.3.3	Μέθοδοι μοριακής πρόσδεσης (Molecular Docking).....	- 75 -
11	Σύνοψη Αποτελεσμάτων.....	- 79 -
12	Βιβλιογραφία	- 108 -

In silico μελέτες αναστολέων της μεταλλαγμένης ογκοπρωτεΐνης BRAFV600E

ΕΥΓΕΝΙΟΥ ΜΙΧΑΗΛ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Καθ. Δρ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΒΟΡΓΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Καθ. Δρ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΒΟΡΓΙΑΣ, ΕΚΠΑ

Δρ.ΜΑΡΙΑ ΖΕΡΒΟΥ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Β' ΕΙΕ

Δρ.ΘΕΟΔΩΡΑ ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΥ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Α' ΕΙΕ

2 Ευχαριστίες

Ίσως το πιο δύσκολο κομμάτι ολόκληρης της διπλωματικής εργασίας να είναι αυτό το κεφάλαιο. Δεν μπορείς εύκολα να χωρέσεις σε μία σελίδα τόσα πολλά ευχαριστώ για τους ανθρώπους που χωρίς αυτούς η ολοκλήρωση ενός τέτοιου έργου θα ήταν αδύνατη. Αν θέλουμε να ακριβολογήσουμε σε αυτό το κεφάλαιο θα έπρεπε να υπάρχει το κάθε άτομο που έστω και με μία του λέξη με έκανε να γράφω τώρα αυτές τις γραμμές. Από έναν Ινδό κάπου στο Ισραήλ έως κάποιον Τεχνολόγο του ΤΕΙ Αθήνας υπάρχουν πάρα πολλοί άνθρωποι που τους ευχαριστώ βαθιά.

Αρχικά, θα ήθελα να πω πάρα πολλά ευχαριστώ στον κύριο Κωνσταντίνο Βοργιά που υπήρξε ένας πολύ σημαντικός παράγοντας όχι μόνο στην παρούσα διπλωματική εργασία, αλλά και σε όλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Μέσα από την διδασκαλία του, εκτός των άλλων, μάθαμε πως σαν επιστήμονας οφείλεις να είσαι, ας μου επιτραπεί η λαϊκή φράση, *"και του σαλονιού και του λιμανιού"* με μία αμεσότητα που πολύ καθηγητές του επιπέδου του την αποφεύγουν. Ταυτόχρονα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Θεοδώρα Καλογεροπούλου γιατί ήταν εκείνη που μέσα από το μάθημα της μου έδωσε το έναυσμα για να μπω στον κόσμο του σχεδιασμού φαρμάκων και επιπλέον αποτελεί και μέλος της επιτροπής αξιολόγησης μου.

Πραγματικά αυτή η εργασία θα ήταν αδύνατη χωρίς τη βοήθεια και τη στήριξη όλων των παιδιών του εργαστηρίου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Είναι πραγματικά πολύ σημαντικό για οποιονδήποτε που περνάει ένα κομμάτι, μικρό ή μεγάλο, της μέρας του σε έναν χώρο να αισθάνεται μέρος της ομάδας και τα παιδιά για μένα το έκαναν αυτό στο μέγιστο βαθμό. Ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Κώστα Ποταμίτη που ότι ώρα και μέρα και να ήταν δεν σταμάτησε να με βοηθάει από την πιο περίπλοκη ιδέα μέχρι το πώς να ανοίγω τους υπολογιστές του εργαστηρίου και φυσικά στην κύρια υπεύθυνη αυτής της προσπάθειας την Κυρία Μαρία Ζερβού που όχι μόνο μου έδωσε την ευκαιρία να βρεθώ μέσα στην ομάδα της και να δουλέψω εκεί, όχι μόνο με βοήθησε να πάω κυριολεκτικά στην άλλη μεριά της Ευρώπης για να παρουσιάσω την δουλειά μας, αλλά πίστεψε σε μένα και βρισκόταν συνέχεια δίπλα μου όλη αυτή την χρονική περίοδο.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να το πω σε αυτούς τους ανθρώπους που δεν ήταν στο εργαστήριο και δεν ξέρουν τίποτα για Υπολογιστικό Σχεδιασμό Φαρμάκων (ή ξέρουν μόνο ότι μάθαμε στο 2^ο εξάμηνο!). Τους ανθρώπους που κάθε φορά που έφευγα από το εργαστήριο βράδυ ή που κάθε φορά που χανόμουν πίσω από χιλιάδες εικόνες μορίων ήταν εκεί και άκουγαν όλα αυτά που τους έλεγα, χωρίς να καταλαβαίνουν απαραίτητα τι εννοώ, αλλά με ατελείωτο ενδιαφέρον, σαν να ήταν δική τους δουλειά. Μαριέτα, Λιάνα, Πέτρο, σας ευχαριστώ!

...στη Γεωργία από το δείο της...

3 Περίληψη

Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK το οποίο επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την διαφοροποίηση και την επιβίωση έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον στον τομέα της έρευνας κατά του καρκίνου αφού μεταλλάξεις σε κομβικές πρωτεΐνες του διαταράσσουν την κανονική λειτουργία του με αποτέλεσμα τη δημιουργία νεοπλασιών. Η BRAF είναι μία πρωτεϊνική κινάση σερίνης θρεονίνης και ανήκει στην οικογένεια των RAF πρωτεϊνών που αποτελούν ρυθμιστές στο μονοπάτι MAPK. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση του BRAF εντοπίζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως το μελάνωμα (50%), ο καρκίνος του θυρεοειδούς (35-70%), ο καρκίνος του παχέος εντέρου (5-20%), ο καρκίνος του ήπατος (~14%) και ο καρκίνος των ωοθηκών (~30%).

Η μετάλλαξη BRAF^{V600E} είναι η πιο συχνή μετάλλαξη οδηγώντας σε υπερενεργοποίηση του μονοπατιού και σε καρκινογένεση. Το Vemurafenib (Zelboraf) και το Dabrafenib (Tafinlar) αποτελούν τα δύο εγκεκριμένα φάρμακα, εκλεκτικοί αναστολείς της BRAF^{V600E} που χορηγούνται για τη θεραπεία μεταστατικού ή μη χειρουργήσιμου μελανώματος που φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Η αποτελεσματικότητά τους όμως είναι περιορισμένη λόγω εμφάνισης αντίστασης αλλά και της επαγωγής νέων καρκίνων μέσω της παράδοξης ενεργοποίησης του MAPK μονοπατιού σε wt-BRAF κύτταρα που φέρουν ογκογενή μετάλλαξη σε πρωτεΐνες που προηγούνται της BRAF στο μονοπάτι (RAS, υποδοχείς κινάσες τυροσίνης). Αν και η χρήση συνδυαστικών θεραπειών έχει δώσει ορισμένα καλά αποτελέσματα, πρόσφατα αναπτύχθηκε μια νέα γενιά εκλεκτικών αναστολέων της BRAF^{V600E} (PLX7904 και PLX8394) που φαίνεται να διαφεύγουν της παράδοξης ενεργοποίησης του MAPK (paradox breakers). Επιπλέον, οι αναστολείς αυτοί παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα έναντι αρκετών μηχανισμών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα και επί του παρόντος είναι σε στάδιο κλινικών μελετών.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία διενεργήθηκε εικονική σάρωση με την χρήση φαρμακοφόρων μοντέλων και τεχνικές μοριακής πρόσδεσης (molecular docking) στοχεύοντας στην εύρεση νέων αναστολέων της BRAF^{V600E} με βελτιωμένο βιολογικό προφίλ.

Η δημιουργία των φαρμακοφόρων μοντέλων στόχευσε στην διατήρηση των ισχυρότερων στοιχείων (features) των φαρμακοφόρων μοντέλων που δημιουργήθηκαν με βάση το φάρμακο Dabrafenib και το paradox breaker plx7904. Τα φαρμακοφόρα μοντέλα επικυρώθηκαν μέσω μιας βιβλιοθήκη ενεργών και ανενεργών μορίων από την βάση δεδομένων ChEMBL και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν στην εικονική σάρωση της βιβλιοθήκη μορίων ZINC (~12 εκατ. μόρια). Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν με βάση τη βέλτιστη προσαρμογή τους στα φαρμακοφόρα μοντέλα ελέγχθηκαν ως προς την *insilico* πρόσδεσή τους στο ενεργό κέντρο της BRAFV600E με χρήση μιας σειράς αλγορίθμων μοριακής πρόσδεσης (Glide HTVS και SP και πρωτόκολλο IFD) ενώ στα φίλτρα που εφαρμόστηκαν συμπεριελήφθη και η μελέτη των ADME ιδιοτήτων τους. Η διαδικασία προέκρινε μια τελική ομάδα ενώσεων με δυνατότητα ανάπτυξης ισχυρών αλληλεπιδράσεων με τα κρίσιμα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης και ικανοποιητικές ADME ιδιότητες.

Η προμήθεια των ενώσεων θα επιτρέψει την *in vitro* αξιολόγηση της ανασταλτικής τους δράσης και εκλεκτικότητας έναντι της BRAFV600E ενώ τα πλέον υποσχόμενα μόρια θα δοκιμαστούν σε κυτταρικές σειρές για την αποτελεσματικότητά τους.

4 Summary

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway which affects cell proliferation, apoptosis, migration and differentiation has attracted the attention of anticancer research since abnormal activation of the pathway components is often identified in human cancers. BRAF belongs to the RAF family of serine/threonine protein kinases which are key regulators of the MAPK cascade. Activating BRAF mutations are harbored in certain cancers as in melanoma (50%), thyroid cancer (35-70%), colorectal cancer (5-20%), liver cancer (~14%) and ovarian cancer (~30%). BRAF-V600E is the most frequent mutation leading to multiple and uncontrolled amplification of downstream signal with tumorigenesis as a result. Two selective BRAF^{V600E} inhibitors, Vemurafenib (Zelboraf) and Dabrafenib (Tafinlar), have been already approved for the treatment of unresectable and metastatic BRAF mutated melanoma. However, their efficacy is limited due to intrinsic resistance or the development of acquired resistance. Besides, in the context of wild-type BRAF cells bearing upstream activation (RAS, receptor tyrosine kinase), treatment with BRAF-V600E inhibitors leads to the paradoxical enhancement of MAPK signaling, resulting in enhancement of wt-tumour growth and adverse effects. For that reason combined treatments are being tested with very good clinical outcomes. A new generation of BRAF V600E inhibitors (PLX7904 and PLX8394), being capable of overcoming the MAPK paradoxical activation, has been discovered recently and are currently in clinical investigations.

In this thesis, we have conducted a virtual screening approach, utilizing structure based pharmacophore modeling and *in silico* docking, towards the identification of novel, selective BRAF^{V600E} inhibitors which potentially could be less prone to resistance and avoid the paradox enhancement of MAPK pathway in wt-BRAF cells. Pharmacophore model generation was based on the top-ranked features extracted from the respective models originated from the crystal complexes of BRAF^{V600E} with the paradox breaker PLX7904 (pdb: 4xv1) and Dabrafenib (pdb: 4xv2). We validated our models by utilizing a library of actives and inactives recovered by ChEMBL database. ZINC database (12M compounds) was queried against the generated pharmacophore models and the selected compounds based on the

pharmacophore fit score we refiltered according to a defined set of physicochemical properties. . The filtered compounds were evaluated for their *in silico* binding at the BRAFV600E active site using Glide HTVS and SP and Induced Fit Docking protocol. The best ranked molecules were further analysed for their drug-likeness properties.

The process qualified a final dataset of molecules capable of developing strong interactions with the crucial amino acids of the binding site, and predicted to bear a satisfactory ADME profile.

Our future plans include the purchase of the qualified molecules and the *in vitro* assessment of their inhibitory activity and selectivity against BRAFV600E.

5 Οδηγός Εικόνων

Εικόνα 1 Πάπυρος του Ebers

Εικόνα 2 Πάπυρος του Ramesseum

Εικόνα 3 Περί ύλης ιατρικής

Εικόνα 4 OswaldSchmiedeberg

Εικόνα 5 Αντιπαράθεση του διαγράμματος της εξέλιξης των τεχνολογιών κατά τον Bezdek και της εξέλιξης του υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων κατά τον VanDrie

Εικόνα 6 Στάδια ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου συναρτήσει του συνολικού χρόνου έρευνας

Εικόνα 7 Μέσο κόστος ανάπτυξης φαρμάκων ανά δεκαετία

Εικόνα 8 Πορεία εργασίας και εφαρμογές του Υπολογιστικού Σχεδιασμού φαρμάκων στη διαδικασία έρευνας για ένα νέο σκεύασμα.

Εικόνα 9 Φαρμακοφόρο μοντέλο 4XV2 κατασκευασμένο με το πρόγραμμα LigandScout

Εικόνα 10 Επιλογή μορίων από βάση ενώσεων με την χρήση φαρμακοφόρου μοντέλου

Εικόνα 11 Καμπύλη ROC

Εικόνα 12 Διάγραμμα ροής βασικών βημάτων Μοριακής Πρόσδεσης

Εικόνα 13 Διάγραμμα ροής βασικών βημάτων προετοιμασίας προσδετών

Εικόνα 14 Διάγραμμα ροής βασικών βημάτων προετοιμασίας πρωτεϊνών

Εικόνα 15 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) και η λειτουργία του σε φυσιολογικά κύτταρα

Εικόνα 16 BRAF μεταλλάξεις στον καρκίνο.

Εικόνα 17 Η δομή της B-RAF παρουσιάζεται σχηματικά. Μοντέλο της περιοχής της κινάσης BRAF στην ενεργή της διαμόρφωση βασισμένο στην κρυσταλλική δομή pdb: 3D4Q Διαμόρφωση της περιοχής της κινάσης στην ενεργή (pdb: 4MNE, σύμπλοκο του BRAF-wt με το MEK1) και την ανενεργή διαμόρφωση (pdb: 4RZV, σύμπλοκο BRAF-wt με R509H: vemurafenib).

Εικόνα 18 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της έλικας αC και του βρόχου ενεργοποίησης (AS-H1) .

Εικόνα 19 Δομή και δράση αναστολέα πρώτης γενιάς Sorafenib (BAY-439006)

Εικόνα 20 Δομή και δράση αναστολέων δεύτερης γενιάς vemurafenib και dabrafenib

Εικόνα 21 Μηχανισμοί ανάπτυξης επίκτητης αντίστασης στους BRAF^{V600E} αναστολείς

Εικόνα 22 Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του μονοπατιού MAPKκατόπιν χορήγησης αναστολέα BRAF^{V600E} σε κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη και σε κύτταρα που είναι wt-BRAF υποδεικνύοντας την παράδοση ενεργοποίησης του MAPK στα τελευταία⁶²

Εικόνα 23 Μηχανισμός δράσης αναστολέων RAF

Εικόνα 24 Αναστολείς τρίτης γενιάς (paradox breakers), plx7904 και plx8394.

Εικόνα 25 Προτεινόμενος μοριακός μηχανισμός δράσης των paradox breakers.

Εικόνα 26 Υπολογιστικό περιβάλλον LigandScout

Εικόνα 27 Υπολογιστικό περιβάλλον Schrodinger

Εικόνα 28 Φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση το Dabrafenib (4XV2) το οποίο δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία.

Εικόνα 29 Βήματα της διαδικασίας βελτιστοποίησης του φαρμακοφόρου μοντέλου στο πρόγραμμα LigandScout

Εικόνα 30 Τρία διαφορετικά στάδια στην πορεία βελτιστοποίησης του φαρμακοφόρου με διαφορετικές αφαιρέσεις Features

Εικόνα 31 Συχνότητα εμφάνισης αλληλεπιδράσεων μεταξύ BRAF^{V600E} και BRAF-wt

Εικόνα 32 Βελτιστοποιημένο φαρμακοφόρο μοντέλο με την διατήρηση Features που αντιστοιχούν στις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με μόρια αναστολείς.

Εικόνα 33 Χρήση της επιλογής του ορισμού ενός στοιχείου του φαρμακοφόρου ως προαιρετικό .

Εικόνα 34 Καμπύλη ROC βελτιστοποιημένου μοντέλου plx7904

Εικόνα 35 (A) Βελτιστοποιημένο φαρμακοφόρο του Dabrafenib. (B) Βελτιστοποιημένο φαρμακοφόρο του plx7204

Εικόνα 36 Καμπύλη ROC ύστερα από την χρήση και των δύο φαρμακοφόρων με τον λογικό τελεστή «or»

Εικόνα 37 Ροή εργασιών (Workflow) στο περιβάλλον Knime ενσωματώνοντας τους κόμβους του Schrodinger για την αυτοματοποίηση του φιλτραρίσματος των επιλεγέντων ενώσεων από την εικονική σάρωση με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Εικόνα 38 Απεικόνιση του πλήθους των ενώσεων σε όλα τα στάδια της εικονικής σάρωσης. Και εύρος τιμών φυσικοχημικών ιδιοτήτων

6 Οδηγός πινάκων

Πίνακας 1 Εξισώσεις συντελεστών εμπλουτισμού όπου N το πλήθος ενώσεων

Πίνακας 2 Κριτήρια και ενδεικτικές τιμές φυσικοχημικών ιδιοτήτων φαρμάκων και ενώσεων οδηγών

Πίνακας 3 Κατηγοριοποίηση ενώσεων βάση της τιμής IC₅₀

Πίνακας 3 Τμηματοποίηση της ZincDB με βάση το μοριακό βάρος των ενώσεων και απεικόνιση του πλήθους των μορίων που έχει η κάθε μία υποομάδα

Πίνακας 4 Τιμές φυσικοχημικών ιδιοτήτων που επιλέχθηκαν από την εικονική σάρωση

Πίνακας 5 Μέθοδοι Docking που χρησιμοποιήθηκαν σε σειρά αυξανόμενης πολυπλοκότητας συναρτήσει του πλήθους των μορίων και του χρόνου περάτωσης της διαδικασίας

Πίνακας 7 Πρόβλεψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων (QikProp-Schrodinger v5.2)

Πίνακας 8 Στοιχεία τελικών αποτελεσμάτων

7 Εισαγωγή.

7.1 Ιστορικά Στοιχεία.

7.1.1 Από τον πάπυρο στον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων.

Η λέξη φάρμακο δεν έχει μια ξεκάθαρη ετυμολογική ιστορική προέλευση. Πιθανολογείται ότι προέρχεται από την αρχαία Ελλάδα, από τις λέξεις οίκος και φέρω, σημαίνοντας θεραπεία. Ταυτόχρονα εικάζεται ότι μπορεί να προέρχεται από την αιγυπτιακή ρίζα *rahr* που σημαίνει κάτι με μαγικές ιδιότητες. Σήμερα, ως φάρμακο ορίζεται οποιαδήποτε μορφή προϊόντος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θεραπεία περιέχοντας μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες σε συγκεκριμένη ποσότητα¹

Από διάφορες ιστορικές καταγραφές φαίνεται ότι οι πρώτες πηγές φαρμάκων



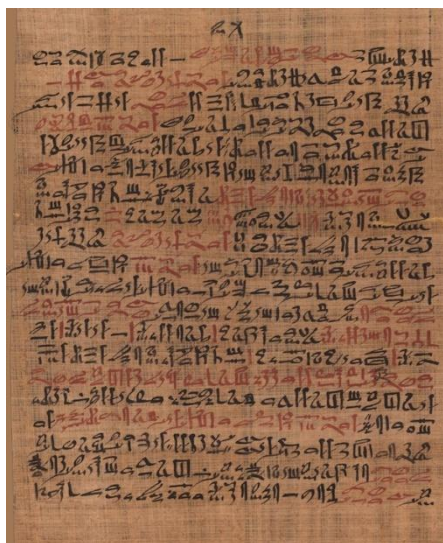
Εικόνα 1 Πάπυρος του Ebers-
<https://www.ub.uni-leipzig.de>

ήταν διάφορα φυτά ή ζώα καθώς και ανόργανες ενώσεις^{2,3}. Η θεραπεία διαφόρων ασθενειών αποτελούσε πάντα πρόκληση για τους ανθρώπους. Από τα αρχαία χρόνια οι Αιγύπτιοι, οι Ινδοί, οι Έλληνες και οι Κινέζοι παραθέτουν σε αρχαία κείμενα τις εκτενείς καταγραφές διαφόρων ειδών φαρμακευτικών

φυτών και διαδικασιών παρασκευής φαρμάκων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως αυτά τα συγγράμματα θα πρέπει να εξαιρούνται από τις κατηγορίες των εγχειριδίων περί φαρμακευτικών ουσιών ή φυτών καθώς αποτελούν κυρίως διάσπαρτες επιστημονικές γνώσεις, οι οποίες συγκεντρώθηκαν μέσω του προφορικού λόγου.

Κοινό χαρακτηριστικό έχουν την συμμετοχή θεϊκών δυνάμεων στην κατάκτηση των συγκεκριμένων θεραπευτικών γνώσεων, είτε αυτές προέρχονται από την Αίγυπτο, την Ινδία, την Ελλάδα είτε την Κίνα. Οι αιγυπτιακοί ιατρικοί πάπυροι θεωρούνται από τα αρχαιότερα ιατρικά γραπτά κείμενα. Περίπου Από το 2000 π.Χ. έως και το 1500 π.Χ. θεωρείται πως ο πάπυρος του Ramesseum (Εικόνα 2) είναι το αρχαιότερο κείμενο, το οποίο έχει βρεθεί να σχετίζεται με θεραπεία ασθενειών. Χρονολογείται γύρω στα 1800 π.Χ. Περιέχει μεθόδους

ίαςης διαφόρων ασθενειών, παραδείγματος χάρη παθήσεις που προέρχονται από τοξική σκόνη, αναφορά η οποία συμπίπτει χρονολογικά με την έκρηξη του ηφαιστείου της Σαντορίνης. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά κείμενα, τα οποία διασώζονται από την Αίγυπτο, ονομάζεται πάπυρος του Ebers (1550π.Χ) (Εικόνα 1) και περιέχει διάφορες μεθόδους θεραπείας καθώς ,επίσης και ορισμένα φυτά, τα οποία βοηθούσαν στην διαδικασία της ίασης. Χαρακτηριστικό αποτελεί η χρήση των σπόρων της τιντιλίδας ή αλλιώς τριγωνέλλα η ελληνική, με σκοπό την ίαση διαφόρων δερματικών καταστάσεων, όπως οι ρυτίδες ή φακίδες ή άλλες ασθένειες, οι οποίες οφείλονταν στη γήρανση. Διατηρώντας την ιδιαίτερη σχέση των Αιγυπτίων με τους θεούς τους, οι γραφείς των παπύρων τόνιζαν στα περισσότερα από τα



Εικόνα 2 Πάπυρος του Ramesseum-
<http://www.britishmuseum.org/>

συγγράμματά τους πως τις γνώσεις για τη θεραπεία ασθενειών, οι οποίες καταγράφονται, τους τις έχει δώσει ο Θεός Τωθ, ο οποίος ήταν συνυφασμένος με την σοφία και τη λογική.

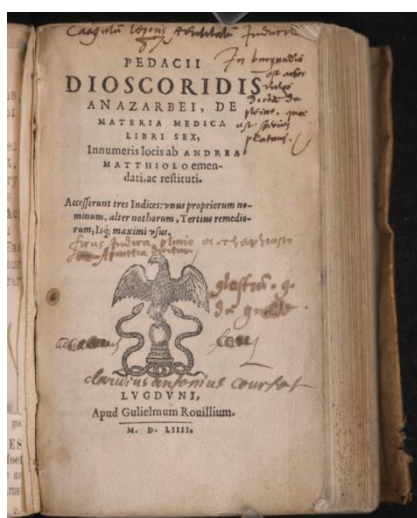
Ιατρικά κείμενα, στα οποία συναντάμε χρήση διαφόρων φυτών ως φάρμακα, συναντάμε και σε άλλους πολιτισμούς της αρχαιότητας, όπως οι Ινδοί, οι Έλληνες και οι Κινέζοι. Στο Ινδικό βιβλίο sushrata sambita, το οποίο

θεωρείται ένα από τα αρχαιότερα σανσκριτικά κείμενα, χρονολογείται περίπου

γύρω στο 600 π.Χ. Χαρακτηριστική ομοιότητα με αυτή του αιγυπτιακού πολιτισμού είναι πως οι γνώσεις της Ayurveda, όπως αποκαλείται η αρχαία ινδική ιατρική, δόθηκε στους ανθρώπους από τον Θεό Dhavantari, ο οποίος παραλληλίζεται με τον Θεό Κρίσνα. Ένα πολύ ενδιαφέρον παράδειγμα της χρήσης της αρχαίας ινδικής ιατρικής και φαρμακολογίας στη σύγχρονη εποχή αποτελεί η εφαρμογή της Ayurveda στην Ρωσία την περίοδο μετά την καταστροφή του Τσερνόμπιλ και ως τις αρχές του 2000.⁴

Στην αρχαία Ελλάδα από τους πιο γνωστούς θεραπευτές, οι οποίοι ασχολήθηκαν και με τα φάρμακα, υπήρξαν ο Γαληνός και ο Διοσκουρίδης. Και

οι δύο έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην καταγραφή της χρήσης διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών κατά την θεραπεία. Ειδικότερα ο Διοσκουρίδης στο έργο του περί ύλης ιατρικής (Εικόνα 3) παραθέτει περίπου 600 φυτά καθώς και ορισμένα ζώα και ορυκτά στοιχεία από τα οποία προέρχονταν έως και 1.000 διαφορετικά φάρμακα. Ο Γαληνός, ο οποίος τοποθετείται περίπου στα 129 -210 μ.Χ., παρέθεσε διάφορα συγγράμματα περί φιλοσοφίας, φυσιολογίας, φαρμακολογίας και νευρολογίας γραμμένα στην αρχαία ελληνική. Αντίθετα τα έργα του Διοσκουρίδη ήταν γραμμένα στα Λατινικά. Αυτό το γεγονός λόγω και της χρονικής περιόδου κατά την οποία γράφτηκαν τα κείμενα, έδωσε τη δυνατότητα στον Διοσκουρίδη να διαδοθεί περισσότερο στην Δυτική Ευρώπη. Παρόλα αυτά και ο Γαληνός χωρίς καμία αμφιβολία επηρέασε τόσο τις ιατρικές καταγραφές της εποχής του όσο και τους



Εικόνα 3 Περί ύλης ιατρικής
Διοσκουρίδης-
<http://exhibits.hsl.virginia.edu>

μεταγενέστερους. Κατά την εποχή της Αναγέννησης κείμενα και των δύο μεταφράστηκαν και διαβάστηκαν από ανθρώπους της εποχής. Χαρακτηριστική είναι η απήχηση που είχαν τα κείμενα του Γαληνού στον Αραβικό και Ισλαμικό κόσμο την περίοδο 800-900 μ.Χ., όπως προκύπτει από τις μεταφράσεις. Αναμφίβολα η συμβολή τους μαζί με αυτή του Ιπποκράτη στην ιστορία της φαρμακολογίας αλλά και της Ιατρικής γενικότερα επηρέασε σε πάρα πολύ μεγάλο βαθμό την πορεία της επιστήμης.

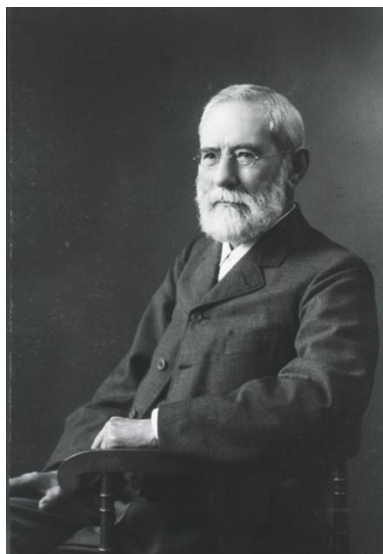
Ο κινεζικός πολιτισμός, ιδιαίτερα την περίοδο έως και πριν την Ευρωπαϊκή Αναγέννηση, έχει να υποδείξει ιδιαίτερα καλώς, ορισμένες καταγραφές σε σχέση με τη χρήση διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών, οι οποίες κατά κύριο λόγο προέρχονταν από φυτά. Με σημαντικότερες τα βιβλία Shennong Bencaojing και Compendium of Material Medica.

Κατά την περίοδο του Μεσαίωνα και μετέπειτα στα χρόνια της αναγέννησης συγγράμματα σχετικά με την δημιουργία σκευασμάτων φαίνεται να παίρνουν τη βάση τους από αρχαία κείμενα του Γαληνού και του Διοσκουρίδη και της ινδικής Ayurveda. Ταυτόχρονα και η οι περιοχές της ανατολής είχαν κοινές

επιρροές. Στον Ευρωπαϊκό κόσμο χαρακτηριστικά ονόματα που έπαιξαν ρόλο τόσο στην καταγραφή όσο και τη διατήρηση της αρχαίας γνώσης γύρω από τα φάρμακα ήταν οι Ermolao Barbaro, Jean Ruel, Pietro Andrea, Mattioli, οι οποίοι στο γενικότερο κλίμα της επανεξέτασης αρχαίων ελληνικών κειμένων κατά την αναγέννηση άλλαξαν και ανατύπωσαν έργα Ελλήνων θεραπευτών.¹

7.1.2 Ο σχεδιασμός φαρμάκων μετά τον 19ο αιώνα μέχρι σήμερα.

Είναι δύσκολο να προσδιορίσουμε ένα σαφές χρονικό πλαίσιο στο πότε ξεκίνησε η επιστήμη του σχεδιασμού φαρμάκων. Είναι σαφές πως οι αρχαίες καταγραφές αποτελούσαν περισσότερο μία εμπειρική προσέγγιση παραδοσιακών εφαρμογών των ιδιοτήτων των φυτών παρά προσπάθεια για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Αν και πάρα πολλοί επιστήμονες και γιατροί έκαναν φαρμακολογικές μελέτες, η πρώτη φορά που ο σχεδιασμός φαρμάκων θεωρήθηκε ξεχωριστός επιστημονικός κλάδος ήταν, όταν δόθηκε η πρώτη πανεπιστημιακή έδρα στον Rudolf Buncheim στο πανεπιστήμιο του Ντόρπτα στην Εσθονία. Ο τίτλος πατέρας της φαρμακολογίας δίνεται σε έναν μαθητή



Εικόνα 4 Oswald Schmiedeberg,
1838–1921-
<http://resource.nlm.nih.gov/1014285>
18

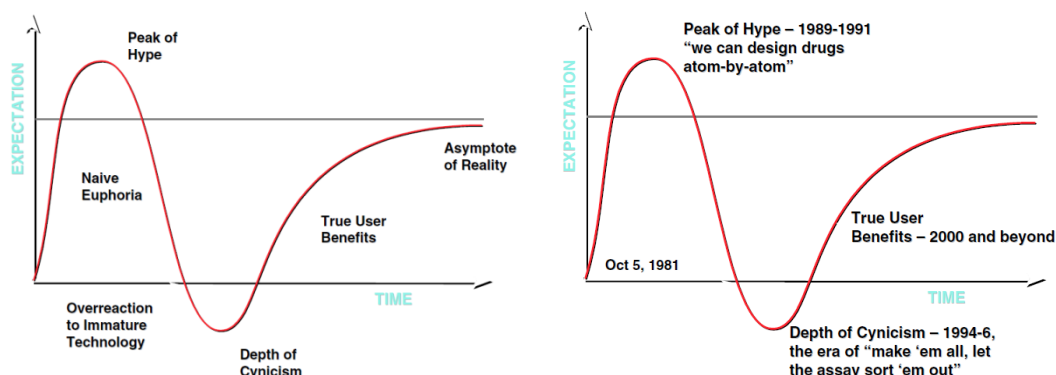
του Buncheim, τον Oswald Schmiedeberg (Εικόνα 4), ο οποίος στην πολυετή του καριέρα στο Πανεπιστήμιο του Στρασβούργου μελέτησε την δράση διαφόρων χημικών ουσιών σαν φαρμακευτικά σκευάσματα όπως η φεριπίνη, η μουσκαρίνη και το υαλουρονικό οξύ^{5,6}.

Με την ανάπτυξη της επιστήμης της βιοπληροφορικής έγινε σημαντική πρόοδος στον τομέα του σχεδιασμού φαρμάκων καθώς διαδικασίες, οι οποίες ήταν ταυτόχρονα χρονοβόρες και πολύ ακριβές, αντικαταστάθηκαν από υπολογιστικές μεθόδους που ταυτόχρονα εξοικονομούσαν χρόνο και χρήματα.

Η χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή σε διαδικασίες όπως η δημιουργία βιβλιοθηκών και βάσεων δεδομένων, η βελτιστοποίηση μορίων αλλά και η διαδικασία της σάρωσης (screening), έδωσαν αποτελέσματα τα οποία επέτρεψαν στον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων να αναγνωριστεί από την επιστημονική κοινότητα.

Έως και τη δεκαετία του 1980 ο σχεδιασμός φαρμάκων ήταν καθαρά εργαστηριακή διαδικασία, η χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή δεν αποτελούσε άμεση επιλογή. Παρόλα αυτά με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών γύρω από

τον χώρο των υπολογιστών και την εγκαθίδρυση της επιστήμης της βιοπληροφορικής, ο υπολογιστικός σχεδιασμός φαρμάκων δεν άργησε να πάρει ένα πρωταγωνιστικό ρόλο στην διαδικασία εύρεσης νέων φαρμακευτικών ουσιών.



Εικόνα 5 Αντιπαράθεση του διαγράμματος της εξέλιξης των τεχνολογιών κατά τον Bezdek (αριστερά) και της εξέλιξης του υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων κατά τον VanDrie (δεξιά). Σύμφωνα με τον πρώτο οι νέες τεχνολογίες τείνουν να ακολουθούν την αυτή εξελικτική πορεία αρχής γενομένης με μία πρώιμη υπερβολική στάση ως προς τις ικανότητες που θεωρείται ότι διαθέτουν γεγονός που οδηγεί σε μια υπεράνω ρεαλισμού κορύφωση αυτής της κατάστασης έως ότου η υπερευαίσθητη φάση αντικατασταθεί από την υπερδυσόληνη φτάνοντας στην εκ διαμέτρου αντίθετη κατάσταση αυτή της απόλυτης κυνικότητας. Με την έναρξη της αποκατάστασης της ισορροπίας αναγνωρίζονται και τα πραγματικά οφέλη των τεχνολογιών που έχουν προκύψει. Παρόμοια η ιστορία του ΥΣΦ πέρασε τις αντίστοιχες καταστάσεις από την υπερβολική θεώρηση της δημιουργίας 100% φαρμάκων *insilico* στις αρχές του 1990 μέχρι την αρχή της εμφάνισης των πραγματικών θετικών αποτελεσμάτων από *insilico* τεχνικές από το 1997 και μέχρι σήμερα.

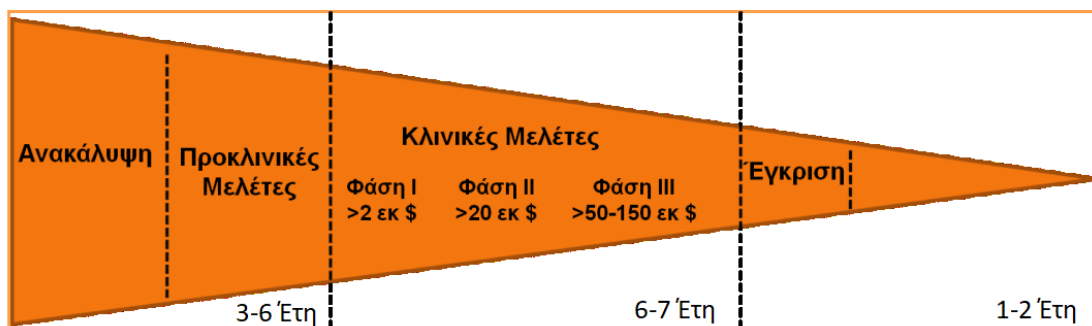
Στα πρώιμα στάδιά του αποτέλεσε μία άκρως επαναστατική ιδέα, οδηγώντας την επιστημονική κοινότητα στο να διαθέσει υπέρογκη ποσότητα πόρων έχοντας ιδιαίτερα μεγάλες προσδοκίες (Εικόνα 5). Αφενός μεν οι προσδοκίες δεν επιβεβαιώθηκαν αφετέρου και στην πορεία των χρόνων τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τον υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων επαναξιολογήθηκαν και αποσαφηνίστηκε η σημαντικότητά τους (Εικόνα 5). Με αυτό τον τρόπο ο υπολογιστικός σχεδιασμός φαρμάκων εντάχθηκε στην ερευνητική διαδικασία^{7,8}

7.2 Υπολογιστικός Σχεδιασμός Φαρμάκων

7.2.1 Γενικά στοιχεία

Ο σχεδιασμός και η δημιουργία καινούργιων φαρμακευτικών σκευασμάτων αποτελεί μία διαδικασία η οποία είναι ταυτόχρονα και πολυέξοδη αλλά και χρονοβόρα. Ένα φάρμακο για να βγει στην αγορά χρειάζεται κατά μέσο όρο 10 με 15 χρόνια⁸.

Χρειάζονται πάνω από 2,5 δισεκατομμύρια δολάρια για να δημιουργηθεί ένα καινούργιο φάρμακο με ένα μεγάλο μέρος από αυτά να οφείλεται στις αποτυχημένες προσπάθειες των φαρμακευτικών εταιριών⁹(Εικόνα 6). Τα τελευταία 50 χρόνια η αύξηση της αυστηρότητας αλλά και του πλήθους των κριτηρίων, τα οποία εφαρμόζονται κατά τον σχεδιασμό ενός φαρμάκου, οδηγούν σε μεγάλη αύξηση του πλήθους των σκευασμάτων που απορρίπτονται (90%), γεγονός που οδηγεί στην αύξηση του κόστους παρασκευής^{9,10}(Εικόνα 7).



Εικόνα 6 Στάδια ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου συναρτήσει του συνολικού χρόνου έρευνας (TuftsCenterfortheStudyofDrugDevelopmentCSDD)

Τα πρώτα στάδια της δημιουργίας ενός νέου φαρμάκου, η μελέτη και η ανακάλυψη του, δηλαδή, καταλαμβάνει κατά μέσο όρο 3 με 6 χρόνια. Στη συνέχεια ακολουθούν *in vitro* και *in vivo* πειράματα σε πειραματόζωα¹¹, έτσι ώστε να διαπιστωθεί, εάν οι προς μελέτη χημικές ουσίες είναι τηρούν τα κατάλληλα κριτήρια (Investigational New Drug Process-IND¹²)για να συνεχιστούν σε κλινικές μελέτες σε ανθρώπους. Αυτές που περνάνε και αυτή τη δοκιμασία είναι εκείνες, οι οποίες θα δοκιμαστούν κλινικά σε ασθενείς.

Υπάρχουν τρεις φάσεις κλινικών μελετών για να κριθεί ένα φάρμακο κατάλληλο για διανομή στην αγορά. Ο μέσος χρόνος είναι περίπου επτά χρόνια.

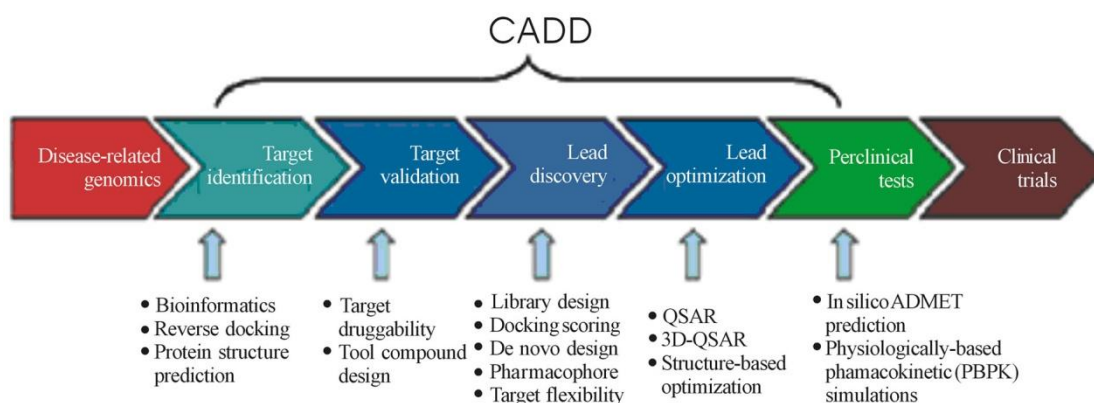


Στην πρώτη φάση μία μικρή ομάδα εθελοντών δοκιμάζει ένα νέο φάρμακο για να ελέγξει την ασφάλεια του και το πώς μεταβολίζεται στον οργανισμό. Στην δεύτερη φάση μία ομάδα από 100 έως 500 άτομα, τα οποία νοσούν από μία ασθένεια, την οποία δύναται να

θεραπεύσει το φάρμακο, κάνουν χρήση του σκευάσματος. Σε αυτή την φάση ελέγχεται η δοσολογία και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Τέλος στην τρίτη φάση το εύρος των εθελοντών αυξάνεται κατά πολύ και αγγίζει πολλές φορές και τα 5.000 άτομα. Μέσω της τρίτης φάσης φαίνονται αποτελέσματα για την σχέση οφέλους και κινδύνου για τον ασθενή. Για να δοθεί η τελική έγκριση αρμόδιες αρχές(FDA, EMA) ελέγχουν τα αποτελέσματα των δοκιμών. Ακόμα και μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά, το φάρμακο παρακολουθείται συνεχώς για τυχόν αναφορές παρενεργειών, μια διαδικασία που ονομάζεται φαρμακοεπαγρύπνηση¹².

Το γεγονός ότι υπάρχει ένα μεγάλο ποσοστό αποτυχίας στην πορεία ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου οφείλεται, κυρίως, σε προβλήματα φαρμακοκινητικής, έλλειψη αποτελεσματικότητας του φαρμάκου και τοξικότητας. Για τον λόγο αυτό υπήρξε η ανάγκη να δημιουργηθούν οι μέθοδοι, οι οποίες θα είχαν ένα υψηλότερο ποσοστό επιτυχίας¹⁰. Αυτή την ανάγκη ήρθε να υποστηρίξει η πρόοδος σε τομείς σχετιζόμενων με το σχεδιασμό φαρμάκων όπως η βιοτεχνολογία, η χημεία και πληροφορική. Μεγάλο βήμα πρόοδου για το σχεδιασμό νέων φαρμάκων έγινε με τις ανακαλύψεις σε τομείς όπως η πρωτεομική και η γονιδιωματική με την

ταυτόχρονη αξιοποίηση των ηλεκτρονικών υπολογιστών.(Εικόνα 8) Δημιουργήθηκε έτσι μία νέα εποχή στο σχεδιασμό φαρμάκων, η εποχή του ορθολογικού σχεδιασμού ή αλλιώς του σχεδιασμού με βάση τη δομή. Πλέον η ίδια η ασθένεια αποτελεί την οδό για τη δημιουργία ενός νέου φαρμάκου χάρη στην κατανόηση τόσο του κυτταρικού όσο και του μοριακού μηχανισμού της^{13,14}.



Εικόνα 8 Πορεία εργασίας και εφαρμογές του Υπολογιστικού Σχεδιασμού φαρμάκων στην διαδικασία έρευνας για ένα νέο σκεύασμα. (B. Hammer, "Recurrent Networks for Structured Data— A Unifying Approach and its Properties," *Cognitive Systems Research*, Vol. 3, No. 2, 2002, pp. 145-165)

Κατά την έρευνα για ένα καινούριο φάρμακο ο υπολογιστικός σχεδιασμός φαρμάκων είναι ικανός να αυξήσει το πλήθος των πιθανών δραστικών ενώσεων λόγω του γεγονότος ότι χρησιμοποιεί πολύ πιο στοχευμένες μεθόδους από τις παραδοσιακές εργαστηριακές όπως το High throughput screening (HTS) το οποίο παρά το γεγονός πως μπορεί να ελέγξει μεγάλες βιβλιοθήκες σε μικρό χρονικό διάστημα με την χρήση ρομποτικών συστημάτων και λόγω της χρονοβόρας και περίπλοκης διαδικασίας επιβεβαίωσης των μεθόδων του εξακολουθεί να έχει μικρό ποσοστό επιτυχίας. Ο ΥΣΦ καθώς αποτελεί μέθοδο που απαιτεί πολύ λιγότερο χρόνο προετοιμασίας δίνει την δυνατότητα εξαιρέσεις ενώσεων οι οποίες είναι ανενεργές σε πολύ αρχικά στάδια της έρευνας .

Δεν είναι μόνο το γεγονός πως προσπαθεί να εξηγήσει τη θεραπευτική λειτουργία σε μοριακό επίπεδο, μα ακόμα επιχειρεί να προβλέψει και πιθανές παράγωγες καταστάσεις των αρχικών ουσιών με βελτιωμένη ενεργότητα.

Στη διαδικασία του σχεδιασμού φαρμάκων ο υπολογιστικός σχεδιασμός χρησιμοποιείται κυρίως για τρεις λόγους. Πρώτον διερευνά μεγάλες βιβλιοθήκες και καταλήγει σε συγκεκριμένο πλήθος πιθανώς ενεργών ουσιών, τα οποία πρέπει να ελεγχθούν και πειραματικά. Δεύτερον στην βελτιστοποίηση των βιοδραστικών μορίων με σκοπό να βελτιώσει τις φαρμακοκινητικές και μεταβολικές τους ιδιότητες συμπεριλαμβανομένων της απορρόφησης, της διάχυσης και της τοξικότητας. Τρίτον στον σχεδιασμό νέων ενώσεων είτε με τη διαδικασία της ανάπτυξης ενός μορίου από ένα μικρότερο αρχικό μόριο είτε από την συρραφή τμημάτων σε μία ένωση.

Οι τεχνικές του ΥΣΦ βασίζονται σε αρχές και μεθόδους της κβαντικής χημείας και είναι ευρύτερα γνωστές με τον όρο *insilico* τεχνικές¹⁵, κατά αντιστοιχία του *in vitro* και *in vivo*. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα τους είναι η ταχεία ανάλυση και αξιοποίηση βιολογικών και ιατρικών δεδομένων που αντλούνται από διάφορες πηγές. Οι παραπάνω πληροφορίες χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία υπολογιστικών μοντέλων προσομοίωσης¹⁶. Οι τεχνικές αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιλογή των ενώσεων που έχουν υψηλές πιθανότητες να οδηγήσουν σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα (ένωσης οδηγού), έτσι ώστε να μειωθεί το ποσοστό των αποτυχημένων προσπαθειών κατά τις κλινικές δοκιμές. Τα πρώτα αποτελέσματα σχεδιασμού φαρμάκων με χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή εμφανίστηκαν στις αρχές του 1990. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το Tacrine και το Relenza όπου στην πορεία κατασκευής τους μέσω της μεθόδου της πρόσδεσης που θα αναλύσουμε παρακάτω εντοπίστηκαν οι πρωτεϊνικές οικογένειες που έπρεπε να στοχευθούν^{17,18}.

Η διαδικασία του σχεδιασμού φαρμάκων με την χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή χρησιμοποιεί διάφορες μεθόδους περιλαμβανομένων τον έλεγχο χημικής ομοιότητας μέσω αποτυπωμάτων ή τοπολογίας, την επιλογή μορίων μέσω πρόβλεψης της βιολογικής τους λειτουργίας με QSAR, των έλεγχο φαρμακοφόρων μοντέλων ή την εικονική πρόσδεση σε στόχο (docking). Όσο

μειώνονται τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται τεχνικές αυξανόμενης ακρίβειας και αντιστρόφως ανάλογες του χρόνου περάτωσης τους, οι οποίες θα ήταν ιδιαίτερα χρονοβόρες αν εφαρμόζονταν στο συνολικό πλήθος των στόχων.

Ο υπολογιστικός σχεδιασμός φαρμάκων έχει δύο προσεγγίσεις. Structure-based drug design (Κατασκευή φαρμάκων με βάση την δομή του υποδοχέα) και Ligand-based drug design (Κατασκευή φαρμάκων με βάση την δομή του προσδέτη). Ο SB-DD βασίζεται στην ύπαρξη της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης στόχου. Το SB-DD εφαρμόζεται, όταν υπάρχουν δομικά δεδομένα μιας πρωτεΐνης στόχου, ενώ το LB-DD προτιμάται, όταν δεν υπάρχει καθόλου δομική πληροφορία. Η χρήση το LB-DD περιέχει την ανάλυση δυσδιάστατων και τρισδιάστατων δομών προσδετών οι οποίοι αποδειγμένα αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη στόχο. Στηρίζεται στην Αρχή των Κοινών Ιδιοτήτων που εισήγαγαν οι Johnson et al. το 1990. Ο σκοπός της διαδικασίας είναι να παραχθεί ένα αποτέλεσμα στο οποίο θα περιέχονται οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις και θα εξαιρούνται οι μη σημαντικές. Υπάρχουν δύο βασικές προσεγγίσεις στο LB-DD πρώτον η επιλογή ενώσεων που ομοιάζουν χημικά με ήδη γνωστές ενεργές ενώσεις και δεύτερον η χρήση μοντέλων QSAR ικανά να προβλέψουν την χημική δράση των ενώσεων από την δομή τους. Η βασική τους διαφορά έγκειται στο γεγονός πως η πρώτη προσέγγιση βαθμονομεί τα στοιχεία με βάση την επίδραση τους στην βιολογική δράση που στοχεύεται. Στην περίπτωση του SB-DD με την χρήση των δομικών πληροφοριών που υπάρχουν κατατεθειμένες στις διάφορες βάσης δεδομένων (π.χ PDB) υπάρχει η αρχή ένα βιολογικό αποτέλεσμα που έρχεται ως προϊόν της αλληλεπίδρασης ενός προσδέτη με μία πρωτεΐνη στόχο εξαρτάται από την ικανότητα αλληλεπίδρασης του προσδέτη με ένα συγκεκριμένο τμήμα της πρωτεΐνης. Σαν αποτέλεσμα αυτού μόρια που αναπτύσσουν τέτοιες αλληλεπιδράσεις με τον επιθυμητό στόχο θα έχουν και παρόμοια βιολογική δράση^{19,20}

Βασικό μέρος της διαδικασίας του υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων είναι η σάρωση βιβλιοθηκών χημικών ενώσεων. Αυτό δίνει τη δυνατότητα η εργαστηριακές διαδικασίες να εστιάσουν στην βιολογική αποτίμηση συγκεκριμένων ενώσεων που έχουν αυξημένες πιθανότητες να είναι ενεργές.

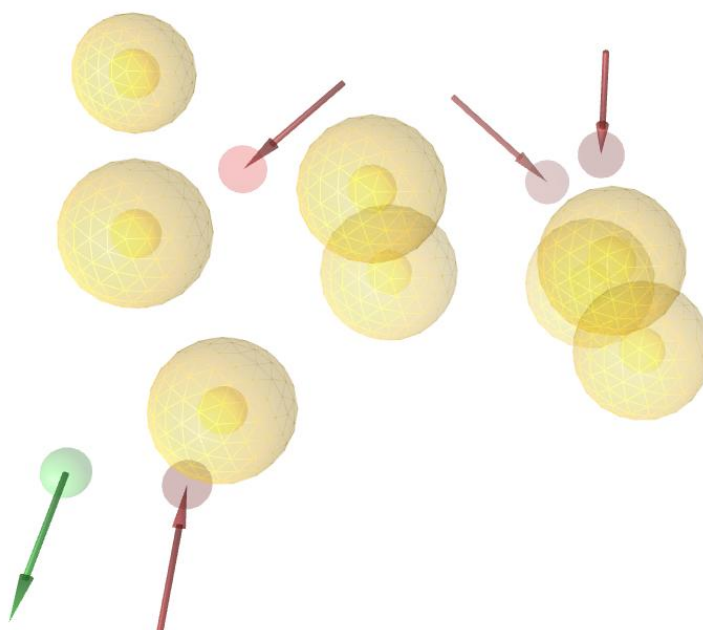
Επίσης ελέγχεται ένας κατά πολύ μικρότερος πληθυσμός ενώσεων, σε αντίθεση με μια διαδικασία HTS. Με αυτή τη στοχευμένη αναζήτηση αποφεύγεται ο έλεγχος μεγάλου αριθμού πιθανώς μη δραστικών ουσιών με αποτέλεσμα την εξοικονόμηση πόρων και χρόνου¹⁶.

Η πρώτη αναφορά σε υπολογιστική μέθοδο σάρωσης έγινε το 1997 και μέσα στα επόμενα 20 χρόνια υπήρξε μία μεγάλη παράθεση διαφορών δημοσιεύσεων για τις εφαρμογές αυτής της μεθόδου. Με τις πρωτεΐνες G και τις κινάσες να συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον²¹

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ο υπολογιστικός σχεδιασμός φαρμάκων δεν στοχεύει στο να αναγνωρίσει φάρμακα για τη χρήση τους σε κλινικές δοκιμές αλλά περισσότερο στο να αναγνωρίσει ενεργές ουσίες, οι οποίες δεν έχουν αναγνωριστεί ως ενεργές για έναν συγκεκριμένο βιολογικό στόχο. Από την αναγνώριση ενός στόχου έως την αποδοχή του και την εφαρμογή σε κλινικές μελέτες περνάει ένας διόλου ευκαταφρόνητος χρόνος αλλεπάλληλων και συνεχόμενων βελτιστοποιήσεων μέχρις ότου να θεωρηθεί η ουσία που μελετάται φάρμακο²⁰.

7.2.2 Φαρμακοφόρα μοντέλα

Φαρμακοφόρο (Εικόνα 9) σύμφωνα με την IUPAC ορίζεται «Το σύνολο των αλληλεπιδράσεων που είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση του μορίου με έναν βιολογικό στόχο και την επίτευξη ενός βιολογικού αποτελέσματος. Δεν αποτελεί ένα πραγματικό μόριο αλλά ένα μοντέλο το οποίο συνιστά μια αφαιρετική εκδοχή των ιδιοτήτων που έχουν όλες οι ενεργές ουσίες για έναν συγκεκριμένο στόχο». Οι πιο κοινές ιδιότητες είναι οι δότες και οι δέκτες υδρογόνων, οι φορτισμένες ομάδες, οι βασικές οι όξινες ομάδες και τα υδρόφοβα ή υδρόφιλα ή αρωματικά τμήματα²².



Εικόνα 9 Φαρμακοφόρο μοντέλο 4XV2 κατασκευασμένο με το πρόγραμμα LigandScout. Με κίτρινο χρώμα αναγνωρίζονται οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις με κόκκινο οι δέκτες δεσμών υδρογόνου και με πράσινο οι δότες δεσμών υδρογόνου

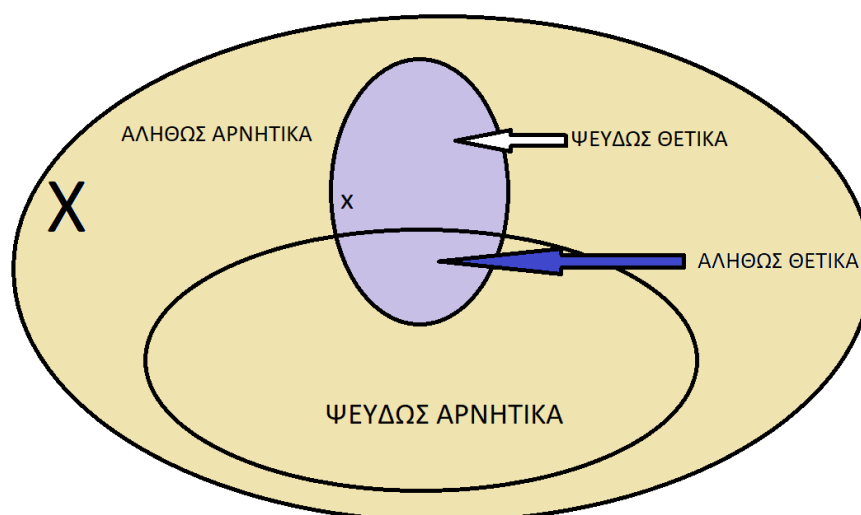
Η δημιουργία φαρμακοφόρων μοντέλων μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση διαφόρων εμπορικών προγραμμάτων όπως είναι τα : CATALYST²³, PHASE²⁴, Pharmit²⁵, LigandScout²⁶. Η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται σχετίζεται άμεσα με την πληροφορία που υπάρχει για τη δομή της πρωτεΐνης στόχου. Υπάρχουν δύο πορείες για τη δημιουργία ενός φαρμακοφόρου μοντέλου, είτε αναλύοντας την πληροφορία η οποία παρέχεται από την κρυσταλλογραφία, είτε, σε περίπτωση απουσίας δομικής πληροφορίας, από

ένα σύνολο προσδετών που αναμένεται να προσδένονται στο μόριο στόχο. Στην πρώτη περίπτωση τα χαρακτηριστικά φαίνονται από την γνωστή δομή, ενώ στη δεύτερη περίπτωση τα περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά επιλέγονται από το σύνολο των γνωστών μορίων στόχων.

7.2.3 Επικύρωση φαρμακοφόρων μοντέλων

Για να γίνει δυνατή η χρήση ενός φαρμακοφόρου μοντέλου στην διαδικασία του σχεδιασμού φαρμάκων θα πρέπει το συγκεκριμένο μοντέλο να περάσει μία διαδικασία επικύρωσης της εγκυρότητας του. Αυτή η διαδικασία θα επιβεβαιώσει πως το μοντέλο αυτό είναι ικανό ιδανικά να επιλέξει μόνο ενεργά μόρια που σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο στόχο και θα απορρίψει τα μη ενεργά. Για την επίτευξη αυτού του στόχου δημιουργούνται βιβλιοθήκες με ενώσεις επικύρωσης, οι οποίες αποτελούνται από ομάδες ενώσεων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Τόσο οι δραστικές όσο και η μη δραστικές ενώσεις πρέπει να χαρακτηρίζονται από δομική ποικιλομορφία. Για τον έλεγχο όσο το δυνατόν περισσότερων χαρακτηριστικών από το φαρμακοφόρο μοντέλο.^{27,28} Βάσεις δεδομένων όπως η ChEMBL και η OpenPHACTS συγκέντρωσαν, κατηγοριοποίησαν και δημοσίευσαν ενεργά και μη ενεργά μόρια με ένα μεγάλο εύρος ομαδοποίησης (κατά βιολογικό στόχο, πρωτεϊνική οικογένεια κτλ). Παρέχονται έτσι η δομή των ενώσεων, οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τα αποτελέσματα των βιολογικών τους δοκιμών²⁹. Ένα σημαντικό πρόβλημα που προκύπτει είναι το πολύ μικρό πλήθος των μη ενεργών ενώσεων που υπάρχουν κατατεθειμένες καθώς πολλοί ερευνητές επιλέγουν να μην δημοσιοποιήσουν ανενεργά μόρια. Με αποτέλεσμα το ισοζύγιο μεταξύ ενεργών και ανενεργών ενώσεων στις βιβλιοθήκες επικύρωσης να μην ισορροπεί. Γι αυτό το λόγο γίνεται η χρήση παραπλανητικών μορίων (decoys), δηλαδή μόρια που θεωρούνται ανενεργά και έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τις δραστικές ενώσεις αλλά πειραματικά δεν έχουν δοκιμαστεί ακόμα.³⁰

Κατά τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης των επιλεγμένων ομάδων δραστικών και μη ενώσεων, επιλέγονται μέσω του φαρμακοφόρου μοντέλου ορισμένες ενώσεις από μία βάση ενώσεων οι οποίοι αποτελείται από N μόρια. Από τις ενώσεις που ταυτίζονται με τα χαρακτηριστικά του μοντέλου και επιλέγονται, ένα ποσοστό έχει πράγματι βιολογική δράση. Αυτές οι ενώσεις ονομάζονται αληθώς θετικές (TP- True positives). Οι ενώσεις που επιλέγονται στην εικονική σάρωση, και δεν έχουν βιολογική δράση ονομάζονται ψευδώς θετικές (FP- False positives). Από την άλλη πλευρά οι ενώσεις που ούτε έχουν βιολογική δράση αλλά ούτε ταιριάζουν με τα χαρακτηριστικά του μοντέλου, ονομάζονται αληθώς αρνητικές (TN- Truenegatives), ενώ οι ενώσεις που δεν επιλέγονται από το μοντέλο αλλά έχουν βιολογική δράση, λέγονται ψευδώς αρνητικές (FN-False negatives)³¹. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10 Επιλογή μορίων από βάση ενώσεων με την χρήση φαρμακοφόρου μοντέλου το σύνολο που χρησιμοποιείται έπειτα από την σάρωση είναι το άθροισμα των ψευδώς θετικών και των αληθώς θετικών αποτελεσμάτων

Οι συντελεστές εμπλουτισμού προκύπτουν από δύο βασικές τιμές, την ευαισθησία (Se) και την εξειδίκευση (Sp) και χρησιμοποιούνται κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της σάρωσης.

$$Se = TP / (TP + FN)$$

$$Sp = TN / (TN + FP)$$

Ο συντελεστής ακριβείας (Acc)³² χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ορθότητας της ταξινόμησης των ενώσεων που περιλαμβάνονται στη βάση ενώσεων επικύρωσης. Βέλτιστος προσδιορισμός χαρακτηρίζεται από την τιμή 1.

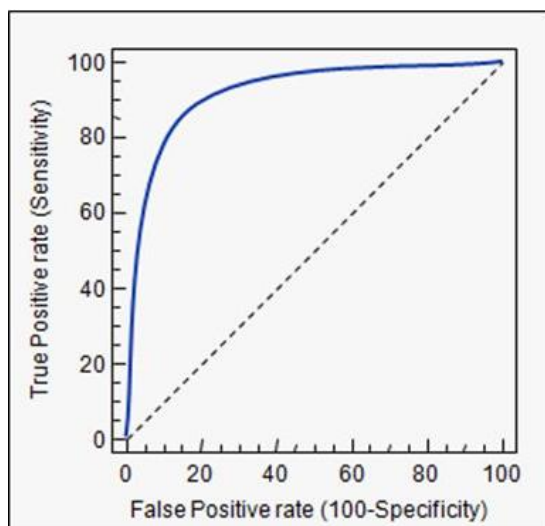
Ο συντελεστής απόδοσης δραστικών ενώσεων (Ya) περιγράφει την αναλογία των δραστικών ενώσεων προς όλες τις ενώσεις που επιλέγονται από το δημιουργημένο μοντέλο^{31,32}. Ο συντελεστής εμπλουτισμού (EF) προσδιορίζει πόσες φορές περισσότερα δραστικά μόρια ανακτώνται από το φαρμακοφόρο μοντέλο σε σύγκριση με μία τυχαία επιλογή. Αν ο συντελεστής εμπλουτισμού παρουσιάζει τιμές μεγαλύτερες από το ένα, το μοντέλο είναι καλύτερο από την τυχαία επιλογή.³³(Πίνακας 1)

Πίνακας 1 Εξισώσεις συντελεστών εμπλουτισμού όπου N το πλήθος ενώσεων

Συντελεστής Εμπλουτισμού	Εξίσωση
Ακρίβεια (Accuracy)	$Acc = (TP + TN) / N$
Απόδοση δραστικών ενώσεων (Yield of actives)	$Ya = TP / N$
Συντελεστής Εμπλουτισμού (Enrichment Factor)	$EF = (PPV) / ((TP + TN) / N)$

7.2.4 Καμπύλη Δέκτη λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROCcurve)

Η καμπύλη του δέκτη λειτουργικών χαρακτηριστικών (Receiver Operating Characteristic Curve) αποτελεί ένα εργαλείο αξιολόγησης των παραγόμενων φαρμακοφόρων μοντέλων. Γενικά ισχύει $Se = 100 - Sp$ (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 Καμπύλη ROC

Η κλίση της καμπύλης ROC βοηθά στην εξαγωγή συμπερασμάτων για το μοντέλο που έχει δημιουργηθεί. Δηλαδή, αν η κλίση της καμπύλης είναι απότομη στην αρχή, δείχνει ότι από τις ενώσεις που ταιριάζουν καλύτερα στο μοντέλο οι περισσότερες προέρχονται από την ομάδα των δραστικών μορίων, γεγονός το οποίο πιστοποιεί ότι το μοντέλο είναι επιτυχές. Για την

αξιολόγηση των καμπυλών χρησιμοποιείται η περιοχή κάτω από την καμπύλη, η τιμή της οποίας υπολογίζεται από τη σχέση $AUC = \sum [(Se_{i+1})(Sp_i - Sp_{i+1})]$ ³³

Το AUC παίρνει τιμές από 0 έως 1, αν η τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη είναι μεγαλύτερη του 0,5, το μοντέλο θεωρείται κατάλληλο. Ως γενικό συμπέρασμα γίνεται αντιληπτό ότι ο συντελεστής εμπλουτισμού (EF) και το AUC αποτελούν πολύ σημαντικές παραμέτρους για την εκτίμηση της αξιοπιστίας του φαρμακοφόρου μοντέλου, όπως επίσης και η παρατήρηση των καμπυλών ROC. Τα μειονεκτήματα αυτών των μετρικών είναι η έλλειψη πληροφορίας για τον αρχικό εμπλουτισμό του μοντέλου με δραστικά μόρια καθώς και η έλλειψη συγκρισιμότητας μεταξύ των αποτελεσμάτων της εικονικής σάρωσης που προκύπτουν κατά τη διαδικασία της επικύρωσης.³³

Σε μία εικονική σάρωση με τη χρήση ενός φαρμακοφόρου μοντέλου ο σκοπός είναι η επιλογή χημικών ενώσεων οι οποίες ταιριάζουν με τα χαρακτηριστικά του μοντέλου.

Υπάρχουν διάφορα υπολογιστικά προγράμματα όπως το LigandScout της εταιρείας inte:ligand²⁶, το PHASE²⁴ της εταιρείας Schrödinger, το GALAHAD³⁴ της εταιρείας Triposκ.ά., που δημιουργήθηκαν για τον παραπάνω σκοπό. Αν και έχουν βασικές διαφορές στους αλγορίθμους τους, έχουν σαν κοινό στοιχείο την χρήση των χαρακτηριστικών του μοντέλου ως φίλτρο για τη σάρωση. Ανάλογα με την εκλεκτικότητα του μοντέλου η σάρωση εκατομμυρίων ενώσεων που απαρτίζουν τις εξεταζόμενες βιβλιοθήκες μπορεί να οδηγήσει σε εκατοντάδες ή και χιλιάδες ενώσεις που προσαρμόζονται με τα χαρακτηριστικά του μοντέλου. Για το λόγο αυτό παρέχονται επιπρόσθετα φίλτρα όπου τα ίδια τα λογισμικά έχουν προσθέσει, έτσι ώστε να μειωθεί ο αριθμός των αποτελεσμάτων. Αυτά τα φίλτρα αποτελούνται από συναρτήσεις οι οποίες βαθμολογούν την προσαρμογή των ενώσεων στα χαρακτηριστικά του μοντέλου η ποιό ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι το Pharmacophorefit-score.

$SFCR = c * NMFP + SRMS$, όπου

SFCR, η προσαρμογή των ενώσεων στα χαρακτηριστικά του φαρμακοφόρου μοντέλου

c, ο διορθωτικός παράγοντας για τον αριθμό των ζευγών των χαρακτηριστικών του φαρμακοφόρου μοντέλου

NMFP, ο αριθμός γεωμετρικών ζευγών χαρακτηριστικών

SRMS, η τετραγωνική ρίζα της μέσης απόστασης για τα ζεύγη των χαρακτηριστικών του φαρμακοφόρου μοντέλου

7.2.5 Βιβλιοθήκες χημικών ενώσεων

Υπάρχουν πολλές εμπορικά διαθέσιμες αλλά και με ελεύθερη πρόσβαση βάσεις χημικών ενώσεων, όπως η ChEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/chembl/>), η Asinex (<http://www.asinex.com>), η PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), η DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>), η eMolecules (<http://www.emolecules.com>), η ZINC (<http://zinc.docking.org/>) κ.α. που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην εικονική σάρωση.

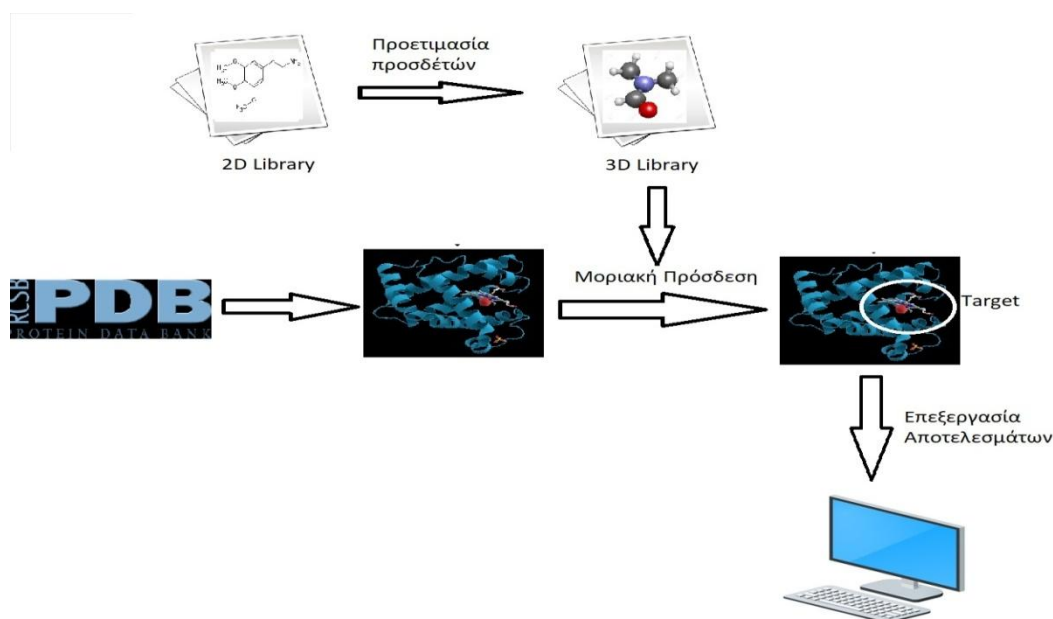
Αξίζει να αναφερθεί ότι, η ZINC η οποία περιλαμβάνει περισσότερες από 35 εκατομμύρια ενώσεις, πλεονεκτεί σε σχέση με τις υπόλοιπες βιβλιοθήκες μορίων, διότι περιέχει συγκεντρωτικούς καταλόγους χημικών ενώσεων απ' όλες τις διαθέσιμες βιβλιοθήκες μορίων³⁵. Οι βιβλιοθήκες ενδέχεται να χρειάζεται προετοιμασία, έτσι ώστε οι ενώσεις που επιλέγονται να είναι όσο το δυνατόν πιο λειτουργικές. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τη διαγραφή των διπλών καταχωρήσεων, αφαίρεση των αντισταθμιστικών ιόντων και μορίων, όπως τα ανόργανα μεταλλικά σύμπλοκα. Σημαντικό, επίσης, φίλτρο αποτελεί η διαγραφή ενώσεων, οι οποίες δίνουν αποδεδειγμένα ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε *in vitro* πειράματα (π.χ. ηλεκτρονιόφιλες, χηλικοί υποκαταστάτες μετάλλων).

Πίνακας 2 Κριτήρια και ενδεικτικές τιμές φυσικοχημικών ιδιοτήτων φαρμάκων και ενώσεων οδηγών

Κριτήρια	Lead-likeness	Drug-likeness
Μοριακό Βάρος (MW)	<=300	<=500
Λιποφιλικότητα (LogP)	<=3	<=5
Δότες Δεσμού	<=3	<=5
Υδρογόνου (HBD)		
Δέκτες Δεσμού	<=8	<=10
Υδρογόνου		
Πολική επιφάνεια (PSA)	<=120 Å	<=150 Å
Περιστρεφόμενοι Δεσμοί (RB)	<=8	<=10 Å

Στην περαιτέρω διαδικασία εφαρμόζονται κριτήρια φυσικοχημικών ιδιοτήτων φαρμάκων και ενώσεων οδηγών.(Πίνακας 2) Ο κανόνας των 5 του Lipinski αποτελεί ένα από τα πιο βασικά κριτήρια για τον έλεγχο τέτοιων ιδιοτήτων Ένα ακόμα πάρα πολύ σημαντικό κριτήριο, το οποίο εφαρμόζεται ακόμα και μετά τη διαδικασία της εικονικής σάρωσης, είναι οι ιδιότητες ADME (απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση). Ο έλεγχος αυτών των ιδιοτήτων γίνεται με διάφορα υπολογιστικά προγράμματα³⁶. Μία παράμετρος που είναι δύσκολο να προβλεφθεί και συντελεί σε μεγάλο βαθμό στην αποτυχία ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου, είναι η τοξικότητα. Η βασική αιτία είναι η μεταβλητότητα των μηχανισμών της, παρόλα αυτά έχουν αναπτυχθεί υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης της τοξικότητας (Derek Nexus³⁷, CASE³⁸).

7.2.6 Μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking)



Εικόνα 12 Διάγραμμα ροής βασικών βημάτων Μοριακής Πρόσδεσης

Η μοριακή πρόσδεση έχει σαν σκοπό να βρει τον σχετικό προσανατολισμό, του προσδέτη στην θέση πρόσδεσης του πρωτεϊνικού στόχου. Ο προσδέτης παίρνει μία συγκεκριμένη θέση πρόσδεσης στην πρωτεΐνη - στόχο και απεικονίζεται μέσω καρτεσιανών συντεταγμένων. Το πρωτόκολλο που ακολουθούν τα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης περιλαμβάνουν την δημιουργία των ποζών του υποδοχέα και την βαθμολόγηση των συμπλοκών. Στο πρώτο μέρος οι προσδέτες ελέγχονται μέσω ενός αλγόριθμου, έτσι ώστε να βρεθούν όλες οι πόζες με τις οποίες είναι δυνατόν να προστεθούν στη θήκη πρόσδεσης. Το δεύτερο μέρος περιλαμβάνει τη βαθμολόγηση των συμπλοκών πρωτεΐνη –προσδέτη. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται συνήθως με την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης. (Εικόνα 12) Υπάρχουν τρεις κατηγορίες στον τρόπο βαθμολόγησης των συμπλοκών. Οι εμπειρικές συνάρτησης, οι συναρτήσεις που βασίζονται στο δυναμικό της μέσης δύναμης καθώς και αυτές που βασίζονται στο πεδίο δυνάμεων³⁹.

Αναλυτικότερα οι εμπειρικές συναρτήσεις χρησιμοποιούν όρους οι οποίοι είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά την πρόσδεση, ώστε να

δημιουργηθεί μία εξίσωση πρόβλεψης της ικανότητας πρόσδεσης. Τέτοιοι όροι είναι οι πολικές αλληλεπιδράσεις (δεσμοί υδρογόνου και ιοντικές αλληλεπιδράσεις), οι μη πολικές αλληλεπιδράσεις (υδρόφοβες, αρωματικές), έλλειψη ευελιξίας προσδέτη (εντροπία), τα αποτελέσματα της διαλυτοποίησης. Πρόβλημα δημιουργείτε λόγο του γεγονότος ότι η εντροπία με την διαλυτοποίηση είναι δύο παράγοντες δύσκολοι στην ποσοτικοποίηση. Η δημιουργία συναρτήσεων, που βασίζονται στο δυναμικό της μέσης δύναμης, προσπάθησε να δώσει λύση στο πρόβλημα. Υπολογίζοντας άμεσα τον εντροπικό παράγοντα και τον παράγοντα διαλυτοποίησης καθώς η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης υπολογιζόταν ως το άθροισμα όλων των ενδοατομικών αλληλεπιδράσεων. Η τελευταία κατηγορία βασίζεται σε μη δεσμικούς παράγοντες κλασικών πεδίων δυνάμεων, όπως οι αλληλεπιδράσεις vanderWaals, η ενέργεια Coulomb, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κ.α.³⁹ Αν και υπάρχουν διάφορα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης, τα οποία κάνουν χρήση διαφορετικών αλγορίθμων⁴⁰⁻⁴², όλα έχουν σαν σκοπό την εύρεση της καλύτερης προσαρμογής μεταξύ προσδέτη και πρωτεΐνης - στόχου.

Ικανότητα πρόσβασης των ενώσεων στον εκάστοτε πρωτεϊνικό στόχο σε μία ευρέως διαδεδομένη συνάρτηση η οποία και χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν εδώ την εργασία (GlideScore) υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης:

$$\text{GScore} = 0.065 \cdot \text{vdW} + 0.130 \cdot \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{Hbond} + \text{Metal} + \text{BuryP} + \text{RotB} + \text{Site}, \text{ όπου}$$

vdW: Ενέργεια van der Waals

Coul: Ενέργεια Coulomb

Lipo: Λιποφιλικός όρος, ο οποίος υπολογίζει τις ευνοϊκές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Hbond: Υπολογισμός Δεσμών Υδρογόνου. Ο όρος αυτός διαχωρίζεται σε συνιστώσες που εξαρτώνται από το φορτίο του δότη και του δέκτη, δηλαδή αν είναι και οι δύο ουδέτεροι, ο ένας από τους δύο φορτισμένος και ο άλλος ουδέτερος ή και οι δύο φορτισμένοι.

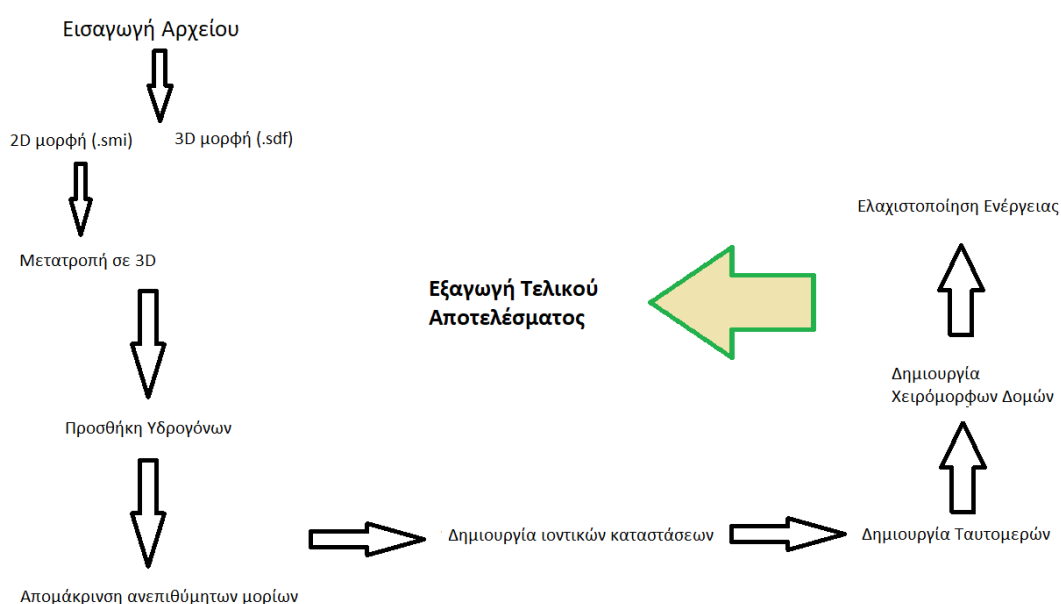
Metal: Ο όρος αυτός περιλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις μόνο με ανιοντικά άτομα

BuryP: "Ποινή" (Penalty) για τις πολικές ομάδες και τη συστροφή των αμιδίων σε υδρόφοβη πλευρά

RotB: "Ποινή" για τον περιορισμό των περιστρεφόμενων δεσμών

Site: Υπολογισμός των πολικών αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο⁴².

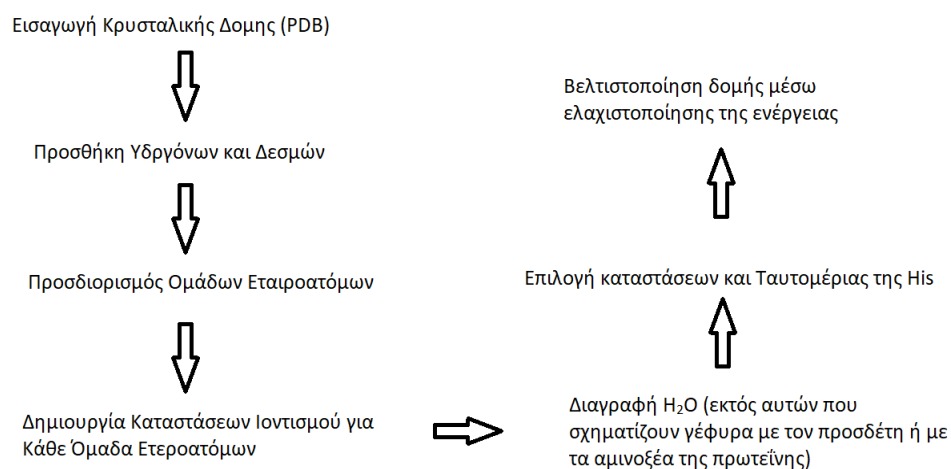
Η διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης περιλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια την προετοιμασία των προσδετών, την προετοιμασία της πρωτεΐνης στόχου, τη διαδικασία της πρόσδεσης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 13 Διάγραμμα ροής βασικών βημάτων προετοιμασίας προσδετών

Στο πρώτο στάδιο (Εικόνα 13) εφαρμόζεται ένα πρωτόκολλο που σκοπό έχει τις διορθώσεις, τη βελτιστοποίηση στις δομές των προσδετών και τη διαγραφή ορισμένων δομών, οι οποίες δεν θα έχουν επιθυμητά αποτελέσματα⁴³. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει την εισαγωγή των κατάλληλων αρχείων (SMILES,SDF). Προστίθενται άτομα υδρογόνου, απομακρύνονται ανεπιθύμητα μόρια και ελέγχεται το επιθυμητό pH, έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι κατάλληλες καταστάσεις ιοντισμού των πρόσθετων. Τέλος δημιουργούνται ταυτομερή των δομών των πρόσθετων και εφαρμόζονται αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας.

Οι δομές της PDB απαιτούν ορισμένες τροποποιήσεις (Εικόνα 14) , πριν χρησιμοποιηθούν σε insilico μελέτες.



Εικόνα 14 Διάγραμμα ροής βασικών βημάτων προετοιμασίας πρωτεϊνών

Διορθώνονται οι δεσμοί, τα φορτία, ο προσανατολισμός των διαφόρων πλευρικών ομάδων της αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης, βελτιστοποιείται το δίκτυο δεσμών υδρογόνου και προστίθενται ορισμένα άτομα ή πλευρικές ομάδες που λείπουν. Ένα απλό παράδειγμα βελτιστοποίησης που λαμβάνει χώρα συχνά αφορά το αμινοξικό κατάλοιπο ιστιδίνη όπου ορίζεται μία ταυτομερής κατάσταση λαμβάνοντας υπόψη την θέση του δακτυλίου που γίνεται ο δεσμός υδρογόνουτρόπος⁴⁴.

Μόλις τελειώσουν οι διαδικασίες βελτιστοποίησης των προσδετών και των πρωτεϊνών εφαρμόζονται αλγόριθμοι μοριακής πρόσδεσης. Η εφαρμογή τους γίνεται με σειρά αυξανόμενης πολυπλοκότητας. Αναλυτικότερα μετά το τέλος μίας διαδικασίας ελλιμενισμού τα αποτελέσματα αξιολογούνται με βάση το DockingScore, τις επιθυμητές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη στόχο, την δομή του κάθε προσδέτη και με ένα σύνολο παραμέτρων που διαφέρουν ανάλογα τον αλγόριθμο που χρησιμοποιείται πχ. στο Glide το Gscore.

7.3 Ογκοπρωτεΐνη BRAF – γενικά στοιχεία

7.3.1 Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK

Το μονοπάτι MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) είναι ένα υψηλά συντηρημένο μονοπάτι μεταγωγής εξωκυττάρων σημάτων σε ενδοκυτταρικές αποκρίσεις που συνδέονται με διαφορετικές σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της απόπτωσης και της επιβίωσης.

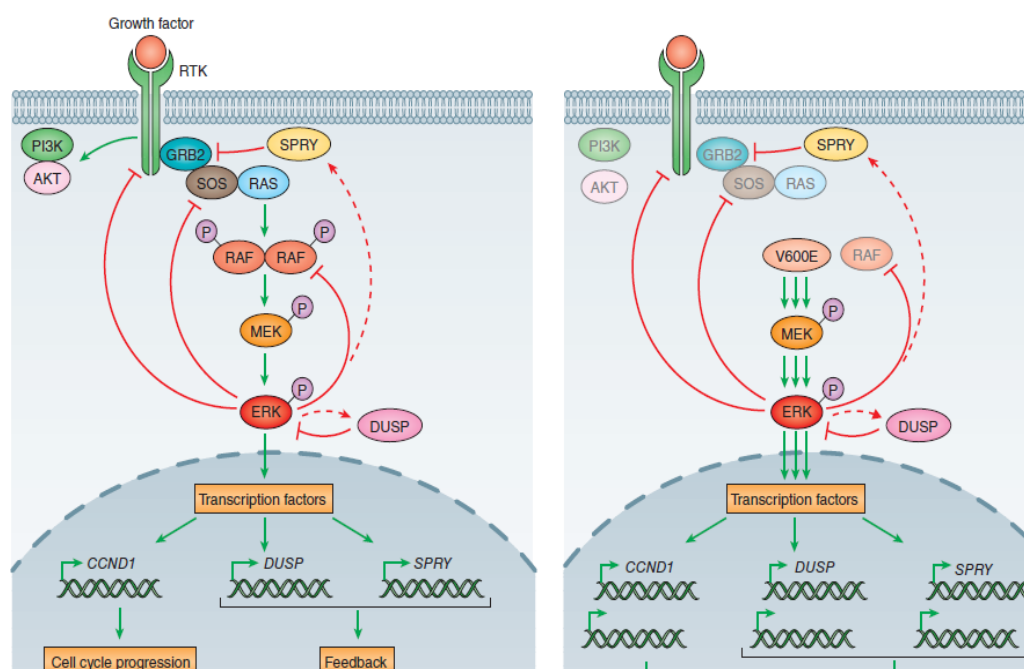
Μεταλλάξεις σε κομβικές πρωτεΐνες του MAPKμονοπατιού διαταράσσουν την κανονική λειτουργία του με αποτέλεσμα τη δημιουργία νεοπλασιών. Σύγχρονες προσεγγίσεις προσανατολίζονται προς την εξατομικευμένη ιατρική (ιατρική ακριβείας) στοχεύοντας στην εκλεκτική αναστολή των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών του MAPKως θεραπευτική προσέγγιση σε διάφορους τύπους καρκίνου⁴⁵.

Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK(Εικόνα 17). Ένας αυξητικός παράγοντας, όπως για παράδειγμα ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας,αλληλεπιδρά με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα του (υποδοχέας κινάσης της τυροσίνης –RTK) επάγοντας το διμερισμό του και την αυτοφωσφορυλίωσή του καθώς η μία πολυπεπτιδική αλυσίδα φωσφορυλιώνει την άλλη. Αυτή η φωσφορυλίωση προσελκύει μία πρωτεΐνη προσαρμοστή που καλείται GRB2. Η πρωτεΐνη αυτή έχει μία περιοχή η οποία αναγνωρίζει ένα φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο τυροσίνης στον ενεργοποιημένο υποδοχέα. Το άλλο άκρο της προσδένει στον παράγοντα SOS, έναν παράγοντα ανταλλαγή νουκλεοτιδίων γουανίνης. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η δέσμευση της πρωτεΐνης RAS και η διέγερση της ανταλλαγής του GDP της RAS με GTP. Στη συνέχεια, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο RAS-GTP αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική κινάση RAF ενεργοποιώντας τη μέσω μιας διαδικασίας πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει αλλαγές διαμόρφωσης, φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης και διμερισμό. Ο σχηματισμός ομο- και ετερο- διμερών αποτελεί βασικό στοιχείο για την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RAF άγριου τύπου.Το ενεργό RAF φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τα MEK1 και MEK2, τα οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τα ERK1 και ERK2. Το

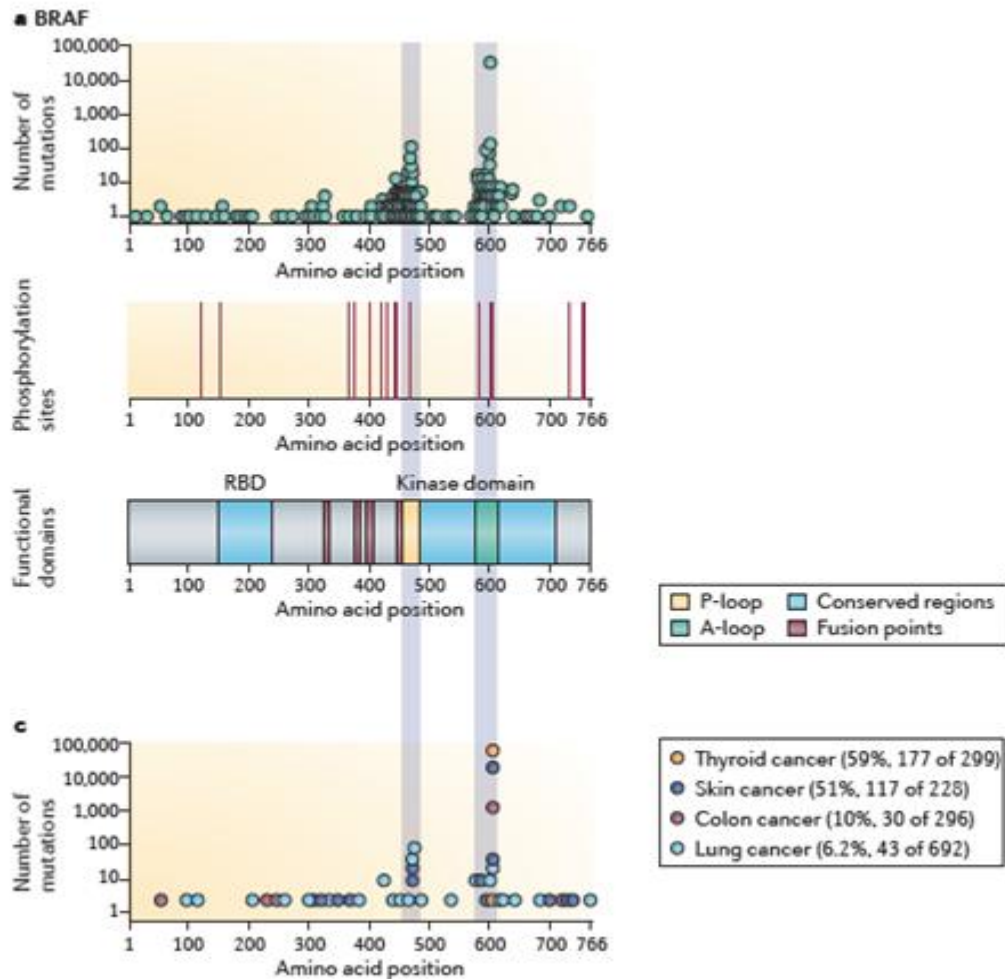
ενεργοποιημένο ERK ρυθμίζει έναν αριθμό κυτταροπλασματικών και πυρηνικών υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων αρκετών μεταγραφικών παραγόντων που ελέγχουν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την εξέλιξη και τον πολλαπλασιασμό του κυτταρικού κύκλου. Η υπερενεργοποίηση του ERK συνδέεται με αρνητικούς βρόχους ανάδρασης που απενεργοποιούν ενδιάμεσες σηματοδοτικές πρωτεΐνες του μονοπατιού.

Η πλέον συνήθης μετάλλαξη της BRAF ($BRAF^{V600E}$) την καθιστά συνεχώς ενεργοποιημένη και σε αντίθεση με την *wt-BRAF* όπου απαιτείται διμερισμός για την ενεργοποίησή της, αυτή είναι σε θέση να σηματοδοτεί ισχυρά ως λειτουργικό μονομερές, φωσφορυλιώνοντας το MEK και ενεργοποιώντας το μονοπάτι παρακάτω.

7.3.2 Μεταλλάξεις των RAF στον καρκίνο



Εικόνα 15 Το σηματοδοτικό μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) και η λειτουργία του σε φυσιολογικά κύτταρα (αριστερά) και σε κύτταρα μεταλλαγμένης BRAF (δεξιά). Η $BRAF^{V600E}$ είναι ικανή να φωσφορυλιώνει το MEK ως μονομερές, δηλαδή είναι ανεξάρτητη διμερισμού. Σε όγκους που φέρουν μετάλλαξη $BRAF^{V600E}$, η υπερενεργοποιημένη σηματοδότηση του ERK έχει ως αποτέλεσμα αυξημένο πολλαπλασιασμό και αποφυγή απόπτωσης. Επιπλέον, σε όγκους με BRAF-μετάλλαξη, παρακάμπτονται τα ανασταλικά αποτελέσματα της αρνητικής ανάδρασης διαμεσολαβούμενης από το ERK, καταστέλλεται η σηματοδότηση με τη μεσολάβηση RTK, με αποτέλεσμα χαμηλές ποσότητες ενεργού RAS που δεσμεύεται με GTP. Σε αυτή την κατάσταση, το $BRAF^{V600E}$ σηματοδοτεί ως λειτουργικό μονομερές.⁴⁶



Εικόνα 16 BRAF μεταλλάξεις στον καρκίνο. Οι θέσεις μετάλλαξης στην αμινοξική ακολουθία απεικονίζονται στον άξονα x και ο αριθμός των καταγραφέντων μεταλλάξεων στον άξονα y. Στα μεσαία γραφήματα υποδεικνύονται οι θέσεις φωσφορυλίωσης με λειτουργικό ρόλο στη δραστηριότητα της κινάσης. Σημειώνονται με μπλε χρώμα θέση πρόσδεσης του RAS (RBD) και ο περιοχή της κινάσης, με κίτρινο χρώμα σημειώνεται ο βρόχος πλούσιος σε κατάλοιπα γλυκίνης (ή P-loop) και με πράσινο ο βρόχος ενεργοποίησης (A-loop). Το κάτω διάγραμμα δείχνει το φάσμα των BRAF μεταλλάξεων που έχουν καταγραφεί σε πολλαπλές μελέτες στον καρκίνο του θυρεοειδούς, του δέρματος, του παχέος εντέρου και των πνευμόνων⁶¹

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας RAF είναι κινάσες σερίνης, θρεονίνης που παίζουν ρόλο κεντρικού διαμεσολαβητή στη μεταβίβαση σήματος στο μονοπάτι MAPK. Υπάρχουν τρεις πρωτεΐνες στην οικογένεια RAF: A-RAF, B-RAF, C-RAF (RAF-1). Αν και έχουν παρόμοια αμινοξική αλληλουχία ο ρόλος τους στη μεταβίβαση σήματος είναι διαφορετικός. Η βασική δραστηριότητα κινάσης της BRAF είναι υψηλότερη από τα άλλα μέλη της οικογένειας και ο μηχανισμός ενεργοποίησής της απλούστερος. Το 2002, δεδομένα αλληλούχησης αναγνώρισαν υψηλή συχνότητα στις σημειακές μεταλλάξεις του BRAF στο μελάνωμα και σε άλλους ανθρώπινους καρκίνους. Μία μόνη μετάλλαξη στην περιοχή της κινάσης της BRAF είναι ικανή να προσδώσει συνεχή ενεργοποίηση. Από την άλλη, απαιτούνται περισσότερες από μία μεταλλάξεις στα άλλα μέλη της οικογένειας RAF για να επιτευχθεί παρόμοιος βαθμός ενεργοποίησής τους. Αυτές οι διαφορές έχουν παρουσιαστεί ως ο πρωταρχικός λόγος για την υψηλή συχνότητα των BRAF αλλά όχι των ARAF και CRAF μεταλλάξεων σε ανθρώπινους όγκους⁴⁶.

Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 50 σημειακές μεταλλάξεις στη πρωτεΐνη BRAF κυρίως στην περιοχή της κινάσης. Σε ποσοστά πάνω από το 90% των περιπτώσεων εντοπισμού μεταλλάξεων, στο BRAF γονίδιο απαντάται η μεταστροφή θυμίνης από αδερίνη στη θέση 1799 (T1799A), καταλήγοντας στη μετάλλαξη της πρωτεΐνης BRAF V600E (προηγουμένως βιβλιογραφικά αναφερόμενη σαν V599E) με τη βαλίνη στη θέση 600 να αντικαθίσταται από γλουταμικό οξύ. Η μετάλλαξη BRAF^{V600E} επάγει τη συνεχή δραστηριοποίηση της κινάσης BRAF αυξάνοντας την ενζυμική ικανότητα έως και 500 φορές σε σχέση με τα αλληλόμορφα άγριου τύπου BRAF (wt-BRAF).

Μεταλλάξεις του BRAF καταγράφονται σε ποσοστό ~ 8% όλων των καρκίνων, ενώ περίπου το ήμισυ όλων των περιπτώσεων μελανώματος, το 60% των καρκίνων θυρεοειδούς, το 10% των καρκίνων παχέος εντέρου και το 6% των καρκίνων του πνεύμονα φέρουν τη μετάλλαξη BRAF-V600E⁴⁷. (Εικόνα 16).

7.3.3 Δομή της BRAF και κατανόηση του μηχανισμού ενεργοποίησης της

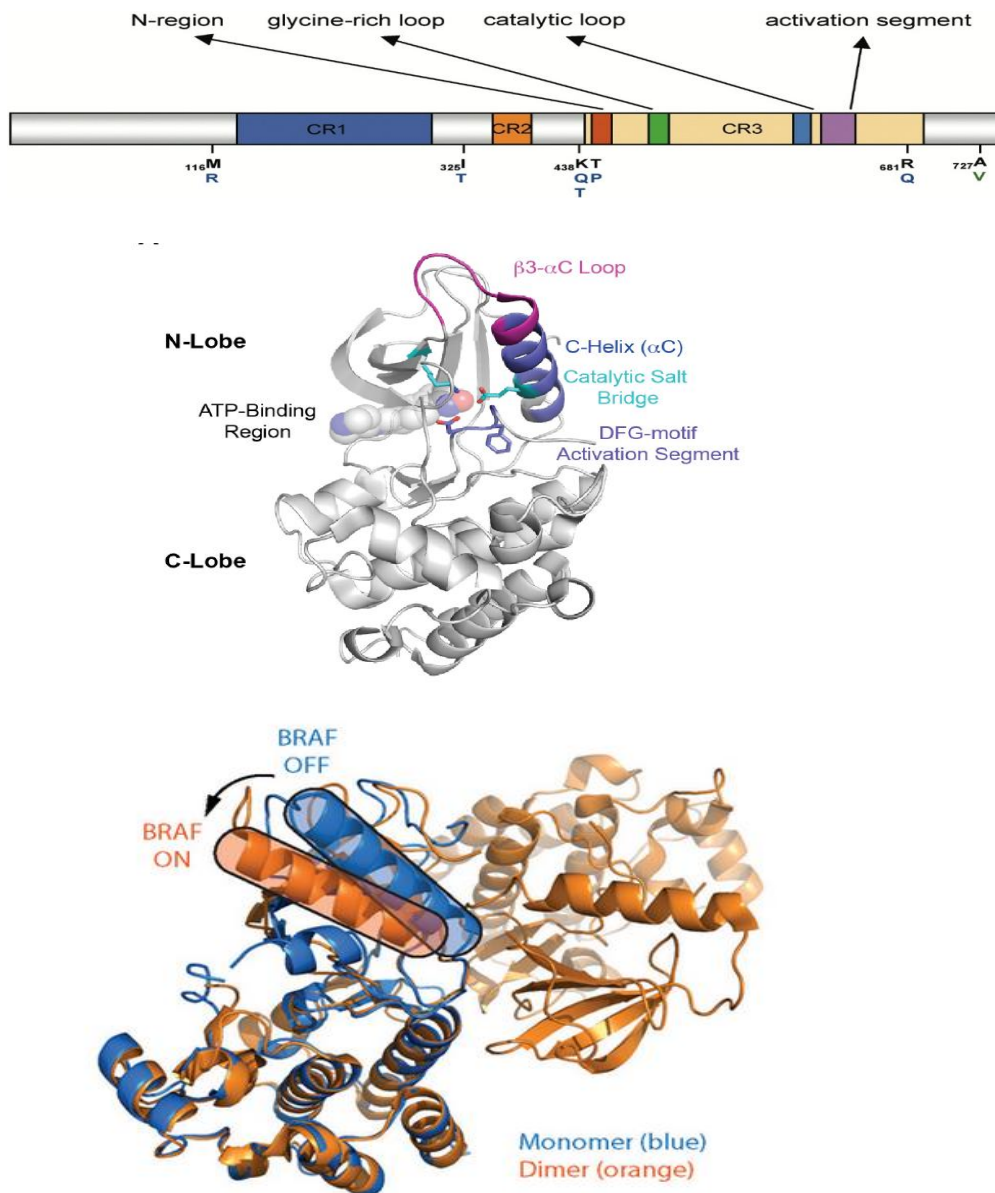
Η BRAF (766 αμινοξέα), όμοια με τις άλλες ευκαρυωτικές πρωτεϊνικές κινάσες, έχει 3 συντηρημένες περιοχές CR1-CR3, με την CR1 στο αμινοτελικό άκρο να φιλοξενεί την περιοχή αλληλεπίδρασης με τοRAS-GTP και την CR3 στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 457-717) να περιλαμβάνει την καταλυτική περιοχή όπου γίνεται η φωσφορυλίωση.(Εικόνα 17)

Η 3D διαμόρφωσή της διακρίνεται από δύο λοβούς, το μικρότερο λοβό (N-lobe) στο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 457-530)και τον μεγαλύτερο λοβό (C-lobe) στο καρβοξυτελικό άκρο (αμινοξέα 535-717),οι οποίοι ενώνονται μέσω ενός ευέλικτου βρόχου (hinge region). Στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο λοβών φιλοξενείται το κέντρο πρόσδεσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Η διαμορφωτική ευελιξία του ενζύμου είναι μεγάλη επιτρέποντας την προσέγγιση και απομάκρυνση των δύο λοβών.

Η αναδίπλωση του N-λοβού περιλαμβάνει πέντε β-φύλλα και μια α-έλικα που ονομάζεται "αC-έλικα", ενώ ο C-λοβός αποτελείται ως επί το πλείστον από α-έλικες.

Ο C-λοβός περιλαμβάνει επίσης έναν ευέλικτο βρόχο ενεργοποίησης (AS) στην αρχή του οποίου βρίσκεται το συντηρημένο μοτίβο Asp(594)-Phe(595)-Gly(596) ("DFG"). Περαιτέρω, στο βρόχο ενεργοποίησης βρίσκονται τα αμινοξέα Thr(599) και Ser(602), η φωσφορυλίωση των οποίων συνδέεται με τη σηματοδοτική λειτουργία της πρωτεΐνης.

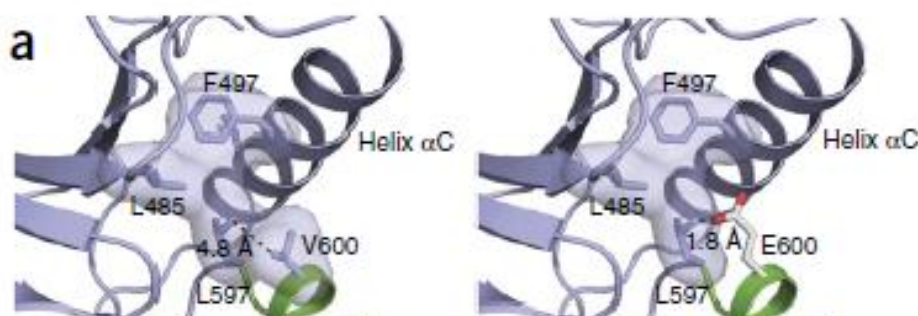
Όταν η κινάση είναι σε ενεργή κατάσταση, το Asp(594) του DFG προσανατολίζεται προς το κέντρο πρόσδεσης του ATP(κατάσταση η οποία χαρακτηρίζεται ως «DFG IN») ώστε να συντονίσει τη συμπλοκοποίησηδύο ιόντων Mg^{2+} που δρουν ως συμπαραγόντες στην κατάλυση ενώ ο βρόχος ενεργοποίησης εμφανίζει μια ανοιχτή και εκτεταμένη διαμόρφωση. Το άλλο χαρακτηριστικό της ενεργής κατάστασης της κινάσης είναι ο προσανατολισμός της αC-έλικας, η οποία στρέφεται προς τα μέσα, προς το ενεργό κέντρο ("αC- IN")και σχηματίζεται η καταλυτική γέφυρα άλατος



Εικόνα 17 (Επάνω) Η δομή της B-RAF παρουσιάζεται σχηματικά. Διακρίνονται οι τρεις συντηρημένες περιοχές σε όλες τις RAF πρωτεΐνες, CR1 (κυανό), CR2 (πορτοκαλί), είναι CR3 (μπεζ). Η περιοχή της κινάσης εμπεριέχεται στην περιοχή CR3. Επισημαίνονται κύριες περιοχές της πρωτεΐνης όπως ο βρόχος πλούσιος σε κατάλοιπα γλυκίνης (ή P-loop), οκαταλυτικός βρόχος και το τμήμα ενεργοποίησης AS. (Mathew J. Garnett et al, *Cancer Cell*. 2004). (Μέση) Μοντέλο της περιοχής της κινάσης BRAF στην ενεργή της διαμόρφωση βασισμένο στην κρυσταλλική δομή pdb: 3D4Q (σύμπλοκο του αναστολέα GDC0879 με την BRAF-wt) επισημαίνοντας κρίσιμα δομικά χαρακτηριστικά [Foster et al, *Cancer Cell*. 2016;29(4):477-493]. (Κάτω) Διαμόρφωση της περιοχής της κινάσης στην ενεργή (pdb: 4MNE, σύμπλοκο του BRAF-wt με το MEK1) και την ανενεργή διαμόρφωση (pdb: 4RZV, σύμπλοκο BRAF-wt με R509H: vemurafenib, η BRAFR509H στερείται δραστηριότητας κινάσης). Η ενεργοποίηση της κινάσης συνοδεύεται από την μετατόπιση της α-έλικας από την θέση OUT προς τη θέση IN και τη διατάραξη της αναδίπλωσης του βρόχου ενεργοποίησης AS

μεταξύ της λυσίνης (K483) του κλώνου $\beta 3$ του N-λοβού και του γλουταμικού οξέος (E501) της αC -έλικας.

Η πρόσφατη κρυσταλλική δομή της ανενεργής αδρανούς μορφής της BRAF ανέδειξε μια μη- παραγωγική μετακίνηση της αC -έλικας προς τα έξω (αC -OUT) ενώ ο βρόχος ενεργοποίησης AS υιοθετεί μια ελικοειδή διαμόρφωση⁴⁸. (Εικόνα 17)



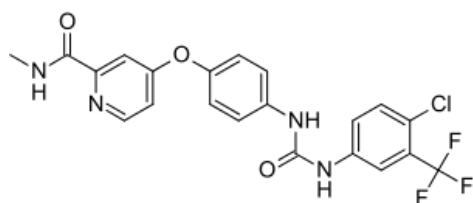
Εικόνα 18 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της έλικας αC και του βρόχου ενεργοποίησης (AS-H1) και διακοπή τους από την μετάλλαξη της βαλίνης με το μεγαλύτερο και αρνητικά φορτισμένο γλουταμικό οξύ (V600E) (Neroshan Thevakumaran et al, Nature structural & molecular biology, 2015)

Η περιοχή της κινάσης της πρωτεΐνης BRAF^{V600E} έχει κρυσταλλωθεί με αρκετούς αναστολείς που συναγωνίζονται το ATP. Στις περισσότερες συνκρυσταλλωμένες δομές, αρκετά αμινοξέα του βρόχου ενεργοποίησης δεν έχουν επιλυθεί. Έτσι υπάρχει έλλειμμα πληροφορίας σχετικά με τη θέση των αμινοξέων και τις αλληλεπιδράσεις τους στην ενεργοποιημένη δομή της κινάσης.

Με βάση την κρυσταλλική δομή της ανενεργής BRAF, προτείνεται ότι μία μετάλλαξη στο τμήμα ενεργοποίησης όπως το V600E όπου η βαλίνη αντικαθίσταται από το μεγαλύτερο και αρνητικά φορτισμένο γλουταμικό οξύ, μπορεί να διακόψει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στο βρόχο ενεργοποίησης και της αC -έλικας μέσω στερικών συγκρούσεων (steric clashes) ή μη ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων. (Εικόνα 18). Ακολούθως μπορεί να προάγεται αλλοστερική κίνηση της έλικας αC προς την θέση IN, η οποία τελικά ευνοεί το διμερισμό της περιοχής κινάσης και την ενεργοποίησή της.

7.3.4 Αναστολείς της BRAF^{V600E}

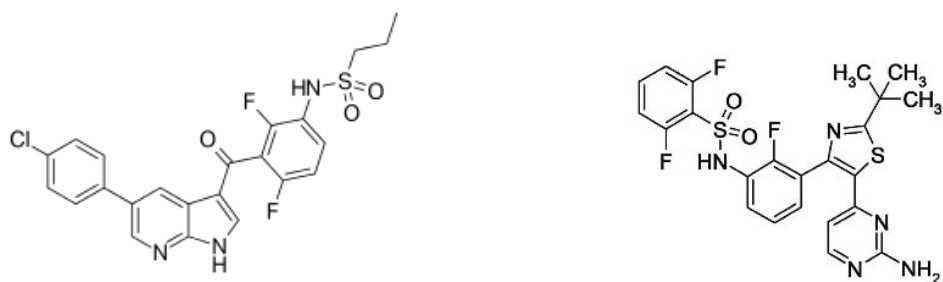
Αναστολείς 1^{ης} γενιάς: Το 2000 το sorafenib ήταν ο πρώτος αναστολέας που δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες⁴⁹. (Εικόνα 19) Το sorafenib (BAY-439006) εξαρχής δημιουργήθηκε ως αναστολέας της CRAF συναγωνιζόμενο το ATP για το ενεργό κέντρο της κινάσης⁵⁰. Το sorafenib αναστέλλει τις wt-BRAF και CRAF, τους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης καθώς και πολλούς προ-αγγειογόνους παραγόντες. Έτσι, αναστέλλει την αγγειογένεση του όγκου και επάγει την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων, και χορηγείται σε προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνο και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Το sorafenib όπως και άλλες ενώσεις που αναπτύχθηκαν ως αναστολείς της CRAF δεν έχει καμία αποτελεσματικότητα στη μετάλλαξη BRAF^{V600E}.



Εικόνα 19 Δομή και δράση αναστολέα πρώτης γενιάς Sorafenib (BAY-439006)

IC ₅₀ nM	sorafenib
BRAFV600E	38
BRAF-wt	22
CRAF	6
VEGFR2	90

Αναστολείς 2^{ης} γενιάς: Οι αναστολείς RAF δεύτερης γενιάς με συναγωνιστική δράση ως προς το ATP αναπτύχθηκαν ώστε να στοχεύσουν επιλεκτικά τη μετάλλαξη BRAF^{V600E}. Δύο τέτοιοι αναστολείς έχουν εγκριθεί και χορηγούνται ως φάρμακα για το μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα με τη μετάλλαξη BRAF^{V600E}, το Vemurafenib (PLX4032)⁵⁰ και το Dabrafenib (GSK2118436)⁵¹ (Εικόνα 20).



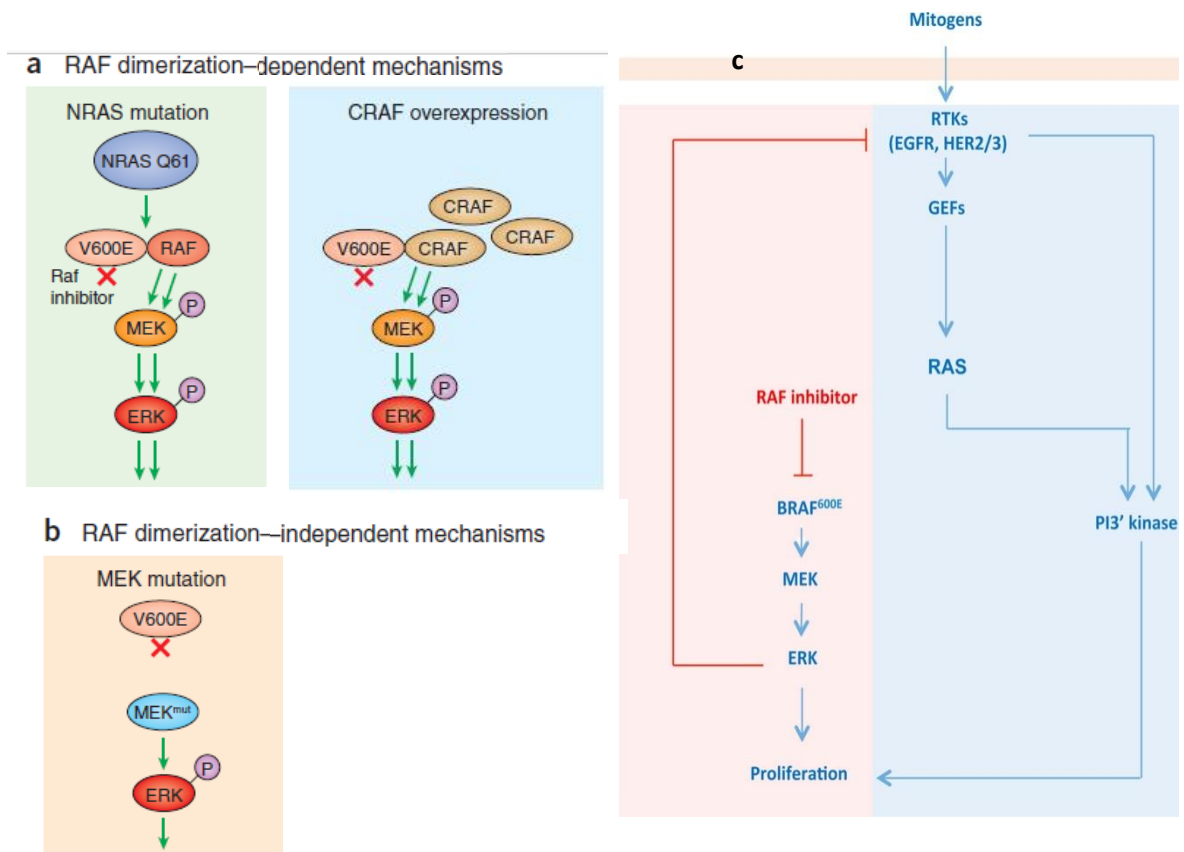
IC ₅₀ nM	vemurafenib	dabrafenib
BRAF-wt	100	3.2
BRAFV600E	31	0.6
CRAF	48	5.0

Εικόνα 20 Δομή και δράση αναστολέων δεύτερης γενιάς vemurafenib (αριστερά) και dabrafenib (δεξιά) που είναι εγκεκριμένα φάρμακα κατά του μελανώματος

Η χορήγηση των αναστολέων 2^{ης} γενιάς παρέττειν την επιβίωση των ασθενών, όμως σε σπάνιες μόνο περιπτώσεις θεράπευσε την ασθένεια ενώ στις περισσότερες περιπτώσεις συνοδεύεται από ανάπτυξη επίκτητης αντίστασης στο φάρμακο και υποτροπή του όγκου. Η ανάπτυξη αντίστασης συνδέεται με μηχανισμούς ανάκτησης της σηματοδότησης του ERK είτε με την ενεργοποίηση παράλληλων σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν την επιβίωση⁵¹. (Εικόνα 21)

Οι μηχανισμοί ανάκτησης της σηματοδότησης του ERK λόγω της αυξημένης επαγωγής διμερισμού των RAF αναφέρεται ως η πλέον κοινή αιτία κλινικής επίκτητης αντίστασης στη χορήγηση των RAF αναστολέων. Η επαγωγή διμερισμού μπορεί να συνδέεται: α) με την υπερενεργοποίηση του RAS προκαλούμενη από μετάλλαξη στο RAS ή υπερέκφραση των RTKs. Έτσι, σε BRAF-V600E καρκινικά κύτταρα, οποιαδήποτε αύξηση της δραστηριότητας του RAS θα προκαλέσει σχηματισμό διμερών RAF, συμπεριλαμβανομένων ομοδιμερών και ετεροδιμερών WT και BRAF-V600E, CRAF και BRAF-V600E και ARAF και BRAF-V600E, εμποδίζοντας έτσι τη δράση των αναστολέων RAF: β) η υπερέκφραση της BRAFV600E ή της CRAF. Η επανενεργοποίηση της σηματοδότησης ERK και η αντίσταση στους αναστολείς RAF μπορεί επίσης να συμβεί ανεξάρτητα της επαγωγής διμερισμού στις RAF πρωτεΐνες,

ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στις πρωτεΐνες MEK που έπονται των RAF στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK.



Εικόνα 21 Μηχανισμοί ανάπτυξης επίκτητης αντίστασης στους BRAF^{V600E} αναστολείς είτε με μηχανισμούς ανάκτησης της σηματοδότησης του ERK(a,b) είτε με την ενεργοποίηση παράλληλων σηματοδοτικών μονοπατιών (PI3K) που προάγουν την επιβίωση(c)(α) Μεταβολές που προάγουν το διμερισμό των πρωτεϊνών RAF όπως μετάλλαξη του RAS, υπερέκφραση των CRAF προκαλούν αντίσταση στους αναστολείς (β) Η επανενεργοποίηση της σηματοδότησης ERK και η αντίσταση σε αναστολείς RAF μπορεί επίσης να συμβεί κατά τρόπο ανεξάρτητο από τον διμερισμό των RAF ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στις πρωτεΐνες MEK⁴⁷

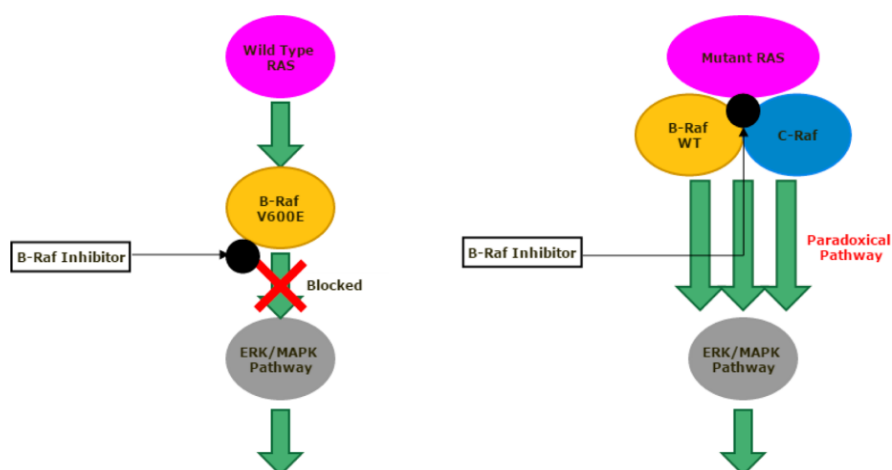
7.3.5 Παράδοση ενεργοποίηση του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού

Παράλληλα, οι αναστολείς BRAF^{V600E} παρουσιάζουν ένα ασυνήθιστο βιοχημικό προφίλ. Ενώ καταστέλλουν επιλεκτικά τη δραστηριότητα των RAF και τη σηματοδότηση του ERK σε κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη, σε κύτταρα που εκφράζουν τη wt-BRAF, και σε καθεστώς ενεργοποιημένου RAS (RAS-GTP), η χορήγησή τους επάγει την παράδοση ενεργοποίηση του MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού προκαλώντας δευτερογενείς δερματικές κακοήθειες (πλακώδες καρκίνωμα ή ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα ή και κερατοακάνθωμα).

Στη λίστα με τέτοιου είδους δευτερεύουσες δερματικές κακοήθειες οφειλόμενες στη χορήγηση BRAF^{V600E} αναστολέα έχουν προστεθεί κακοήγη θηλώματα βλεννογόνου και βασεοκυτταρικό καρκίνωμα⁵². Όλες αυτές οι καρκινογενέσεις ως αποτέλεσμα της παράδοξης ενεργοποίησης του MAPK, είναι αντιμετωπίσιμες και δεν έχουν την ικανότητα μετάστασης⁵³.

Αυτό που αποτελεί πραγματικά επικίνδυνη κατάσταση σε αυτό το φαινόμενο "χρόνιας τοξικότητας" είναι η δημιουργία καρκινικών κυττάρων σε μη δερματικούς ιστούς όπως ο πνεύμονας, το πάγκρεας και το κόλον. Έχει καταγραφεί περίπτωση ασθενούς με μεταστατικό μελάνωμα BRAF^{V600K} ο οποίος ανέπτυξε χρόνια μυελοκυτταρική λευχαιμία κατά τη διάρκεια θεραπείας με vemurafenib. Μόλις η χορήγηση του αναστολέα σταμάτησε τα λευχαιμικά κύτταρα μειώθηκαν⁵⁴. Παρόμοιο περιστατικό έχει εμφανιστεί και μετά από συνδυαστική θεραπεία με αναστολείς BRAF^{V600E}/MEK dabrafenib/trametinib, όπου ασθενής με μελάνωμα εμφάνισε μετάσταση καρκίνου στον εγκέφαλο, ο οποίος αποδόθηκε σε καρκίνο του παχέος εντέρου με μετάλλαξη RAS⁵⁵.

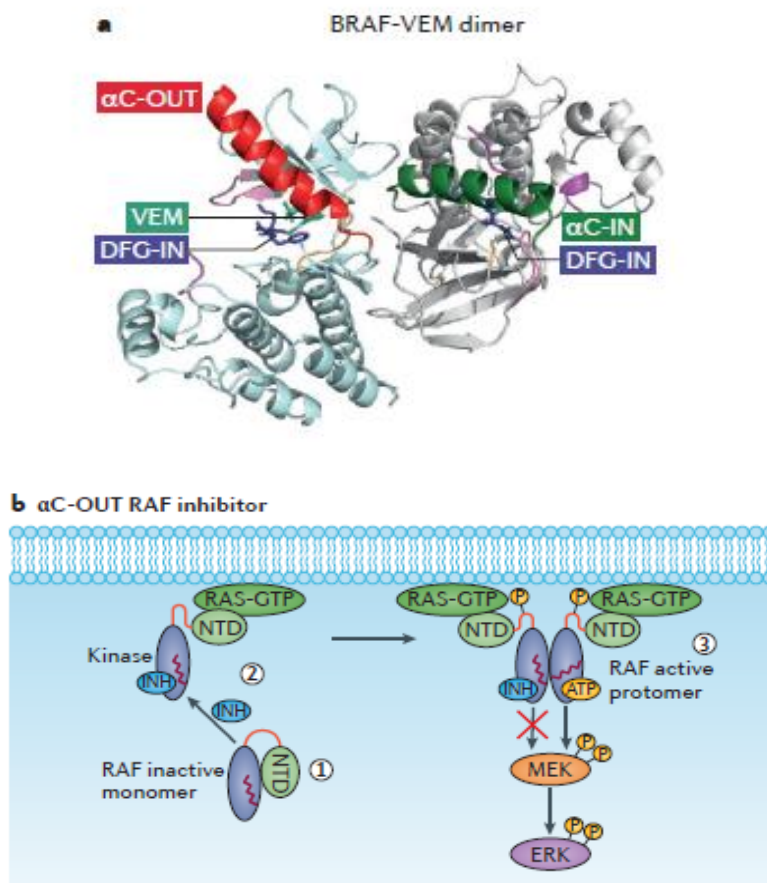
Η μηχανιστική βάση για την παράδοση ενεργοποίηση του ERK από τους αναστολείς BRAF^{V600E} σε κύτταρα που εκφράζουν τη wt-BRAF φαίνεται να συνδέεται με την ύπαρξη ενεργοποιημένου RAS (RAS-GTP) που επάγει το διμερισμό της BRAF (ομο- ή έτερο-) αλλά και τον τρόπο πρόσδεσης του αναστολέα. (Εικόνα 22)



Εικόνα 22 Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του μονοπατιού MAPK κατά την χορήγηση αναστολέα BRAF^{V600E} σε κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη και σε κύτταρα που είναι wt-BRAF υποδεικνύοντας την παράδοση ενεργοποίηση του MAPK στα τελευταία⁶²

Σχετικά με τον τρόπο πρόσδεσης των αναστολέων, η πρόσδεση αναστολέων τύπου I_{1/2} (DFGin/aCout) (όπως το vemurafenib) προκαλεί μετατόπιση της αC - έλικας σε OUT-θέση εμποδίζοντας τη πρόσδεση του αναστολέα και στο δεύτερο μονομερές ενώ επιπλέον το δεύτερο μονομερές υιοθετεί τη διαμόρφωση DFG-in, αC-in που προσομοιάζει με την ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου. Έτσι, έχει προταθεί ότι η πρόσδεση του αναστολέα στο ένα μονομερές επάγει αλλοστερικά την ενεργοποίηση του άλλου μονομερούς. (Εικόνα 23)

Η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου της BRAF με το dabrafenib ανέδειξε ένα διμερές με το φάρμακο να προσδένει και στα δύο μονομερή στη διαμόρφωση (DFGin/aCout). Το γεγονός όμως ότι το dabrafenib φαίνεται ότι μπορεί να αναστείλει και τα δύο μονομερή δε συνάδει με την κλινική αποτελεσματικότητα του εφόσον όπως και το vemurafenib επάγει την παράδοση ενεργοποίηση του MAPK και τη σηματοδότηση του ERK.

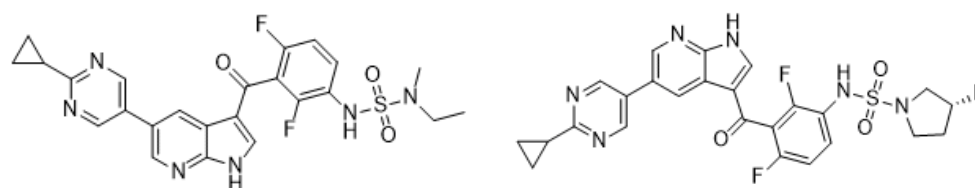


Εικόνα 23 Μηχανισμός δράσης αναστολέων RAF. α | Το vemurafenib και άλλοι αναστολείς τύπου I1 / 2 σταθεροποιούν την έλικα αC (κόκκινο) του ενός μονομερούς BRAF στη θέση OUT και την έλικα αC (πράσινο) του δεύτερου μονομερούς BRAF στη θέση IN (PDB ID: 3OG7).b | Σχηματική απεικόνιση της επαγόμενης από τους BRAF^{V600E} (αC OUT) αναστολείς παραδόξης ενεργοποίησης του MAPKσηματοδοτικού μονοπατιού. Οι περισσότεροι αναστολείς αC OUT σταθεροποιούν την αC-έλικα αC (κόκκινη κυματιστή γραμμή στην περιοχή κινάσης) στη θέση OUT (1). Αλληλεπίδραση της RAF με το RAS-GTP (2)προάγει τη φωσφορυλίωση και το διμερισμό της. Η πρόσδεση του αναστολέα στο ένα μονομερές σταθεροποιεί τηναC-έλικα στη θέση OUT εμποδίζοντας στερεοχημικά την πρόσδεση του αναστολέα στο δεύτερο μονομερές, η ενεργοποίηση του οποίου οδηγεί στην παράδοση σηματοδότηση του ERK⁵¹

Αναστολείς τρίτης γενιάς-paradox breakers: Παρά το γεγονός ότι οι αναστολείς δεύτερης γενιάς που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά τη θεραπεία του μελανώματος στη μετάλλαξη BRAF^{V600E} έχουν δείξει αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών⁵⁶ το γεγονός της παράδοξης ενεργοποίησης του μονοπατιού MAPK οδήγησε στην προσπάθεια δημιουργίας αναστολέων τρίτης γενιάς (paradox breakers). Η στρατηγική της Plexxikon προκειμένου να ξεπεραστεί η παράδοξη ενεργοποίηση ήταν να βρεθούν μικρά μόρια αναστολείς της BRAF^{V600E} ικανά να διαταράξουν τον σχηματισμό διμερών RAF.

Το plx-7904 είναι ένα μόριο με δομή παρόμοια με αυτή του vemurafenib, η ουρά πρότυπο-σουλφοναμιδίου του vemurafenib έχει αντικατασταθεί με N-αιθυλμεθυλ-σουλφοναμίδιο και το φαίνυλιο στη θέση 5 του αζα-ινδολίου έχει αντικατασταθεί από πυριμιδυλομάδα. Το plx-7904 είναι σε προκλινικές δοκιμές ενώ το ανάλογο PLX8394 είναι σε κλινικές δοκιμές φάσης I/II.⁵⁷ (Εικόνα 24)

Οι νέοι αναστολείς καταστέλλουν τα μεταλλαγμένα κύτταρα BRAF χωρίς ενεργοποίηση της οδού MAPK σε κύτταρα wt-BRAF που φέρουν μετάλλαξη στο RAS. Επιπλέον, φαίνεται να είναι αποτελεσματικοί έναντι αρκετών μηχανισμών που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στην προηγούμενη γενιά αναστολέων.

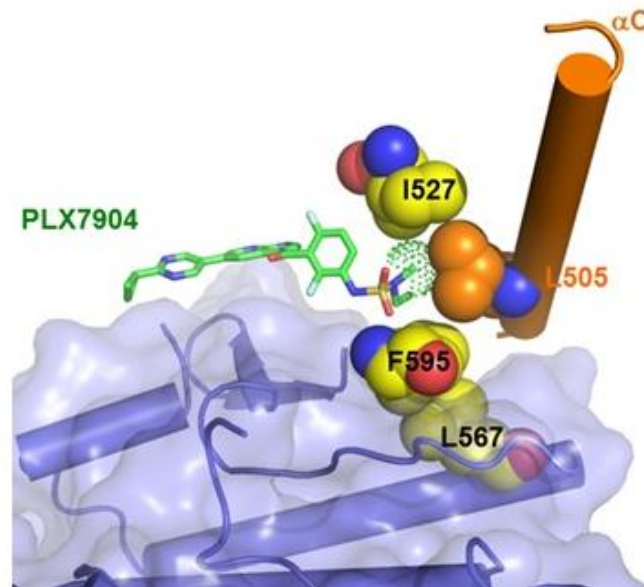


IC ₅₀ nM	plx-7904	PLX8394
BRAF-wt	140	14
BRAFV600E	4.2	3.8
CRAF	91	23

Εικόνα 24 Αναστολείς τρίτης γενιάς (paradoxbreakers), plx-7904 (αριστερά) και plx-8394 (δεξιά) (σε

Κρυσταλλογραφικά δεδομένα δείχνουν το τελικό N-μεθύλιο του PLX7904 να προσεγγίζει περισσότερο την Leu505 στο άκρο της αC-έλικας προκαλώντας μία μετατόπιση των ατόμων άνθρακα της πλευρικής αλυσίδας κατά 0.6–1Å μεγαλύτερη σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο αναστολέα. (Εικόνα 25)

Αν και η κρυσταλλική δομή δείχνει τη BRAF^{V600E} ως διμερές με το PLX7904 να φιλοξενείται στο ενεργό κέντρο μόνο του ενός μονομερούς, υποστηρίζεται ότι σε συνθήκες κυττάρου, η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ PLX7904 και Leu505 θα μπορούσε να οδηγήσει σε περαιτέρω απομάκρυνση προς τα έξω της αC-έλικας, διαταράσσοντας τη διεπιφάνεια του διμερούς.



Εικόνα 25 Προτεινόμενος μοριακός μηχανισμός δράσης των paradoxbreakers. Η διακεκομμένη επιφάνεια γύρω από την ομάδα N-μεθυλίου του PLX7904 απεικονίζει την στενή επαφή του με το Leu505 στο άκρο της αC-έλικας⁵⁷

8 Σκοπός

Η παρούσα εργασία στόχευσε στην εφαρμογή καινοτόμων *insilico* τεχνικών για την ανακάλυψη πρόδρομων βιοδραστικών ενώσεων (hit compounds) με εκλεκτική δράση έναντι της ογκοπρωτεΐνης BRAF^{V600E} προσβλέποντας σε ενώσεις που δεν θα επάγουν την παράδοση ενεργοποίηση του ERK.

Εφαρμόστηκε εικονική σάρωση (virtual screening) της βιβλιοθήκης μορίων ZINC (11,8 M ενώσεις) με βάση φαρμακοφόρα μοντέλα που εξήχθησαν με τη χρήση του υπολογιστικού πακέτου LigandScout από τη δομή των συμπλόκων της πρωτεΐνης BRAF^{V600E} με τον ισχυρό αναστολέα-φάρμακο dabrafenib αλλά και τον αναστολέα τρίτης γενιάς– paradox breaker σε προκλινικό στάδιο ελέγχου(plx7904).

Περαιτέρω εφαρμόστηκε ένα σύνολο υπολογιστικών εργαλείων ώστε να φιλτραριστεί η βιβλιοθήκη μορίων συμπεριλαμβανομένων προγραμμάτων πρόβλεψης φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων, *insilico* μοριακής πρόσδεσης (GlideHTVS και IFD) στην κρυσταλλική δομή του BRAF^{V600E}.

Η διαχείριση του τεράστιου όγκου δεδομένων έγινε εφικτή μέσω της πλατφόρμας KNIME και της ενσωμάτωσης κατάλληλων λειτουργικών κόμβων στο γραφικό της περιβάλλον.

Μεταξύ των "κατάλληλων" μορίων θα δοθεί προτεραιότητα στις ενώσεις με ικανοποιητικό προφίλ ADMET για την αξιολόγηση της ανασταλτικής τους δράσης και εκλεκτικότητας χρησιμοποιώντας invitro δοκιμασία κινάσης ενάντια σε BRAF^{V600E} και BRAF-wt. Τα πλέον υποσχόμενα θα δοκιμαστούν σε κυτταρικές σειρές για την αποτελεσματικότητά τους.

9 Μέθοδοι

9.1 Ligand Scout

Η δημιουργία των φαρμακοφόρων μοντέλων πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος LigandScout 3.11. Το LigandScout αποτελεί μία σουίτα προγραμμάτων της εταιρίας Inte:Ligand η οποία εδρεύει στην Βιέννη. Η ίδια εταιρεία εκτός από το λογισμικό LigandScout διαθέτει διάφορα υπολογιστικά



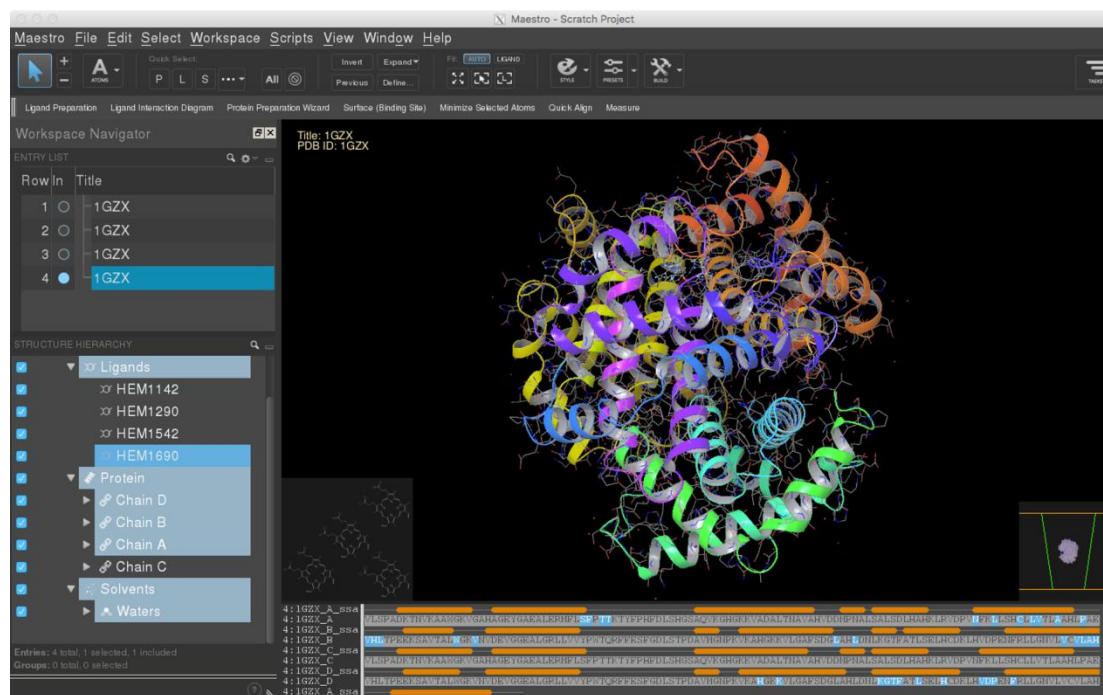
Εικόνα 26 Υπολογιστικό περιβάλλον LigandScout

από τα πιο εύχρηστα και αποδοτικά εργαλεία για τον σχεδιασμό φαρμάκων. Η πλατφόρμα προσφέρει μεθόδους για σχεδιασμό, φιλτράρισμα, αναζήτηση, κατηγοριοποίηση και σύνθεση μορίων. Από τις πιο διαδεδομένες χρήσεις του LigandScout είναι η δημιουργία τρισδιάστατων φαρμακοφόρων μοντέλων, η εικονική σάρωση και η δημιουργία εικονικών βιβλιοθηκών μορίων στόχων^{26,58}.

εργαλεία που βοηθούν στη διαδικασία του σχεδιασμού φαρμάκων όπως το ilibdiverse, το οποίο δημιουργεί εικονικές βιβλιοθήκες με τον συνδυασμό μικρό τμημάτων μορίων (fragments) και το pharmacophoreDB, που αποτελεί μία συλλογή με περισσότερα από 9600 διαφορετικά φαρμακοφόρα μοντέλα.

Σε αυτή τη σουίτα περιλαμβάνονται μερικά

Το προγραμματιστικό περιβάλλον Maestro11, που ανήκει στην εταιρεία Schrodinger, αποτελεί τη δεύτερη σουίτα προγραμμάτων, η οποία χρησιμοποιήθηκε ευρέως στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.



Εικόνα 27 Υπολογιστικό περιβάλλον Schrodinger

Η συγκεκριμένη σουίτα συγκεντρώνει ένα τεράστιο πλήθος διαφόρων προγραμμάτων, που σαν σκοπό έχουν την απεικόνιση και την ανάλυση των διαφόρων παραμέτρων που χρησιμοποιούνται σε όλη τη διαδικασία του υπολογιστικού σχεδιασμού φαρμάκων. Ενδεικτικά υπάρχουν προγράμματα πρόσδεσης μικρών μορίων σε πρωτεϊνικούς στόχους βιολογικού ενδιαφέροντος, δημιουργία τρισδιάστατων φαρμακοφόρων κατηγοριοποίησης με βάση φυσικοχημικές ιδιότητες προετοιμασία μορίων στόχων και προσδετών (ελαχιστοποίηση ενέργειας, PH).⁵⁹

Παράλληλα με το περιβάλλον των προγραμμάτων που αναφέρθηκαν οι αλγόριθμοι που παρέχονται είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν και μέσω του προγράμματος Knime.

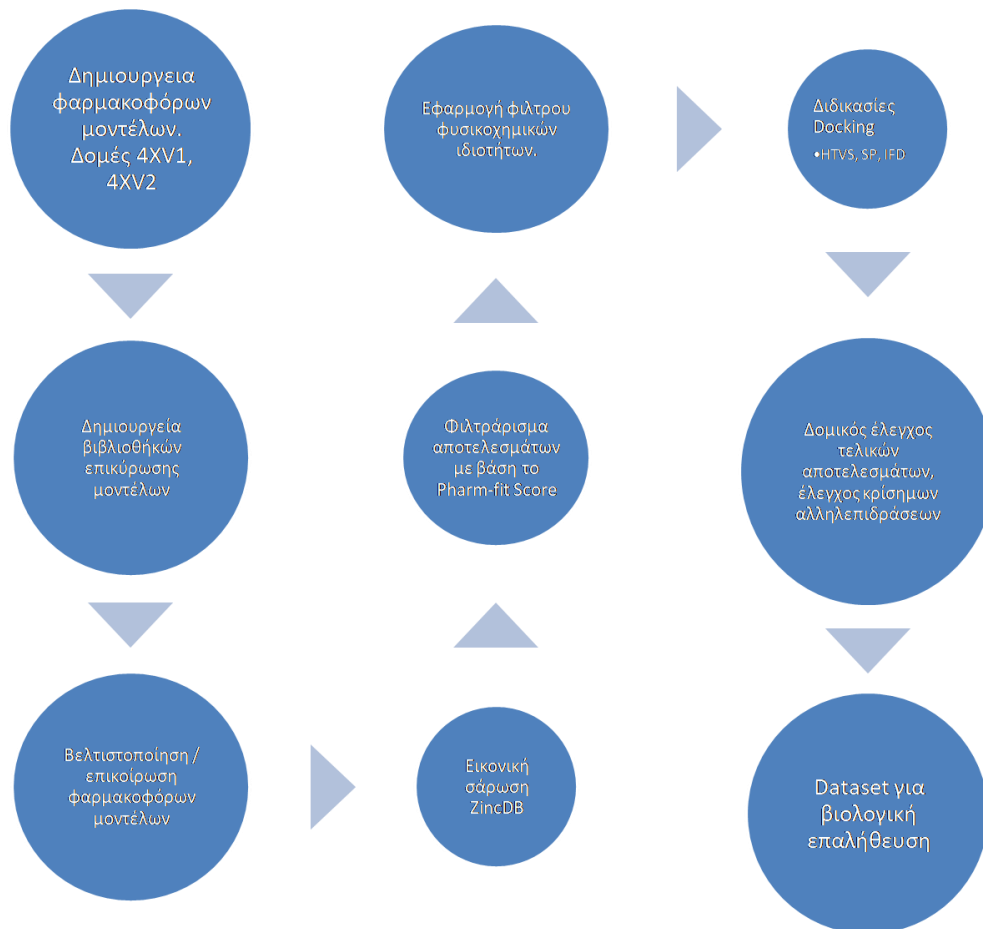
9.2 Knime

Το πρόγραμμα Knime αποτελεί μία πλατφόρμα για την ανάλυση διαφόρων δεδομένων. Η λειτουργία του προγράμματος βασίζεται στη συγκέντρωση διαφόρων επιμέρους προγραμμάτων (nodes) τα οποία είναι δυνατόν να τοποθετηθούν σε μία ροή εργασίας με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η μέγιστη απόδοση τόσο ως προς την ευκολία χρήσης όσο και ως προς τον χρόνο που απαιτείται για την εφαρμογή του καθενός από τα προγράμματα. Πέρα από την εφαρμογή του προγράμματος αυτού σε διαδικασίες όπως είναι ο σχεδιασμός φαρμάκων, το ίδιο πρόγραμμα μέσω κατάλληλων nodes που διαθέτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαδικασίες, όπως ο χειρισμός βάσεων δεδομένων, η εξαγωγή στατιστικών στοιχείων, ο προγραμματισμός σε διάφορες γλώσσες κ.α.

9.3 Perl

Γλώσσα προγραμματισμού perl σχεδιάστηκε από τον Larry Wall στα τέλη της δεκαετίας του '90. Αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες γλώσσες προγραμματισμού που χρησιμοποιούνται στους τομείς της βιοπληροφορικής καθώς πέραν της ευκολίας στη χρήση, διαθέτει μεγάλη ευελιξία στην διαχείριση και εξαγωγή πληροφορίας από αρχεία κειμένου. Ακόμα το γεγονός ότι διαθέτει έτοιμα modules που καλύπτουν ένα τεράστιο φάσμα λειτουργιών καθώς και την επέκταση bioperl την καθιστά τα τελευταία 20 χρόνια ένα από τα πιο χρήσιμα εργαλεία για την επίλυση προγραμματιστικών προβλημάτων, όπως η δημιουργία αλγορίθμων, η τροποποίηση και η βελτιστοποίηση τους καθώς επίσης και η εύρεση και η εξαγωγή πληροφορίας σε μεγάλο όγκο Βιολογικών δεδομένων.

10 Αποτελέσματα-Συζήτηση



Εικόνα 28 Διάγραμμα ροής της πορείας εργασίας καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων

10.1 Δημιουργία φαρμακοφόρων μοντέλων

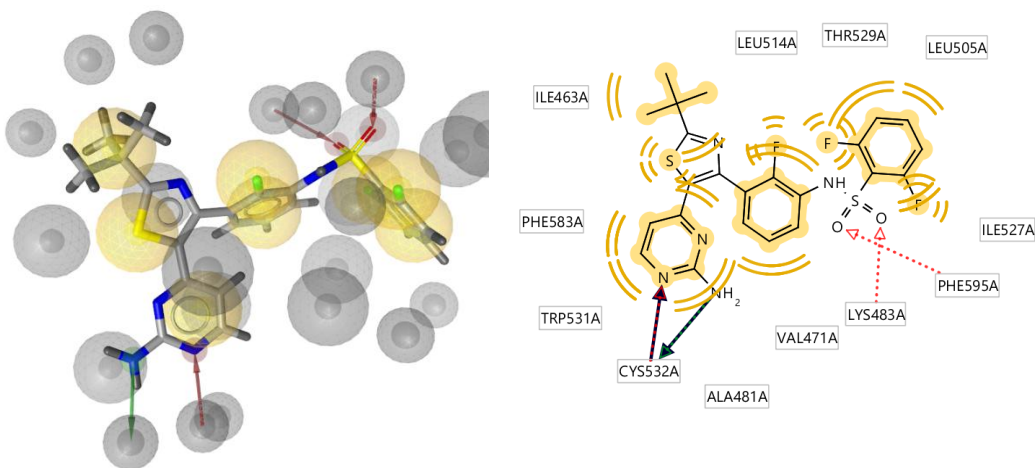
Στο σχεδιασμό φαρμάκων η δημιουργία ενός ρεαλιστικού φαρμακοφόρου μοντέλου, του οποίου η στατιστική σημαντικότητα προσδίδει βεβαιότητα στην διαδικασία της εικονικής σάρωσης βιβλιοθηκών μορίων (virtual screening), είναι μία από τις πιο βασικές διαδικασίες. Η ύπαρξη διαφόρων λογισμικών διευκολύνει την αυτή καθαυτή δημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου, παρόλα αυτά και ειδικά στις περιπτώσεις δομικού σχεδιασμού φαρμάκων ένα φαρμακοφόρο μοντέλο, το οποίο έχει προκύψει, ακόμα και αν υπάρχει δομική πληροφορία, από μόνο έναν προσδότη, δεν παύει να είναι υπερβολικά εκλεκτικό. Το αποτέλεσμα αυτού είναι πώς σε οποιαδήποτε διαδικασία φιλτραρίσματος μιας βάσης δεδομένων τα αποτελέσματα που θα προκύψουν θα είναι ελάχιστα έως μηδενικά, αναπαράγοντας στο μεγαλύτερο ποσοστό τους ίδια δομή με αυτή του αρχικού.

Για αυτόν ακριβώς το λόγο κάθε φαρμακοφόρο μοντέλο το οποίο δημιουργείται με κάποιο λογισμικό θα πρέπει να υπόκειται σε μία διαδικασία επικύρωσης μέσα από ένα σύνολο ήδη γνωστών δραστικών και μη δραστικών προσδετών, οι οποίοι υπάρχουν στη βιβλιογραφία.

10.1.1 Φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση το dabrafenib

Το πρώτο στάδιο της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν να δημιουργήσουμε ένα φαρμακοφόρο μοντέλο το οποίο θα μπορούσε με αξιοπιστία να εντοπίσει μόρια τα οποία μοιράζονταν κοινές ιδιότητες ή ακόμα και βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με αυτές του Dabrafenib.

Το φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση



Εικόνα 29 Φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση το Dabrafenib (4XV2) το οποίο δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία.

το σύμπλοκο BRAFV600E : Dabrafenib(pdb:4xv2) περιείχε 34 features: 8 υδροφοβικές περιοχές ,3 δέκτες δεσμών H, 1 δότη δεσμού H και 22 περιοχές αποκλεισμού (exclusion volumes). (Εικόνα 29)

10.1.2 Βελτιστοποίηση του φαρμακοφόρου μοντέλου

Από τη βάση δεδομένων ChEMBL εντοπίσαμε όλους εκείνους τους προσδέτες οι οποίοι σχετίζονται με τη πρωτεΐνη BRAF, αυτές ανέρχονται στις 4451. Από αυτές οι 2071 σχετίζονται με την μετάλλαξη η οποία μας ενδιαφέρει, την V600E ή V599E και οι 2.380 από τις καταχωρήσεις οι οποίες σχετίζονται με άλλες μεταλλάξεις. Έπειτα έπρεπε να γίνει διαχωρισμός μεταξύ δραστικών ενώσεων (actives) και μη δραστικών (inactives). Βασικές παράμετροι σε αυτόν τον διαχωρισμό αποτελούν οι τιμές δραστηριότητας εκφρασμένες ως IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration), EC₅₀ (Half maximal effective concentration), Ki (inhibitory constant), Kd (dissociation constant). Επιλέχθηκε το IC₅₀ καθώς οι καταχωρήσεις για τις υπόλοιπες τρεις ήταν ελλιπείς. Τα μόρια της βάσης ChEMBL κατηγοριοποιήθηκαν ως ακολούθως (Πίνακας 9):

Πίνακας 3 Κατηγοριοποίηση ενώσεων βάση της τιμής IC₅₀

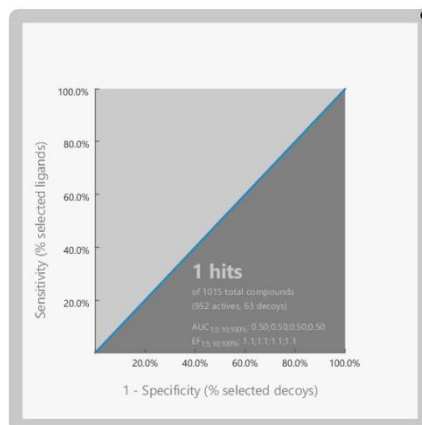
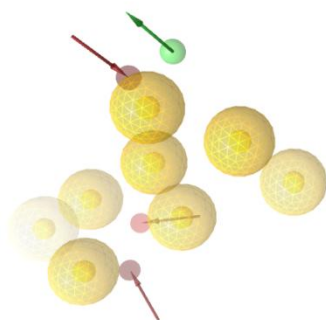
IC ₅₀ <1000nM	Υψηλώς ενεργά
1000<IC ₅₀ <10000 nM	Μεσαίως ενεργά
10000<IC ₅₀ <100000 nM	Χαμηλώς ενεργά
IC ₅₀ >100000 nM	ανενεργά

Για τη διευκόλυνση της διαδικασίας, γράφτηκε πρόγραμμα σε γλώσσα προγραμματισμού perl το οποίο δεχόταν σαν είσοδο (input) το αρχείο EXCEL από την ChEMBL. Μέσω του προγράμματος δινόταν η δυνατότητα της επιλογής συγκεκριμένης μετάλλαξης και η δυνατότητα να οριστούν δευτερεύοντα φίλτρα για την περαιτέρω κατηγοριοποίηση των καταχωρήσεων. Η έξοδος (Output) του προγράμματος περιελάμβανε ξεχωριστά αρχεία με τις καταχωρήσεις εκείνες οι οποίες σχετίζονταν με την μετάλλαξη V600E διαχωρισμένες σε αρχεία με κριτήριο το πια παράμετρο από τις τέσσερις που αναφέρθηκαν (IC₅₀, EC₅₀, K_i, K_d) ήταν διαθέσιμη.

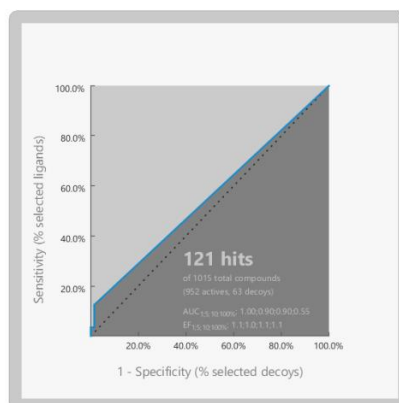
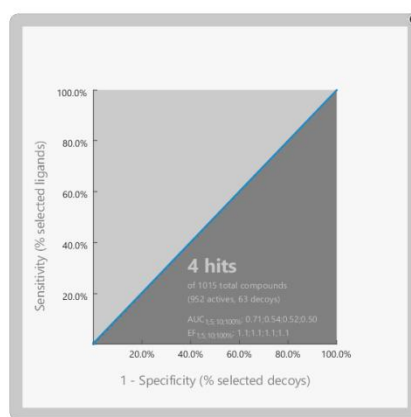
Το τελικό αποτέλεσμα περιείχε ένα αρχείο 1013 καταχωρήσεων εκ των οποίων οι 950 αφορούσαν υψηλά ενεργές ενώσεις και οι 63 αφορούσαν μη δραστικές. Στην βιβλιοθήκη με της δραστικές ενώσεις εισήχθησαν και τα smiles των ενώσεων dabrafenib, vemurafenib και plx7904, τα οποία λειτούργησαν σαν θετικά controls τις διαδικασίας βελτιστοποίησης.

Τα δύο αρχεία μετατράπηκαν σε αρχεία συμβόλων (simplified molecular-input line-entry system ή SMILES) .smi και αυτά με τη σειρά τους μέσω του προγράμματος LigandScout σε αρχεία βάσης δεδομένων (Library in Local Database).ldb τα οποία αποτελούν τις βιβλιοθήκες των τρισδιάστατων πλέον δομών από όπου ένα φαρμακοφόρο μοντέλο επιλέγει ενώσεις και ελέγχει την προσαρμογή τους με τα χαρακτηριστικά του. Κάθε δομή της βιβλιοθήκης μπορεί να λάβει όλες τις δυνατές ενεργειακά ευνοϊκές διαμορφώσεις με μέγιστο αριθμό τις 100. Στη συνέχεια με εφαρμογή της στατιστικής της καμπύλης του δείκτη λειτουργικών χαρακτηριστικών (ROC curve) αξιολογείται το φαρμακοφόρο μοντέλο.

B



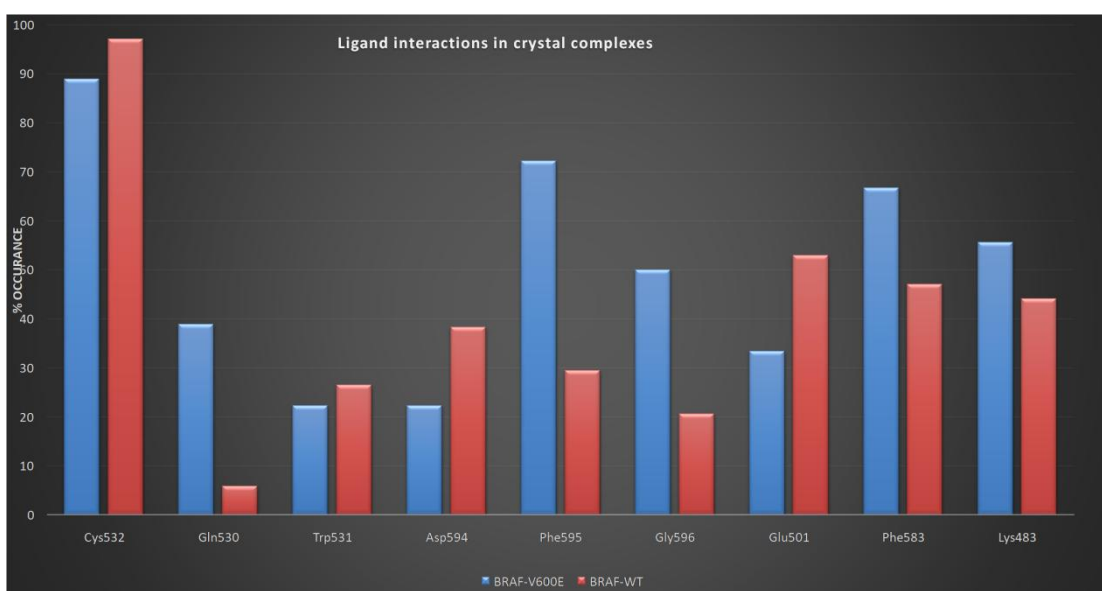
Γ



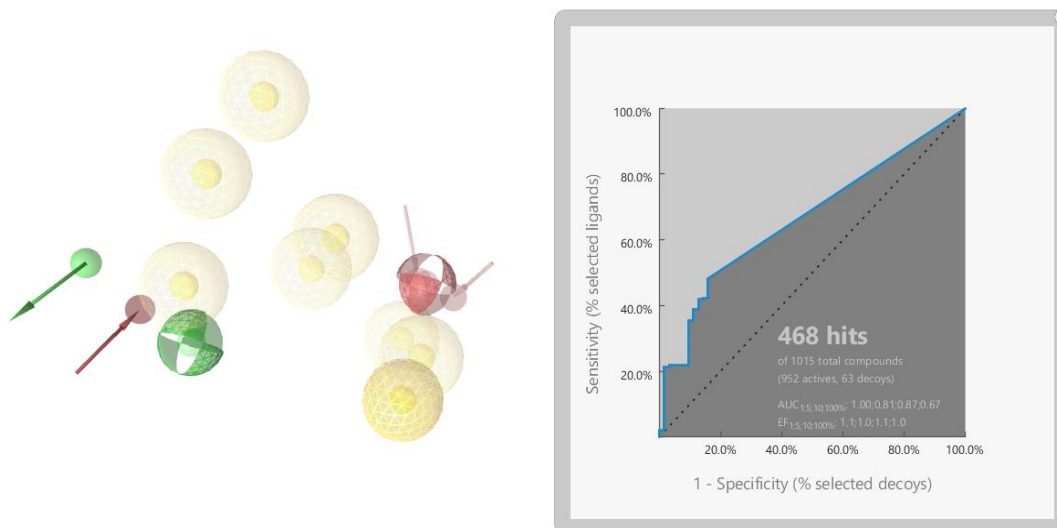
Εικόνα 30 Τρία διαφορετικά στάδια στην πορεία βελτιστοποίησης του φαρμακοφόρου με διαφορετικές αφαιρέσεις Features A: Με αφαίρεση μόνο ενός Feature(αχνό χρώμα) το μοντέλο παραμένει πολύ αυστηρό με αποτέλεσμα να εντοπίζει από την βιβλιοθήκη μόνο το Dabrafenib από το οποίο δημιουργήθηκε. B: Με αφαίρεση παραπάνω στοιχείων του φαρμακοφόρου το μοντέλο αρχίζει να εντοπίζει παραπάνω ενώσεις χωρίς όμως ικανοποιητικά αποτελέσματα. Γ: Με την στοχευμένη αφαίρεση χαρακτηριστικών του μοντέλου προκύπτει ένα βελτιωμένο μοντέλο όπως αποτυπώνεται από την καμπύλη ROC και από τον αριθμό των ανακτηθέντων δραστικών ενώσεων.

Η βελτιστοποίηση ενός φαρμακοφόρου μοντέλου είναι μία από τις πιο σημαντικές αλλά και χρονοβόρες διαδικασίες στην πορεία της εικονικής σάρωσης. Ειδικά σε περιπτώσεις μοντέλων με πολλά στοιχεία η βελτιστοποίηση είναι δυνατό να πάρει πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα για να ολοκληρωθεί. (Εικόνα 29)

Κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης διατηρήθηκαν κρίσιμες αλληλεπιδράσεις όπως προκύπτουν από τα διαθέσιμα κρυσταλλικά σύμπλοκα της πρωτεΐνης με μόρια αναστολείς (Cys532, Phe595 και Lys483). (Εικόνα 31,32)

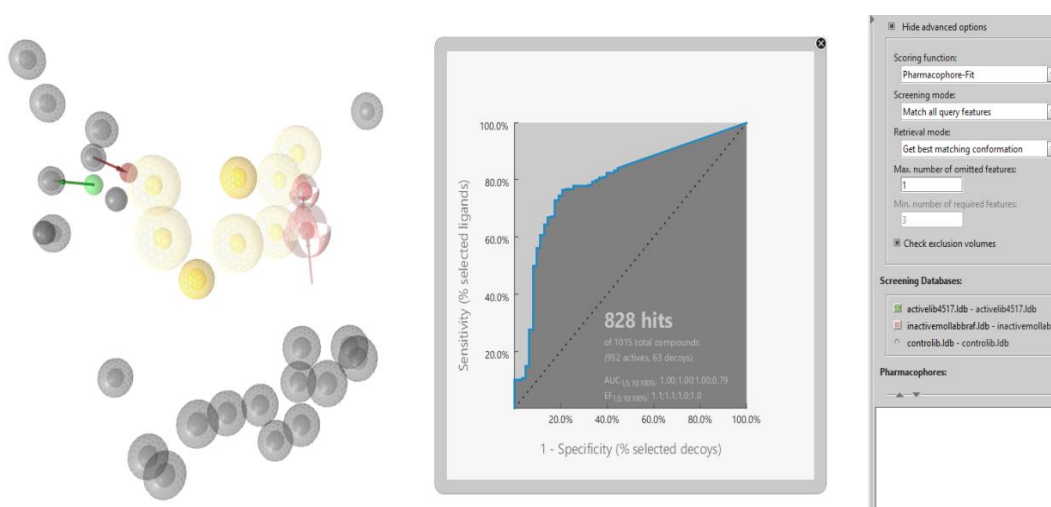


Εικόνα 31 Συχνότητα εμφάνισης αλληλεπιδράσεων μεταξύ BRAFV600E και BRAF-wt



Εικόνα 32 Βελτιστοποιημένο φαρμακοφόρο μοντέλο με την διατήρηση Features που αντιστοιχούν στις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με μόρια αναστολείς.

Το επόμενο βήμα στη διαδικασία βελτιστοποίησης ήταν η τροποποίηση των exclusion volumes τόσο σε πλήθος όσο και σε όγκο. Η διαδικασία αυτή καθώς και η θεώρηση ενός χαρακτηριστικού του φαρμακοφόρου ως προαιρετικό (optional) βελτίωσε εμφανώς το φαρμακοφόρο μοντέλο όπως υποδεικνύεται από την καμπύλη ROC της . (Εικόνα 33)

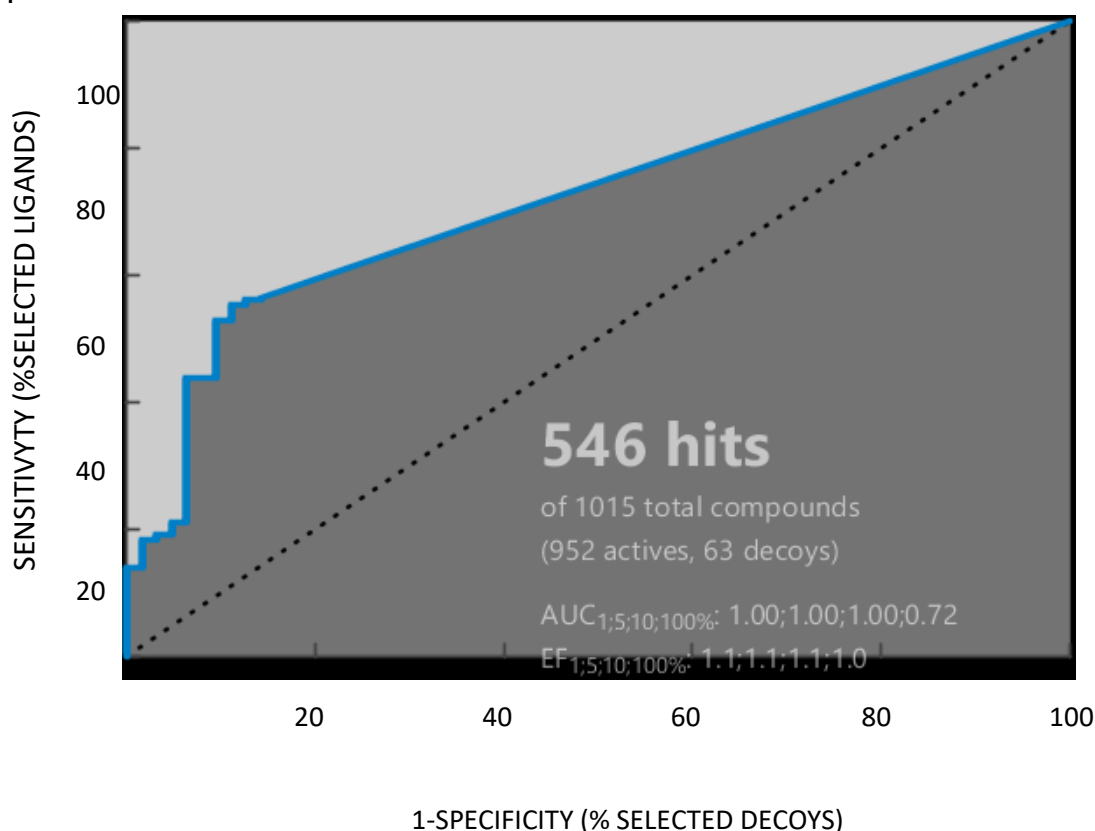


Εικόνα 33 Η χρήση την επιλογής του ορισμού ενός στοιχείου του φαρμακοφόρου ως προαιρετικό οδήγησε σε εμφανή βελτίωση των στοιχείων της καμπύλης ROC.

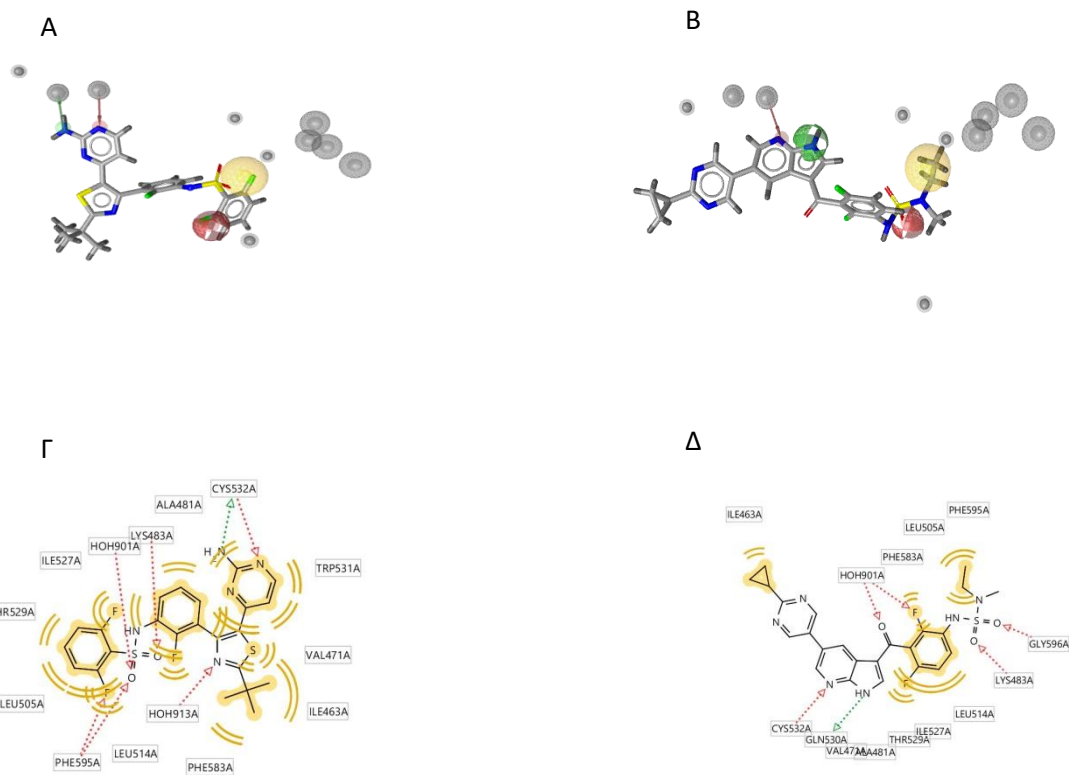
10.1.3 Φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση το rlx7904

Ηδημιουργία του φαρμακοφόρου μοντέλου με βάση το σύμπλοκο BRAFV600E : rlx7904 (pdb: 4xn1) κρίθηκε αναγκαία δεδομένου ότι αποτελεί paradoxbreaker.

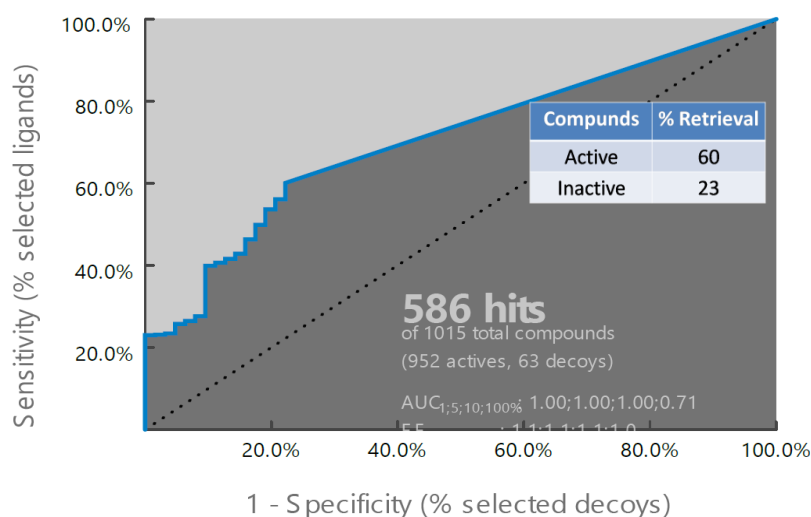
Το φαρμακοφόρο του rlx7904 βελτιστοποιήθηκε με βάση τα χαρακτηριστικά του τελικού φαρμακοφόρου μοντέλου του dabrafenib (Εικόνα 34). Είναι αξιοσημείωτη η ομοιότητα των δύο φαρμακοφόρων μοντέλων (Εικόνα 35). Η διαφορά τους εστιάζεται στο γεγονός ότι ο δότης δεσμού Η που προέρχεται από την αλληλεπίδραση του dabrafenib με την Cys532 έχει αντικατασταθεί με το δότη δεσμού Η προερχόμενο από την αλληλεπίδραση του rlx7904 με το γειτονικό και επίσης κρίσιμο αμινοξύ Gln530. (Εικόνα 35)



Εικόνα 34 Καμπύλη ROCβελτιστοποιημένου μοντέλου rlx7904



Εικόνα 35 (Α,Β) Φαρμακοφόρα μοντέλα Dabrafenib και p1x7904. (Γ,Δ) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων και πρωτεΐνης στόχου σε συνδυασμό με τα αρχικά φαρμακοφόρα μοντέλα



Εικόνα 36 Καμπύλη ROC ύστερα από την χρήση και των δύο φαρμακοφόρων με τον λογικό τελεστή «or». Έχοντας ένα πολύ ικανοποιητικό ποσοστό AUC και ακόμα με το ποσοστό των ενώσεων που επιλέγονται και παρουσιάζουν την καλύτερη προσαρμογή στο μοντέλο ανήκουν στην ομάδα των δραστικών ενώσεων να είναι πάνω από το 20% δίνεται ένα πολύ ικανοποιητικό επίπεδο για να συνεχίσουμε στην εικονική σάρωση

10.1.4 Συνδυασμός των δύο φαρμακοφόρων μοντέλων

Παρατηρήθηκε ότι η συνδυαστική χρήση των δύο φαρμακοφόρων μοντέλων (με χρήση του λογικού τελεστή OR) οδήγησε σε θετικότερα αποτελέσματα όπως αυτά προκύπτουν από την αντίστοιχη καμπύλη ROC. (Εικόνα 36) Συγκεκριμένα, με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η ανάκτηση του 60% των δραστικών ενώσεων ενώ το ποσοστό των μη δραστικών περιορίζεται σε 23%. Η ισχύς του μοντέλου επιβεβαιώνεται και από την αρχική κάθετη κλίση της καμπύλης ROC που υποδηλώνει ότι το 22% των ενώσεων που επιλέγονται και παρουσιάζουν την καλύτερη προσαρμογή στο μοντέλο ανήκουν στην ομάδα των δραστικών ενώσεων.

10.2 Εικονική σάρωση

10.2.1 Προετοιμασία βιβλιοθήκης μορίων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη μορίων της ZINC με 11.803.709 καταχωρήσεις. Η βιβλιοθήκη διαιρέθηκε σε υποβιβλιοθήκες με βάση το μοριακό βάρος των ενώσεων σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4 Τμηματοποίηση της ZincDB με βάση το μοριακό βάρος των ενώσεων και απεικόνιση του πλήθους των μορίων που έχει η κάθε μία υποομάδα

Τμήματα (g/mol)	Πλήθος ενώσεων (μόρια)
300-310	937146
310-320	1040558
320-330	1121795
330-340	1256826
340-350	1410849
350-360	133411
360-370	1287761
370-380	933557
380-390	693170
390-400	593351
400-410	434318
410-420	411302
420-430	397656
430-440	369472
440-450	344689
450-460	276483
460-470	245667
470-480	226427
480-490	200171
490-500	175132
500-600	211400

10.2.2 Διαδικασία εικονικής σάρωσης

Κάθε επιμέρους υποβιβλιοθήκη μετατράπηκε σε αρχείο .ldb κατάλληλο για εισαγωγή στο υπολογιστικό πακέτο LigandScout και σάρωση με βάση τα φαρμακοφόρα μοντέλα. Τα υποσύνολα της βάσης ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα iscreen.exe της inte:ligand ως προς την προσαρμογή τους στα χαρακτηριστικά των φαρμακοφόρων μοντέλων. Η δυνατότητα που παρέχει το συγκεκριμένο λογισμικό στο να λειτουργεί μέσω CMD εκτός του GUI μείωσε τον χρόνο λήψης αποτελεσμάτων. Το πρόγραμμα iscreen παρέχει σαν output αρχεία .sdf που περιέχουν τις δομές οι οποίες επιλέχθηκαν από το φαρμακοφόρο και τη βαθμονόμηση της προσαρμογής στο μοντέλο (pharmacophore-fit score).

Τα ορίσματα που χρησιμοποιούνται για την λειτουργία του προγράμματος

```
>iscreen -q pharmacophore.pmz -d database.ldb -o hitlist.sdf
```

είναι -q για τον ορισμό του/των φαρμακοφόρων μοντέλων που θα γίνει ο έλεγχος, -d για την εισαγωγή της βιβλιοθήκης σε μορφή αρχείου .ldb και -o για τον ορισμό της τοποθεσίας του αρχείου .sdf που θα προκύψει από την σάρωση. Στην περίπτωση μας χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον τα ορίσματα -b για τον ορισμό των λογικών τελεστών, που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν το OR και -x για τον ορισμό του πλήθους των πυρήνων του server που έγινε η επεξεργασία.

Η σάρωση ανέδειξε 546853 μόρια ως hits με τιμές βαθμονόμησης προσαρμογής (pharmacophore-fit score) στο εύρος 43,61-47,90. Οι αντίστοιχες τιμές προσαρμογής στο φαρμακοφόρο για τις ενώσεις dabrafenib και plx7904 ήταν 47,47 και 47,89 αντίστοιχα.

10.2.3 Φιλτράρισμα των ενώσεων που αναδείχθηκαν από την εικονική σάρωση με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητές τους.

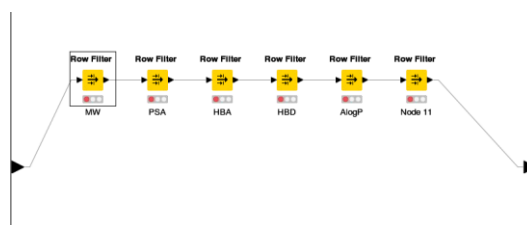
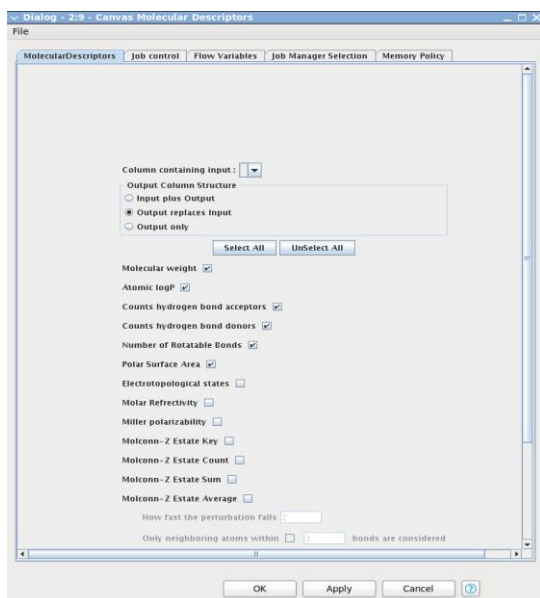
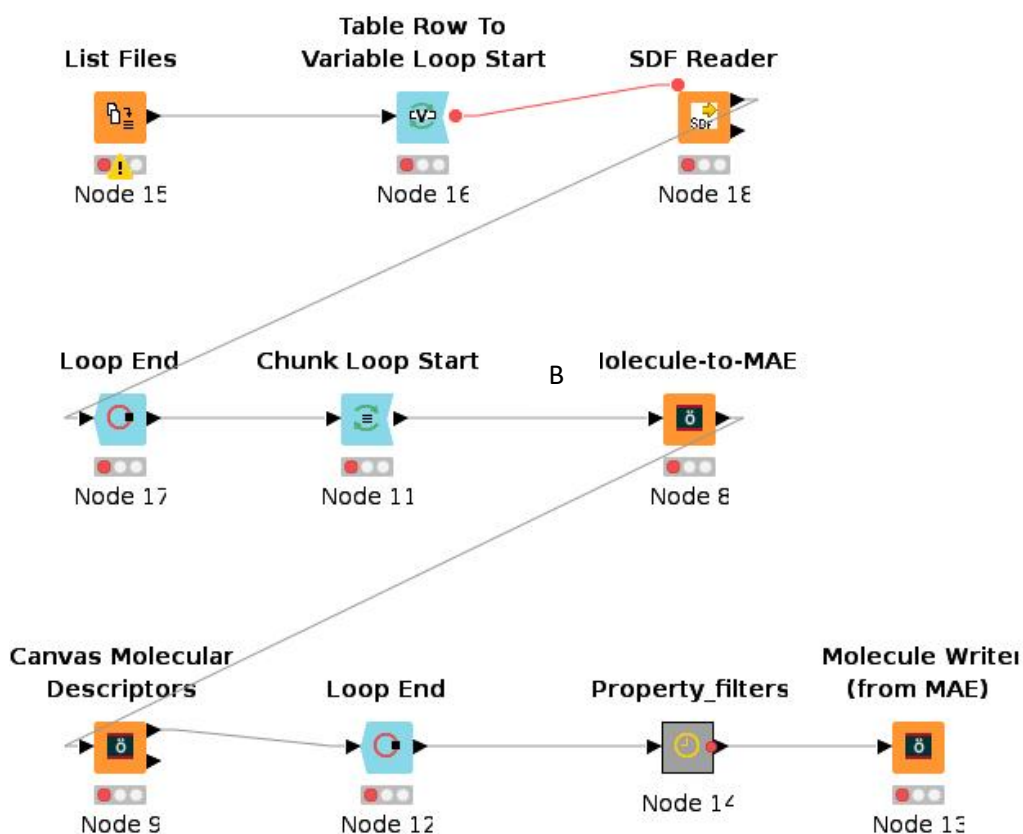
Στοχεύοντας στον περιορισμό της λίστας των hits που ανέδειξε η εικονική σάρωση έγινε φιλτράρισμα των ενώσεων με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (Πινάκας 5)

Πίνακας 5 Τιμές φυσικοχημικών ιδιοτήτων που επιλέχθηκαν από την εικονική σάρωση

Ιδιότητες	Εύρος τιμών
Μοριακό Βάρος (MW)	303-735g/ mol
Λιποφιλικότητα (LogP)	0.341-7.125
Δότες δεσμών υδρογόνων(HBD)	1-4
Δέκτες δεσμών υδρογόνων(HBA)	2-9
Πολική επιφάνεια(PSA)	49,33-172 Å
Περιστρεφόμενοι δεσμοί (RB)	1-13

Τα κριτήρια επιλέχθηκαν με βάση διευρυμένα κριτήρια Lipinskiόπως αυτά προέκυψαν συνυπολογίζοντας τις αντίστοιχες ιδιότητες των δραστικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση των φαρμακοφόρων μοντέλων.

Το φιλτράρισμα των ενώσεων υλοποιήθηκε μέσα από την πλατφόρμα Schrödinger KNIME Extensions όπου οι επιμέρους κόμβοι (nodes) του Schrödinger στο δομημένο περιβάλλον του knime επιτρέπουν τον αυτοματισμό της ροής εργασίας. Έτσι, τα επιμέρους αρχεία των hits (.sdf) ενοποιήθηκαν σε μία λίστα, το αρχείο μετατράπηκε σε μορφή αναγνωρίσιμη από τα Schrodinger (.mae), υπολογίστηκαν οι φυσικοχημικές παράμετροι των μορίων με τη βοήθεια του προγράμματος χημειοπληροφορικής Canvas το οποίο περιέχεται στην σουίτα του Schrodinger και ακολούθησαν τα φίλτρα με τις επιθυμητές τιμές των επιλεγμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων. (Εικόνα 37) Το φιλτράρισμα ανέδειξε 430000 μόρια κατάλληλα για περαιτέρω μελέτη.



Εικόνα 37 Ροή εργασιών (Workflow) στο περιβάλλον Κνιμεεσωνματώνοντας τους κόμβους του Schrodinger (A)για την αυτοματοποίηση του φιλτραρίσματος των επιλεγέντων

10.3 Insilico μοριακή πρόσδεση

10.3.1 Προετοιμασία της πρωτεΐνης BRAF^{V600E}

Από το κρυσταλλικό σύμπλοκο της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης BRAFV600E με τον αναστολέα plx7904 (paradox breaker) (PBD ID: 4XV1) επιλέχθηκε το μονομερές που φιλοξενεί τον αναστολέα και υποβλήθηκε σε διαδικασία βελτιστοποίησης με την προσθήκη ατόμων υδρογόνου, τον έλεγχο για απουσία πλευρικών ομάδων των αμινοξέων, απομάκρυνση όλων των μορίων H₂O εκτός του κέντρου πρόσδεσης, τον καθορισμό των καταστάσεων πρωτονίωσης σε pH=7.0±0.5 όπου είναι λειτουργικό το ένζυμο και ελαχιστοποίησης της ενέργειας. Η επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα Protein Preparation Wizard τη πλατφόρμας Maestro⁶⁰

Δημιουργήθηκε ένα πλέγμα (grid generation) στην περιοχή πρόσδεσης του αναστολέα με πληροφορίες σχετικές με το σχήμα και τις ιδιότητες της θήκης πρόσδεσης όπως το ηλεκτροστατικό δυναμικό που παράγεται σε κάθε σημείο του πλέγματος, τις van der Waals αλληλεπιδράσεις κλπ. Έτσι δημιουργούνται τα αρχεία πλέγματος τα οποία αντιπροσωπεύουν το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και θα χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία της πρόσδεσης που θα εφαρμοστεί στη συνέχεια αναζητώντας τις ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πιθανών προσδετών και του πρωτεϊνικού υποδοχέα. Εφαρμόστηκε η ρουτίνα grid generation της σουίτας Schrödinger.

10.3.2 Προετοιμασία προσδετών

Οι ενώσεις που προκρίθηκαν από την εικονική σάρωση και το φιλτράρισμα με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες βελτιστοποιήθηκαν σε pH=7.0±0.5. Δημιουργήθηκαν οι ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις τους και ελέγχθηκαν όλες οι περιπτώσεις ταυτομέρειας και οι καταστάσεις ιονισμού για εξεταζόμενο εύρος τιμών του pH. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα LigPrep2.7 [LigPrep; Schrödinger, LLC, NewYork, NY, 2017]

10.3.3 Μέθοδοι μοριακής πρόσδεσης (Molecular Docking)

Στην συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι με αυξανόμενη ακρίβεια υπολογισμών. Η χρήση περισσότερων της μίας μεθόδου για την εύρεση αποτελεσμάτων είναι μία συνήθης διαδικασία ή οποία στοχεύει στην αποδοτικότερη εκμετάλλευση των υπολογιστικών πόρων.

Αναλυτικότερα οι μέθοδοι μοριακής πρόσδεσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το High-throughput Virtual Screening (HTVS), το Standard precision Docking (SP) και το Induced Fit Docking (IFD). Ο πίνακας 6 καταγράφει τον αριθμό των μορίων που δοκιμάστηκαν ως προς την πρόσδεσή τους στην πρωτεΐνη BRAFV600E με κάθε μέθοδο και τον υπολογιστικό χρόνο που απαιτήθηκε. Όλες οι μέθοδοι πρόσδεσης επικυρώθηκαν με τον έλεγχο του τρόπου πρόσδεσης του plx7904 σε σχέση με την κρυσταλλική δομή.

Πίνακας 6 Μέθοδοι Docking που χρησιμοποιήθηκαν σε σειρά αυξανόμενης πολυπλοκότητας συναρτήσει του πλήθους των μορίων και του χρόνου περάτωσης της διαδικασίας

Μέθοδος Docking	Πλήθος input (Μόρια) Χρόνος (Μέρες)	
HTVS	430000	10
SP	8228	4
IFD	140	1

10.3.3.1 Glide High-Throughput Virtual Screening (HTVS)

Η μέθοδος μοριακής πρόσδεσης HTVS αποτελεί το πρώτο στάδιο ελέγχου πρόσδεσης προκειμένου για την ταχεία σάρωση μεγάλων βιβλιοθηκών μορίων. 430000 μόρια τα οποία μέσα από τον έλεγχο των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων είχαν κριθεί κατάλληλα για περεταίρω μελέτη δοκιμάστηκαν ως

προς την πρόσδεσή τους στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και εφαρμόζοντας την επιλογή HTVS στη ρουτίνα πρόσδεσης Glidetou Scrodinger Suite. Η διαδικασία περιελάμβανε τον έλεγχο πρόσδεσης των μορίων σε ομάδες των 50000 και χρονικά διήρκησε 10 μέρες. Στη συνέχεια τα μόρια ταξινομήθηκαν ως προς τη συγγένεια πρόσδεσής τους με βάση το σκορ πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, τέθηκε κατώφλι στην τιμή του σκορ πρόσδεσης ίσο προς -7,750 περιορίζοντας τον αριθμό των ενώσεων που συνέχισαν στην παρακάτω διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης με εφαρμογή αλγόριθμου υψηλότερης ακρίβειας (SPdocking) σε 8228 μόρια.

10.3.3.2 GlideSPDocking

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος πρόσδεσης υψηλότερης ακρίβειας Glide SP docking. Από τα 8228 μόρια τα οποία εισήχθηκαν στο SP Docking μόνο τα 428 ικανοποίησαν τα κριτήρια επιλογής που τέθηκαν. Συγκεκριμένα, τέθηκε ως κατώφλι ικανοποιητικής συγγένειας πρόσδεσης τιμή για το docking score καλύτερη από $-9,500 \text{ Kcal/mol}^{-1}$ ενώ επιπρόσθετα επιλέχθηκαν μόρια που μπορούσαν να αλληλεπιδράσουν με συγκεκριμένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου. Οι κρίσιμες αλληλεπιδράσεις που τέθηκαν ως φίλτρα επιλογής ήταν με το αμινοξύ Cys532 του hinge region, τα αμινοξέα του μοτίβου DFG (Asp594, Phe595, Gly596) και τα αμινοξέα Lys483 και Phe583. Επιλέχθηκαν 140 δομές οι οποίες πληρούσαν τα κριτήρια μας.

10.3.3.3 Πρωτόκολλο Επαγόμενης Προσαρμογής (IFD docking)

Τέλος, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο Επαγόμενης Προσαρμογής (Induced Fit Docking) το οποίο επιτρέπει διαμορφωτικές αλλαγές στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων του ενεργού κέντρου επαγόμενες από την πρόσδεση του αναστολέα. Έτσι, μέσα από μια εξαντλητική διαδικασία προβλέπονται με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια οι πιθανότεροι τρόποι πρόσδεσης και οι προκαλούμενες διαμορφωτικές αλλαγές εντός του ενεργού κέντρου.

Δοκιμάστηκαν 140 δομές ως προς την πρόσδεσή τους με IFD επιλέγοντας 8 πόζες για την κάθε δομή. Οι ληφθείσες τιμές πρόσδεσης κυμάνθηκαν στο εύρος (DockingScore: -7,3 ως -15 Kcalmol⁻¹) με το docking Score (plx7904)= -13,6 Kcalmol⁻¹. Για κάθε προσδέτη μελετήθηκαν διεξοδικά οι προκύπτουσες πόζες (bindingposes) και το αντίστοιχο Glide Emodel score ώστε να επιλεγεί η πόζα με την καλύτερη προσαρμογή στη θήκη πρόσδεσης.

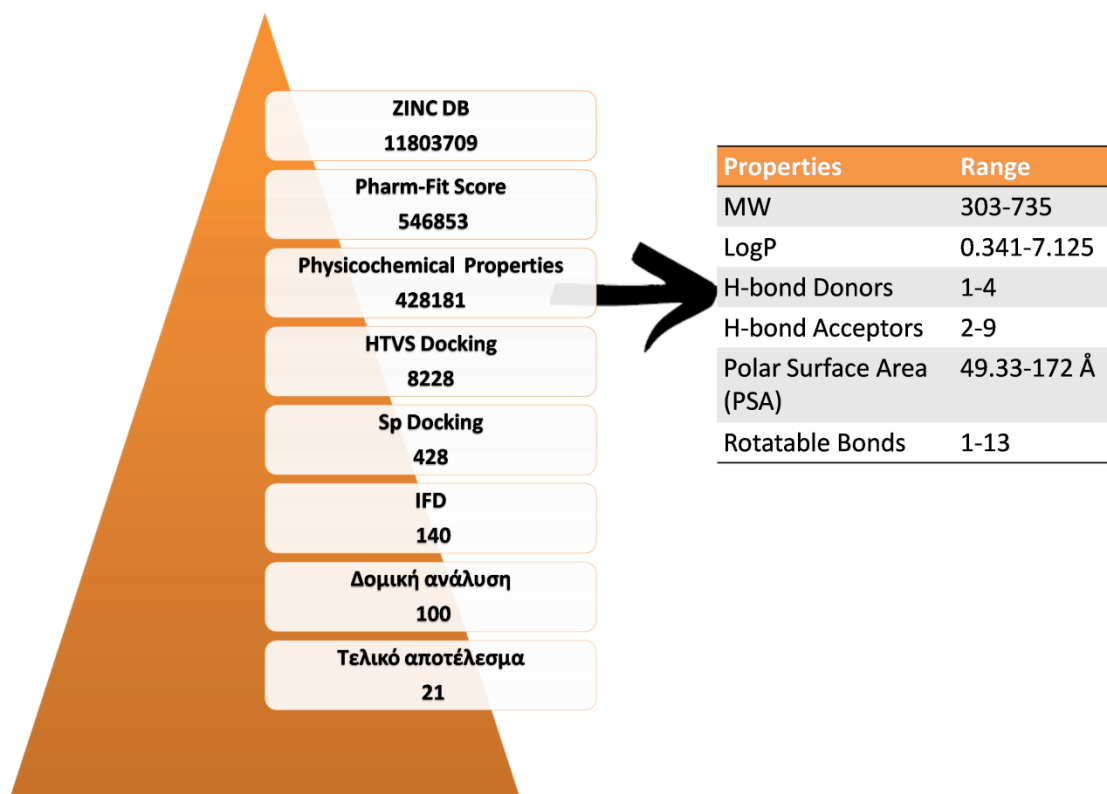
Επίσης, δεδομένου ότι το Docking Score εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου ευνοώντας μεγαλύτερες δομές που αναπτύσσουν περισσότερες λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις στη θήκη πρόσδεσης, ελέγξαμε επιπλέον για κάθε δομή το Glide ligand efficiency Score που κανονικοποιεί την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ως προς τον αριθμό των βαρέων ατόμων παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα σύγκρισης της συγγένειας πρόσδεσης διαφορετικού μεγέθους μορίων.

Τέλος, αφαιρέθηκαν δομές οι οποίες δεν είχαν δότη και δέκτη δεσμού Η ικανούς να αλληλεπιδράσουν με την Cys532 ή δότη δεσμού Η που να αλληλεπιδρά με την Cys532 και δέκτη δεσμού Η που να αλληλεπιδρά με την Gln530.

Η περιγραφείσα διαδικασία ανέδειξε τελικά 100 δομές με τον καλύτερο συνδυασμό Docking Score, Glide emodel Score και Ligand efficiency score ενώ όλες είχαν δότη και δέκτη δεσμού Η είτε στην Cys532 είτε στο ζεύγος Cys532 - Gln530. Επιπλέον κριτήρια που καθοδήγησαν την τελική επιλογή ήταν τα ακόλουθα:

1. Καλύτερες αλληλεπιδράσεις στη θήκη πρόσδεσης
2. Μικρότερη δυνατή διαμορφωτική ευελιξία
3. Ποικιλία και ενδιαφέρον στα επιμέρους δομικά τους τμήματα

Έχουν επιλεγεί 21 δομές και αποτελούν το βασικό μας dataset για την βιολογική αξιολόγησή τους.



Εικόνα 38 Απεικόνιση του πλήθους των ενώσεων σε όλα τα στάδια της εικονικής σάρωσης. Και εύρος τιμών φυσικοχημικών ηδυστήτων

11 Σύνοψη Αποτελεσμάτων

Ο πίνακας 7 παρουσιάζει την πρόβλεψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων που προέκρινε το πρωτόκολο εικονικής σάρωσης που εφαρμόστηκε. Για λόγους σύγκρισης παρατίθενται και οι ανάλογες ιδιότητες του Dabrafenib και του PLX7904.

Ο πίνακας 8 περιλαμβάνει τα σκορ πρόσδεσης των ενώσεων καθώς και παραμέτρους που σχετίζονται με την ποιότητα της πρόσδεσης όπως το ligand efficiency.

Στα 3D/2D διαγράμματα που ακολουθούν εμφανίζονται οι προβλεπόμενοι τρόποι πρόσδεσης των ενώσεων και οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου της BRAFV600E.

Η συνεκτίμηση των ιδιοτήτων ADME των 21 ενώσεων που προκρίθηκαν αναδεικνύει ότι τουλάχιστον έντεκα από αυτές έχουν το κατάλληλο φυσικοχημικό προφίλ και επιπλέον περιορισμένο αριθμό προβλεπόμενων μεταβολιτών.

1. ZINC95476976
2. ZINC95476921
3. ZINC95472148
4. ZINC93367503
5. ZINC63162243
6. ZINC45076315
7. ZINC93371527
8. ZINC47121954
9. ZINC40801152
10. ZINC08995604

11. ZINC40801148

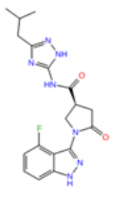
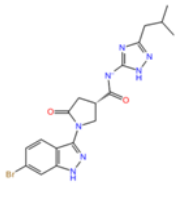
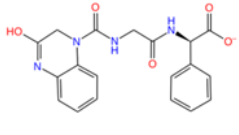
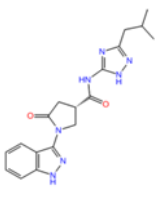
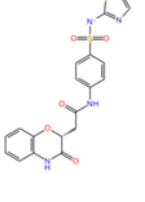
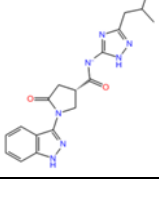
Οι ενώσεις αυτές κατά προτεραιότητα θα προμηθευτούν προκειμένου να εξετασθεί *in vitro* η ικανότητά τους να αναστείλουν εκλεκτικά την BRAF^{V600E}.

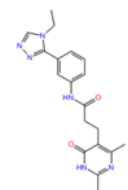
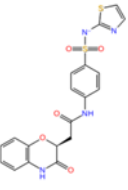
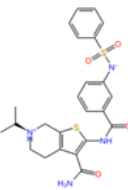
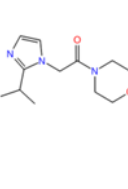
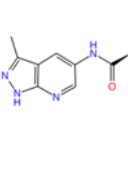
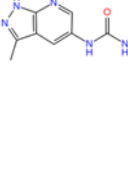
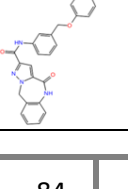
Πίνακας 7 Πρόβλεψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων (QikProp-Schrodinger v5.2)

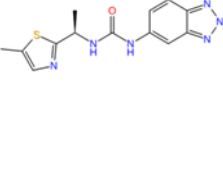
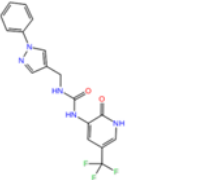
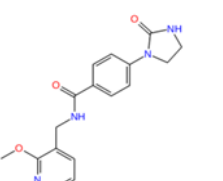
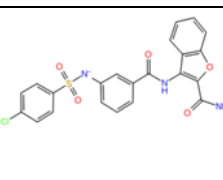
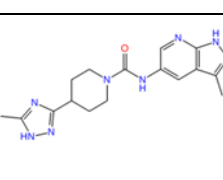
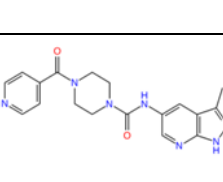
Ενώσεις	QlogP οκτανόλη/ νερό (-2.0/6.5)	QlogS Υδατο- διαλυτότητα (-6.5/0.5)	QlogK hsa Πρόσδεση στην αλβουμίνη του ορού (-1.5/1.5)	QlogBB Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού (-3.0/1.2)	Πρωτογενείς μεταβολίτες (1/8)
plx7904	4.70	-7.68	0.91	-2.00	3.00
dabrafenib	3.86	-6.79	0.50	-1.36	3.00
ZINC9547976	2.09	-5.07	0.07	-1.70	3.00
ZINC95476921	2.46	-5.50	0.16	-1.68	3.00
ZINC08995604	2.25	-3.69	-0.68	-2.09	5.00
ZINC95472148	1.81	-4.66	0.01	-1.70	3.00
ZINC40801152	1.33	-4.66	-0.49	-1.98	4.00
ZINC95472148	1.91	-4.93	0.04	-1.80	3.00
ZINC76252909	2.36	-5.39	0.13	-1.80	5.00
ZINC40801148	1.16	-4.09	-0.50	-1.87	4.00
ZINC20570355	2.16	-4.67	0.15	-1.80	6.00
ZINC19762125	1.81	-4.43	-0.29	-1.22	5.00
ZINC90406766	1.99	-4.42	-0.15	-1.36	6.00
ZINC93367503	2.18	-4.61	-0.02	-1.74	2.00
ZINC77969072	4.12	-6.29	0.57	-1.23	5.00
ZINC95434481	1.00	-3.58	-0.43	-1.34	3.00
ZINC63162243	3.01	-5.77	0.16	-1.13	2.00
ZINC45076315	2.87	-4.68	0.22	-0.95	3.00
ZINC20570836	2.42	-5.33	0.02	-2.01	3.00
ZINC93367217	1.29	-4.64	-0.09	-1.52	4.00
ZINC93371527	1.17	-4.18	-0.26	-1.94	4.00
ZINC47121954	1.94	-4.52	-0.04	-1.40	2.00
ZINC09378636	1.50	-3.56	-0.53	-1.84	3.00

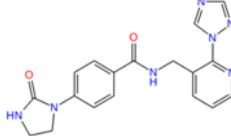
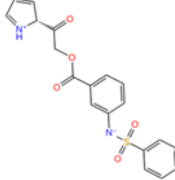
Ενώσεις	Δράση στο ΚΝΣ (--/++)	Παραβιάσεις κανόνα Lpinski	Παρεμπόδιση του Καναλιού HERG K+: log IC50 (ανησυχητικό <-5)	Διαπερατότητα CaCo-2 κυττάρων (nm/sec)(<25 μικρή, >500 μεγάλη)	Διαπερατότητα MDCK κυττάρων (nm/sec)(<25 μικρή, >500 μεγάλη)	% Απορρόφηση από γαστρεντερικό σύστημα σε λήψη από το στόμα (+20%)(<25% μικρή)
plx7904	--	1.00	-6.45	121.00	115M	79.00
dabrafenib	--	1.00	-6.54	236.00	358M	79.00
ZINC9547976	--	0.00	-5.54	123.00	69M	77.00
ZINC95476921	--	0.00	-5.60	112.00	123M	78.00
ZINC08995604	--	0.00	0.32	1.00	1.00	45.00
ZINC95472148	--	0.00	-5.33	116.00	48.00	74.00
ZINC40801152	--	0.00	-7.17	106.00	86M	71.00
ZINC95472148	--	0.00	-5.61	115.00	47.00	75.00
ZINC76252909	--	0.00	-5.92	158.00	67.00	80.00
ZINC40801148	--	0.00	-6.72	107.00	68M	70.00
ZINC20570355	--	0.00	-7.28	20.00	12M	63.00
ZINC19762125	--	0.00	-4.58	270.00	169.00	81.00
ZINC90406766	--	0.00	-4.70	192.00	135.00	80.00
ZINC93367503	--	0.00	-4.89	108.00	70.00	76.00
ZINC77969072	--	0.00	-7.45	485.00	226.00	100.00
ZINC95434481	--	0.00	-4.05	136.00	131.00	71.00
ZINC63162243	--	0.00	-5.06	182.00	484.00	85.00
ZINC45076315	-	0.00	-5.75	642.00	306.00	94.00
ZINC20570836	--	0.00	-6.84	70.00	71M	74.00
ZINC93367217	--	0.00	-3.77	93.00	57.00	70.00
ZINC93371527	--	0.00	-4.85	41.00	35.00	63.00
ZINC47121954	--	0.00	-6.00	200.00	87.00	79.00
ZINC09378636	--	0.00	-6.75	157.00	67.00	75.00

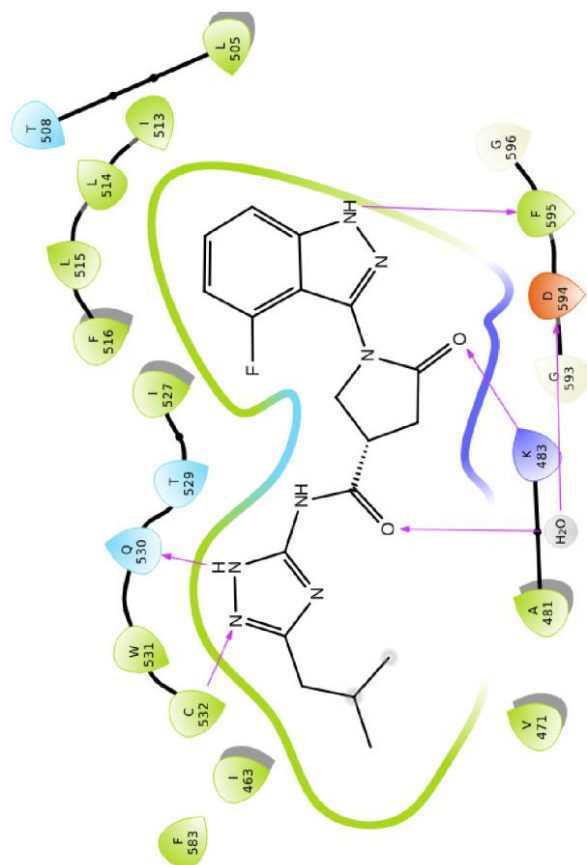
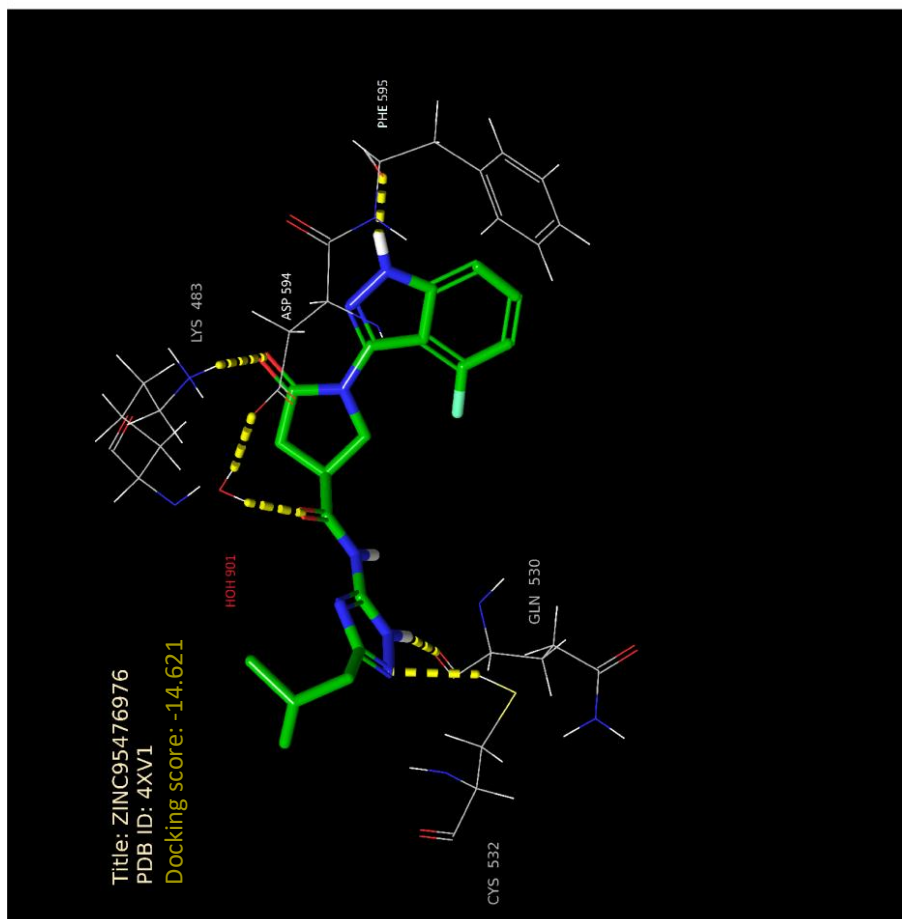
Πίνακας 8 Ενώσεις που προκρίθηκαν από το πρωτόκολο Εικονικής Σάρωσης

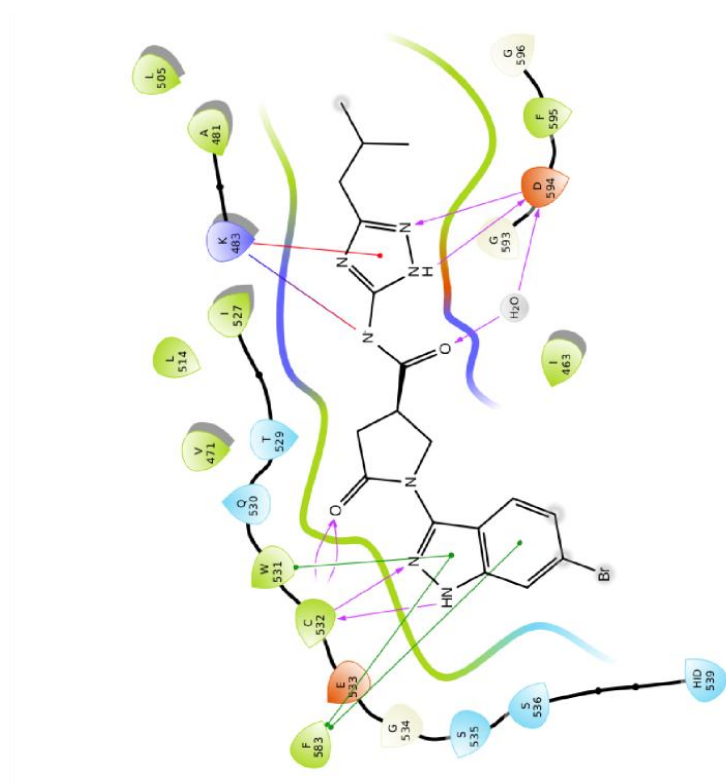
Structure	IUPAC name	Name	docking sc.	glide lig. eff.	glide gscore	glide emodel
	<u>(3S)-1-(4-fluoro-1H-indazol-3-yl)-N-(3-isobutyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5-oxo-pyrrolidine-3-carboxami</u>	ZINC9547 6976	-14.62	-0.52	-14.62	-123.23
	<u>(3S)-1-(6-bromo-1H-indazol-3-yl)-N-(3-isobutyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5-oxo-pyrrolidine-3-carboxamid</u>	ZINC9547 6921	-13.68	-0.49	-13.68	-133.27
	<u>2-[2-[(3-hydroxy-2H-quinoxalin-1-yl)carbonylamin o]acetyl]amino-2-phenyl-acetic</u>	ZINC0899 5604	-14.63	-0.52	-14.63	-141.23
	<u>(3S)-1-(1H-indazol-3-yl)-N-(3-isobutyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5-oxo-pyrrolidine-3-carboxamide</u>	ZINC9547 2148	-14.07	-0.52	-14.07	-115.60
	<u>2-[(2R)-3-oxo-4H-1,4-benzoxazin-2-yl]-N-[4-(thiazol-2-yl)sulfamoyl]phe nyl]acetamide</u>	ZINC4080 1152	-13.21	-0.44	-13.21	-149.38
	<u>(3S)-1-(1H-indazol-3-yl)-N-(3-isobutyl-1H-1,2,4-triazol-5-yl)-5-oxo-pyrrolidine-3-carboxamide</u>	ZINC9547 2148	-13.10	-0.48	-13.10	-124.46
	<u>3-(2,4-dimethyl-</u>	ZINC7625	-11.27	-0.42	-11.27	-89.73

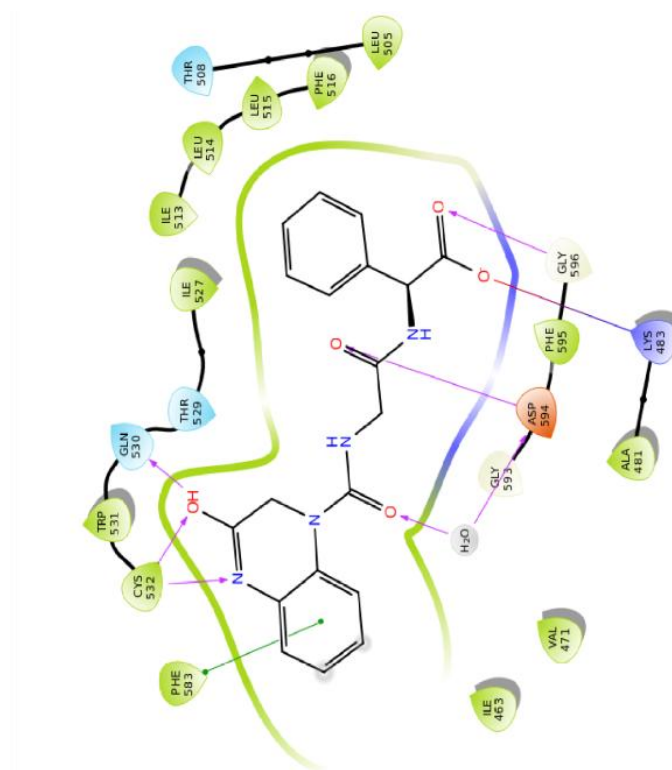
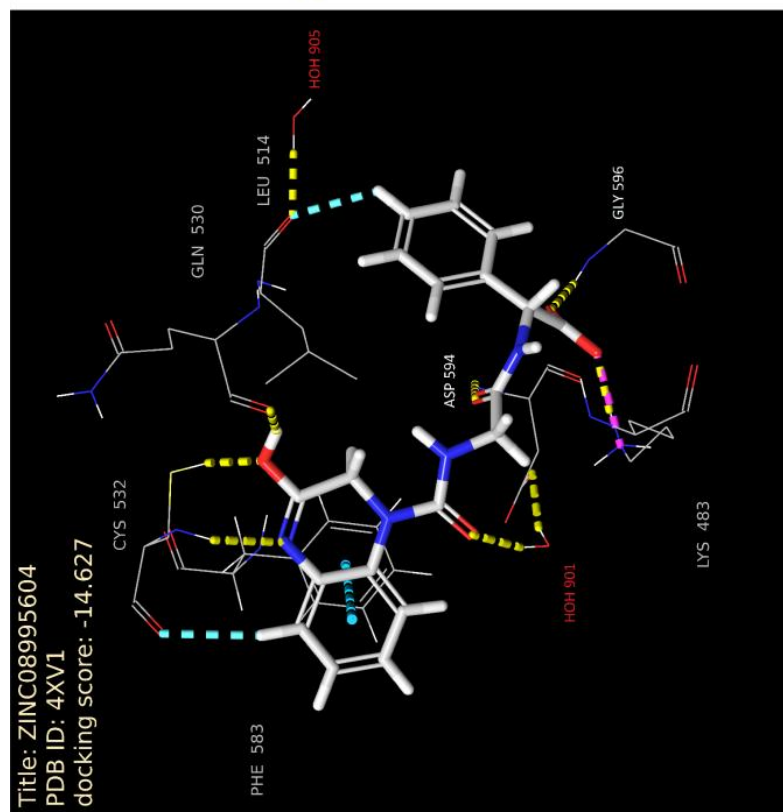
	<u>6-oxo-1H-pyrimidin-5-yl)-N-[3-(4-ethyl-1,2,4-triazol-3-yl)phenyl]propamide</u>	2909				
	<u>2-[(2S)-3-oxo-4H-1,4-benzoxazin-2-yl]-N-[4-(thiazol-2-yl)sulfamoyl]phenylacetamide</u>	ZINC40801148	-12.80	-0.43	-12.79	-122.52
	<u>2-[[3-(benzenesulfonamido)benzoyl]amino]-6-isopropyl-5,7-dihydro-4H-thieno[5,4-c]pyridine-3-carboxamide</u>	ZINC20570355	-11.24	-0.33	-11.24	-115.22
	<u>2-{4-[2-(2-isopropyl-imidazol-1-yl)-acetyl]-morpholin-2-yl}-quinoline-4-carboxylic acid amide</u>	ZINC19762125	-13.05	-0.43	-13.05	-113.36
	<u>(3S)-N-(3-methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)-5-oxo-1-[(1S)-1-phenylethyl]pyrrolidine-3-carboxamide</u>	ZINC90406766	-13.33	-0.49	-13.33	-114.14
	<u>1-[3-(benzimidazol-1-yl)propyl]-3-(3-methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)urea</u>	ZINC93367503	-14.19	-0.55	-14.19	-120.16
	<u>4-oxo-N-[3-(phenoxy)methyl]phenyl]-5,10-dihydropyrazol</u>	ZINC77969072	-12.95	-0.40	-12.95	-119.27

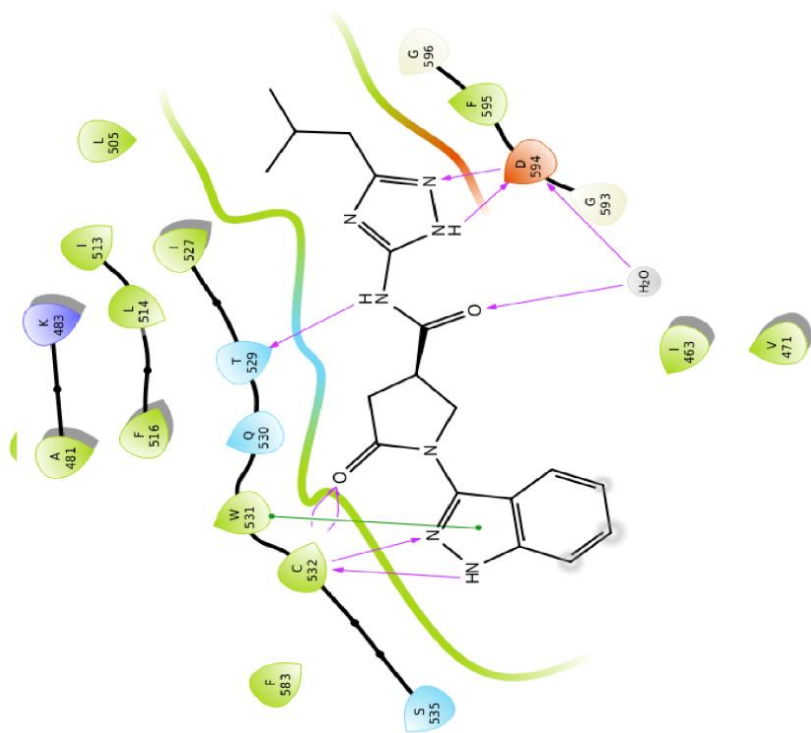
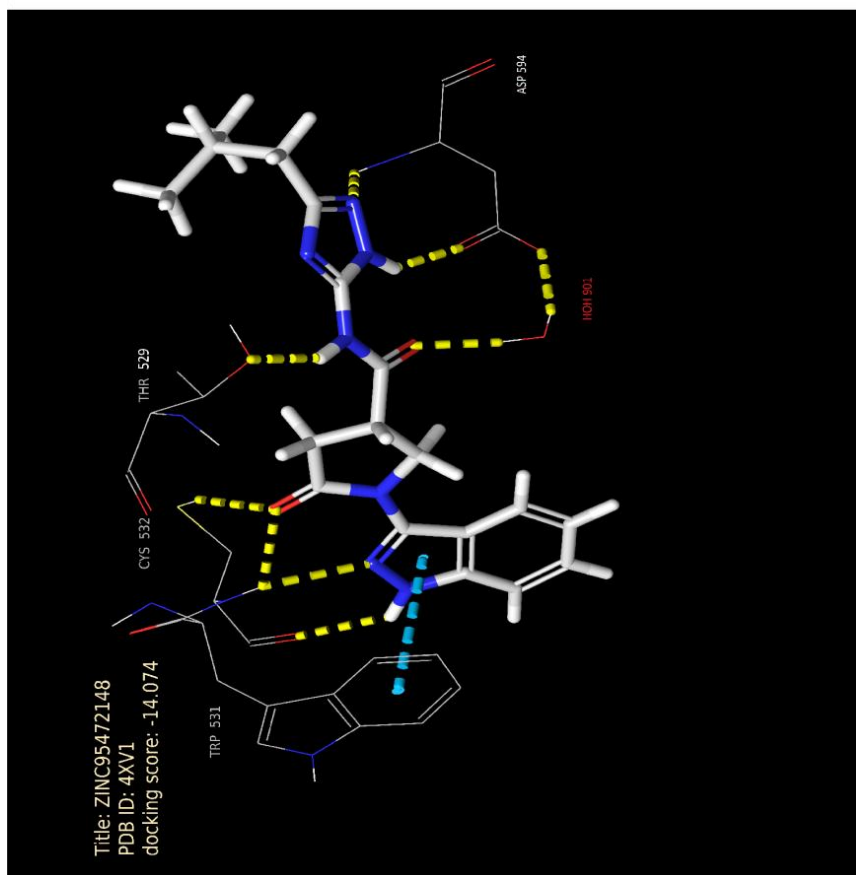
	<u>o[5,1-c][1,4]benzodiazepine-2-carboxamide</u>					
	<u>1-((1H-benzotriazol-5-yl)-3-(((1R)-1-(5-methylthiazol-2-yl)ethyl)urea</u>	ZINC9543 4481	-12.50	-0.60	-12.50	-95.34
	<u>1-((2-oxo-5-(trifluoromethyl)-1H-pyridin-3-yl)-3-(((1-phenylpyrazol-4-yl)methyl)urea</u>	ZINC6316 2243	-13.16	-0.49	-13.16	-102.75
	<u>N-((2-methoxy-3-pyridyl)methyl)-4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)benzamide</u>	ZINC4507 6315	-11.41	-0.47	-11.41	-97.28
	<u>3-((3-((4-chlorophenyl)sulfonylamino)benzoyl)amino)benzofuran-2-carboxamide</u>	ZINC2057 0836	-11.51	-0.36	-11.51	-118.08
	<u>N-((3-methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)-4-(5-methyl-1H-1,2,4-triazol-3-yl)piperidine-1-carboxamide</u>	ZINC9336 7217	-11.88	-0.48	-11.88	-96.24
	<u>N-((3-methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)-4-(pyridine-4-carbonyl)piperazine-1-carboxamide</u>	ZINC9337 1527	-13.27	-0.49	-13.27	-118.05

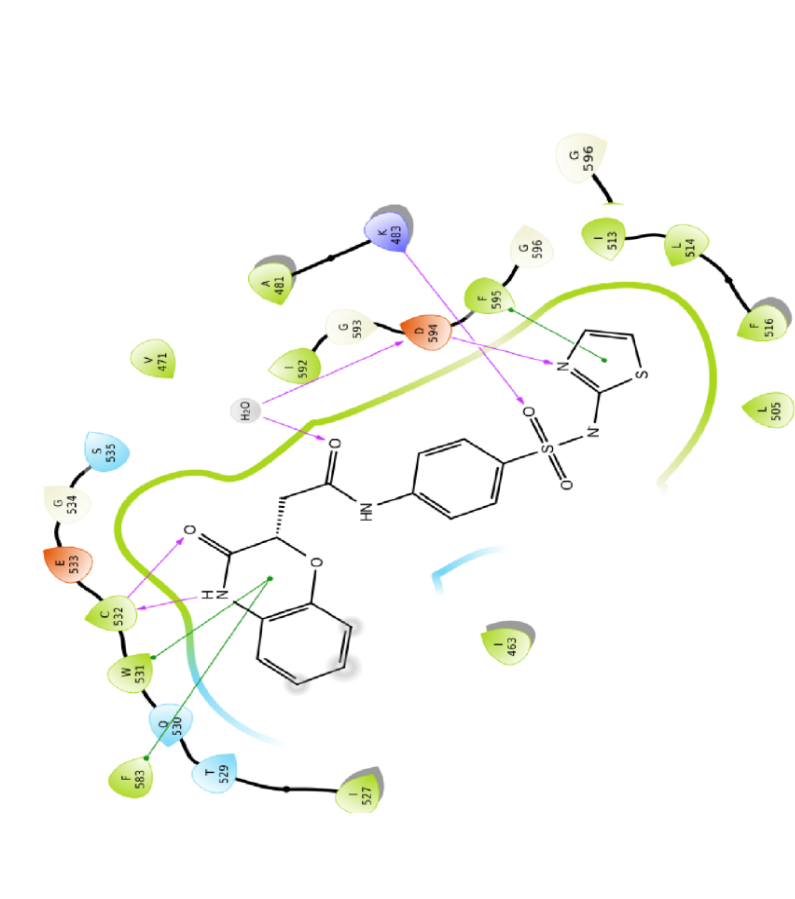
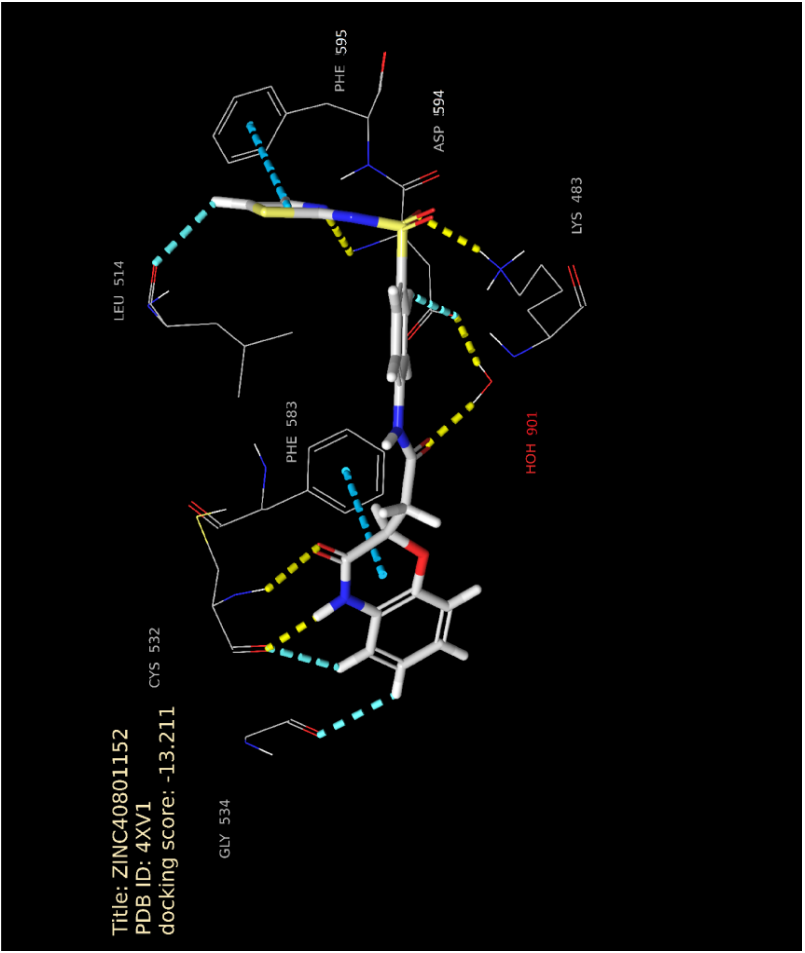
	4-(2-oxoimidazolidin-1-yl)-N-[[2-(1,2,4-triazol-1-yl)-3-pyridyl]methyl]benzamide	ZINC4712 1954	-13.33	-0.49	-13.33	-117.42
	[2-oxo-2-(1H-pyrrol-2-yl)ethyl]	ZINC0937 8636	-10.97	-0.41	-10.97	-112.66

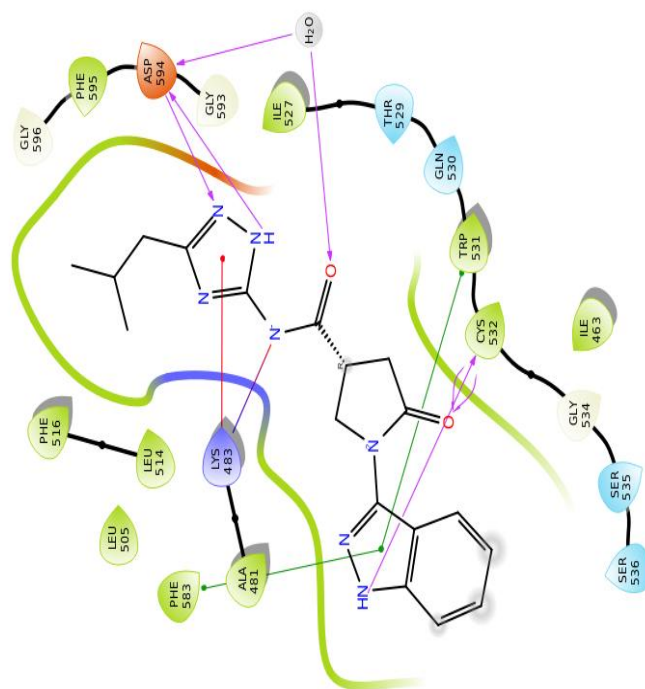
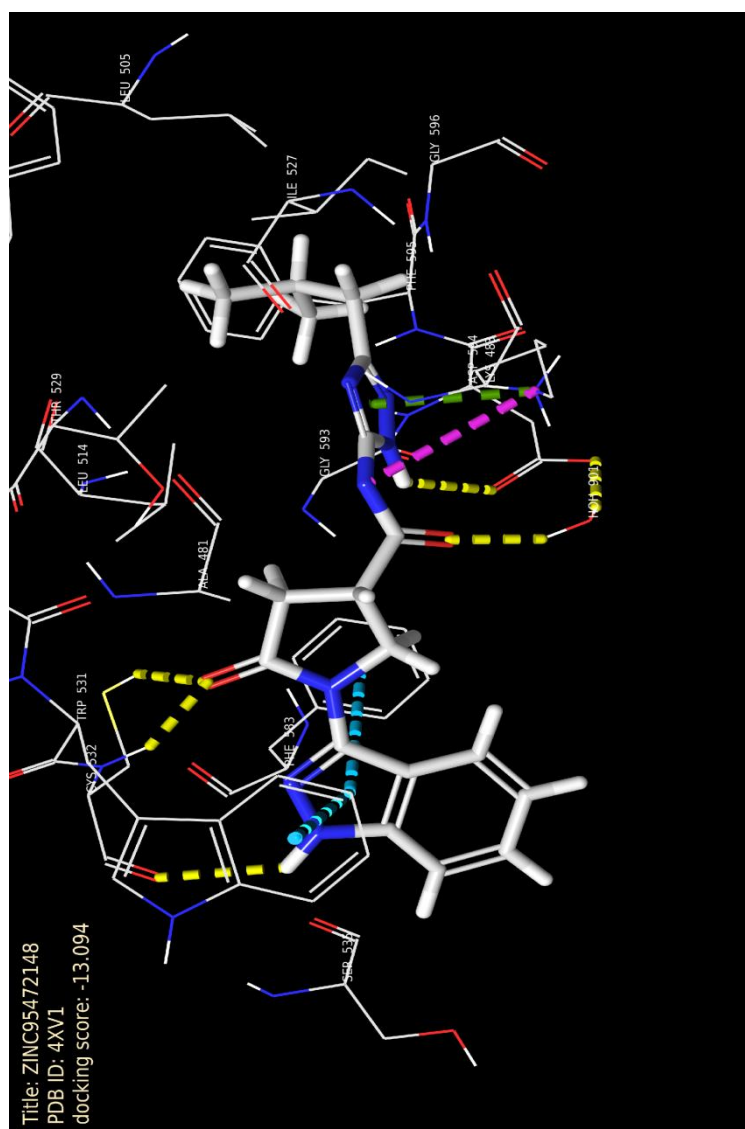


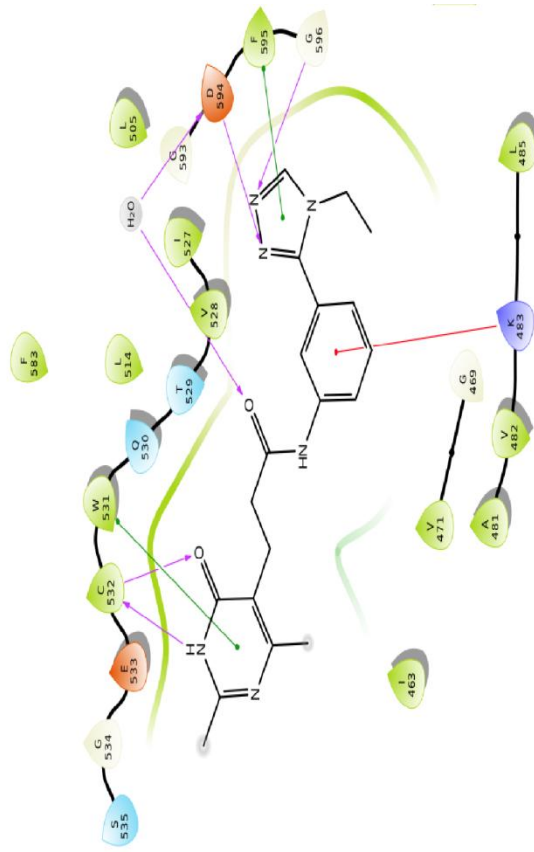
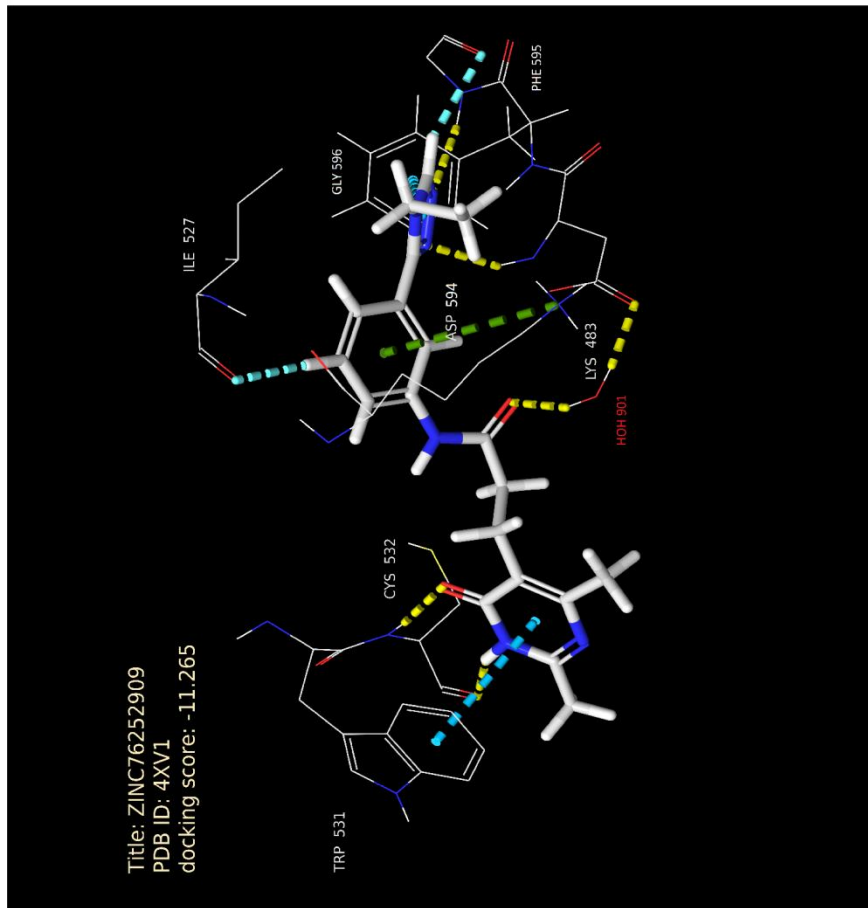


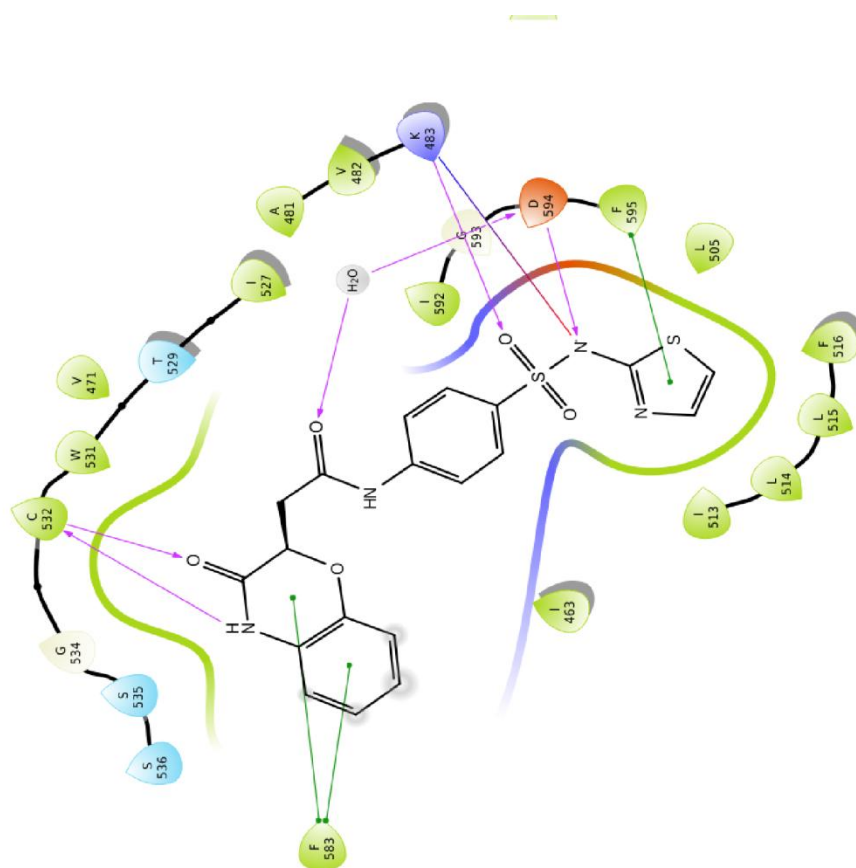
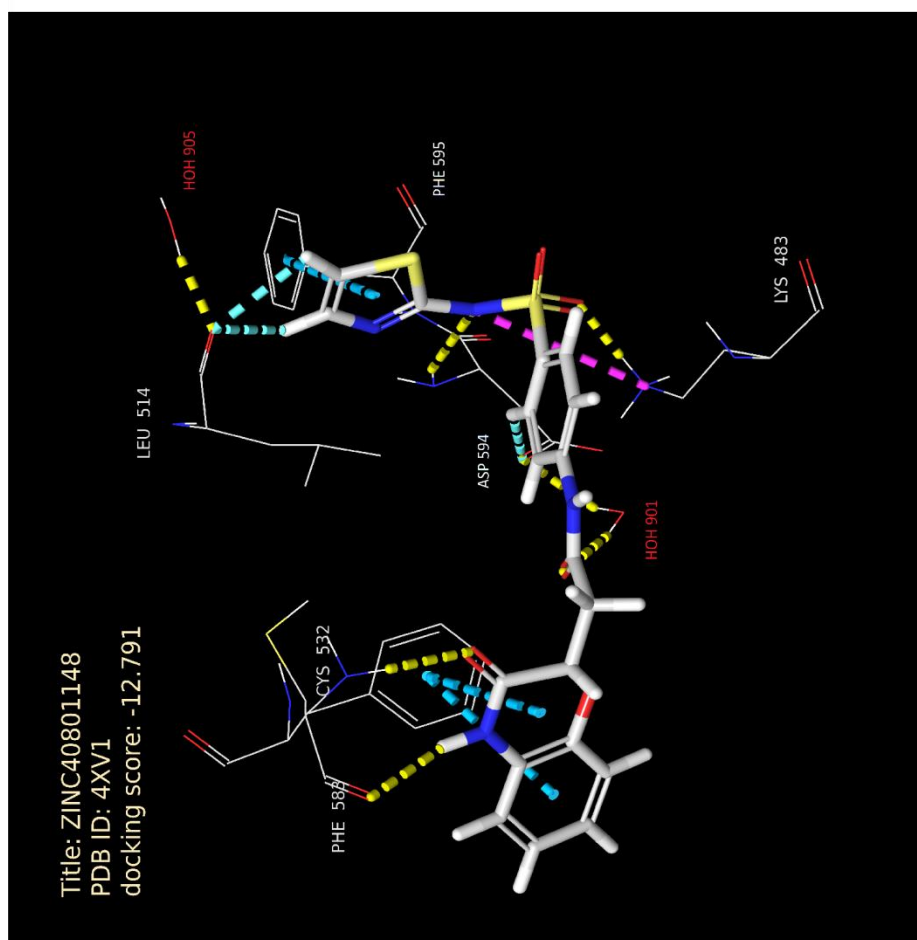


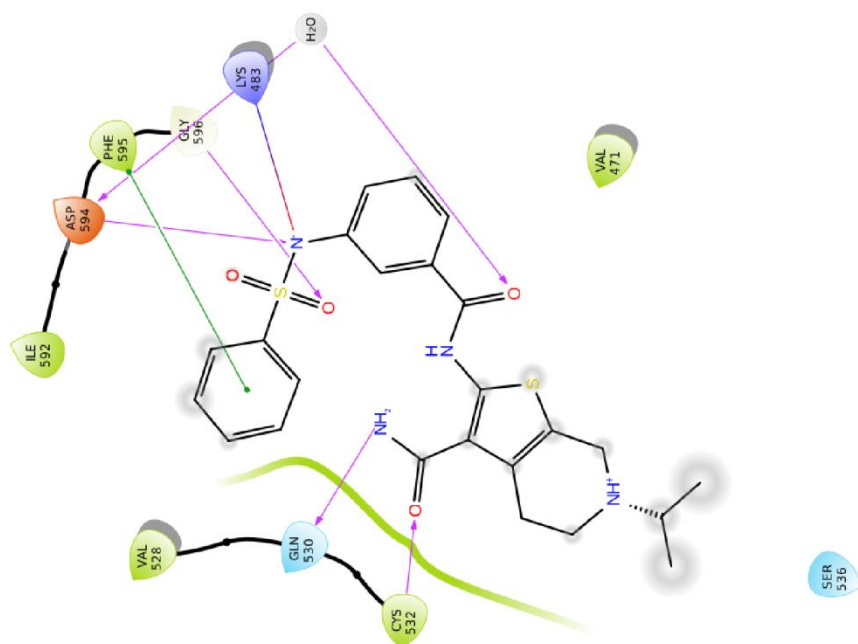
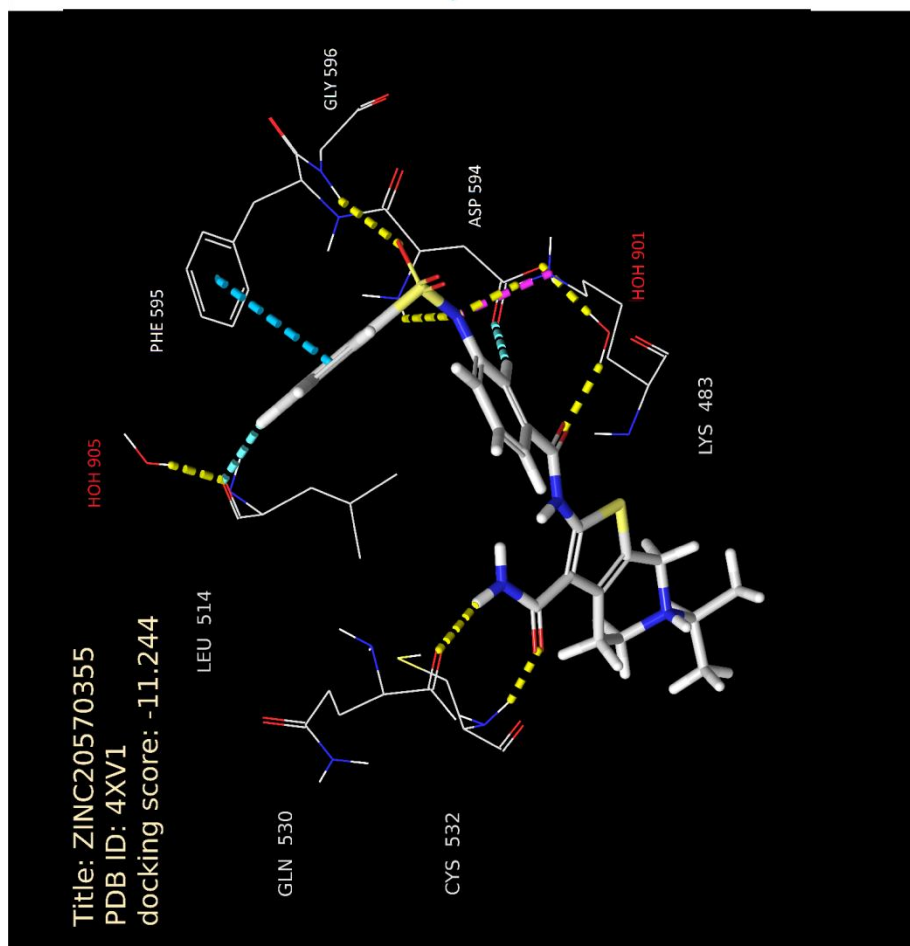


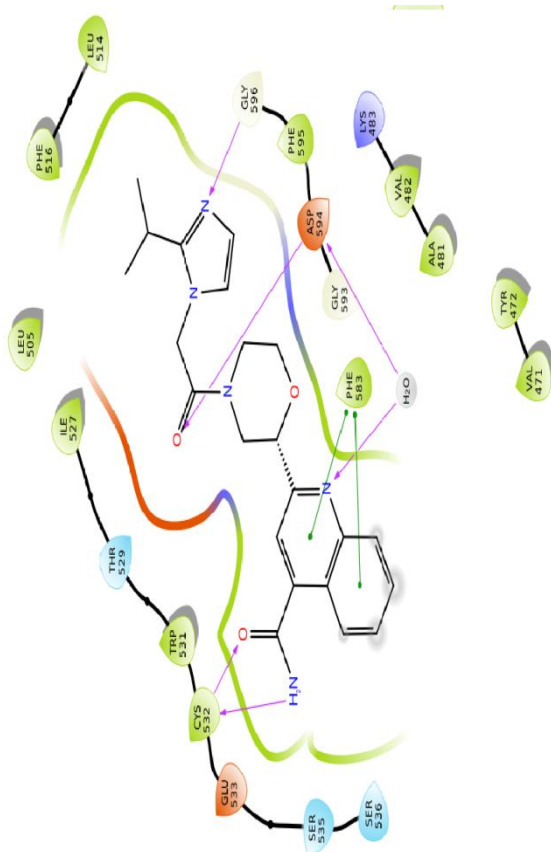
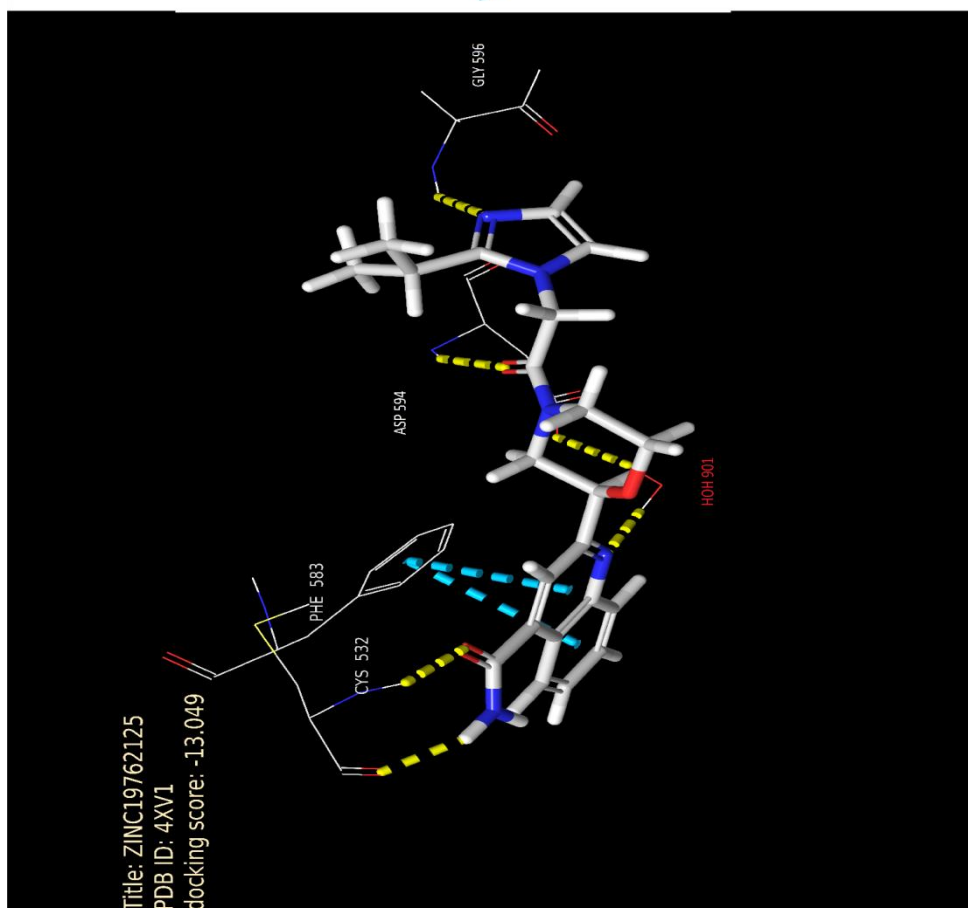


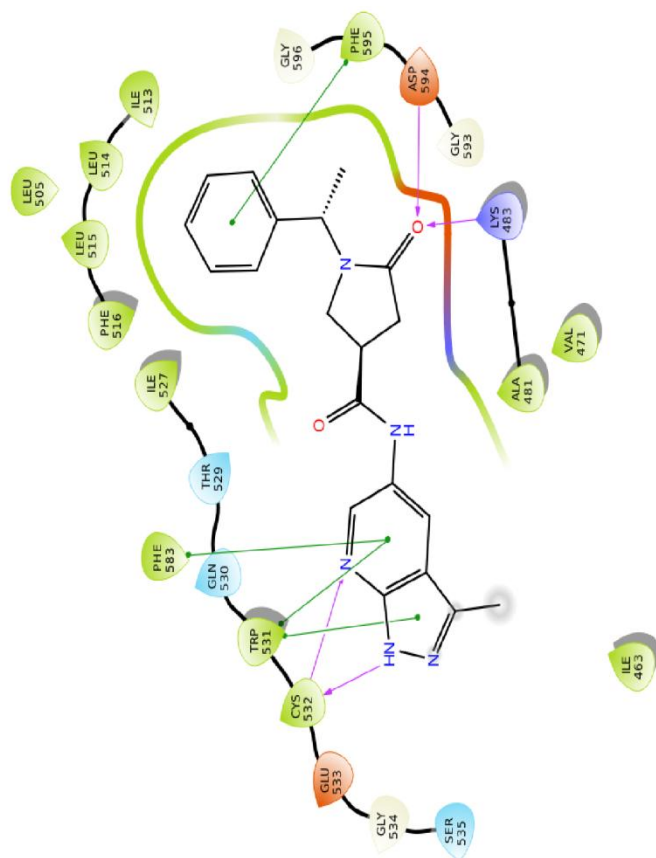
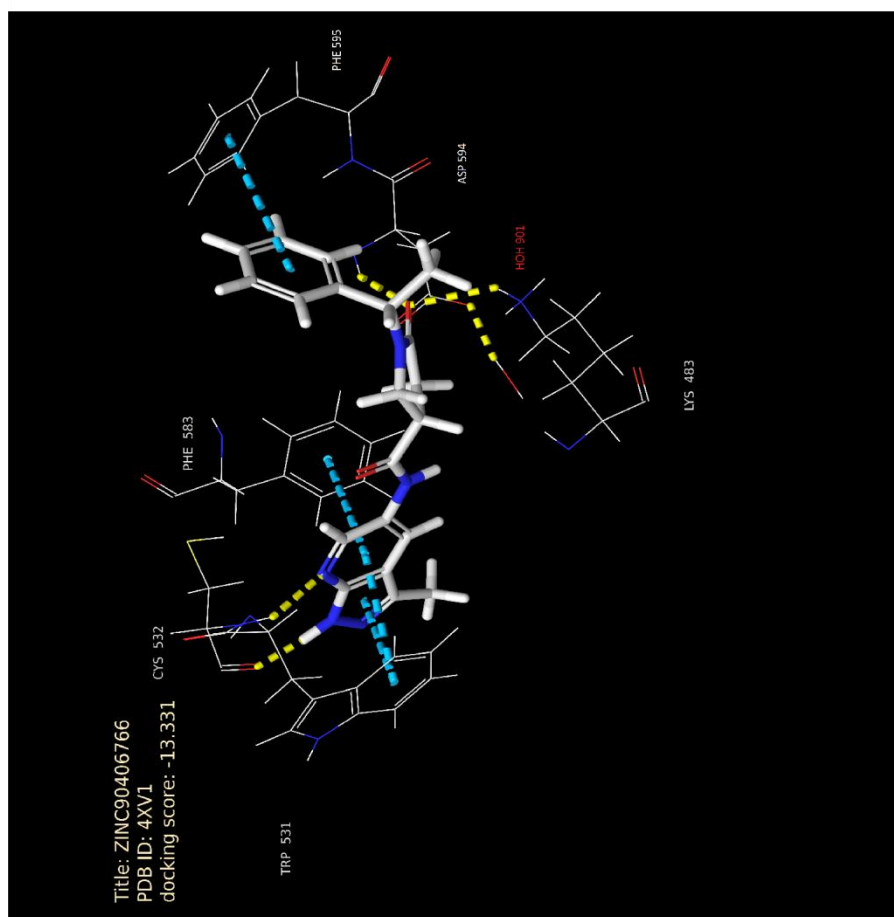


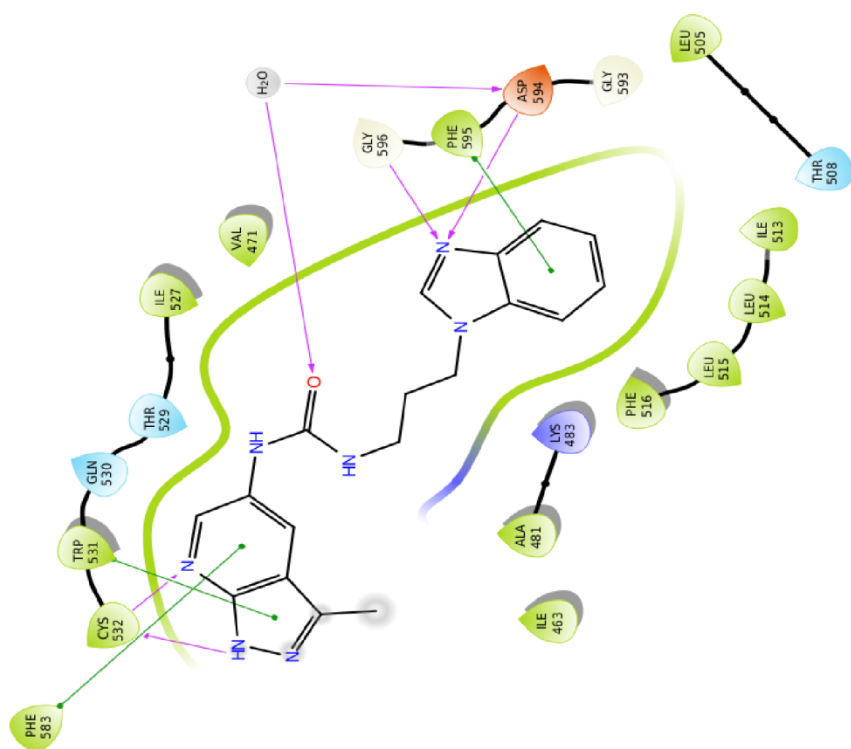
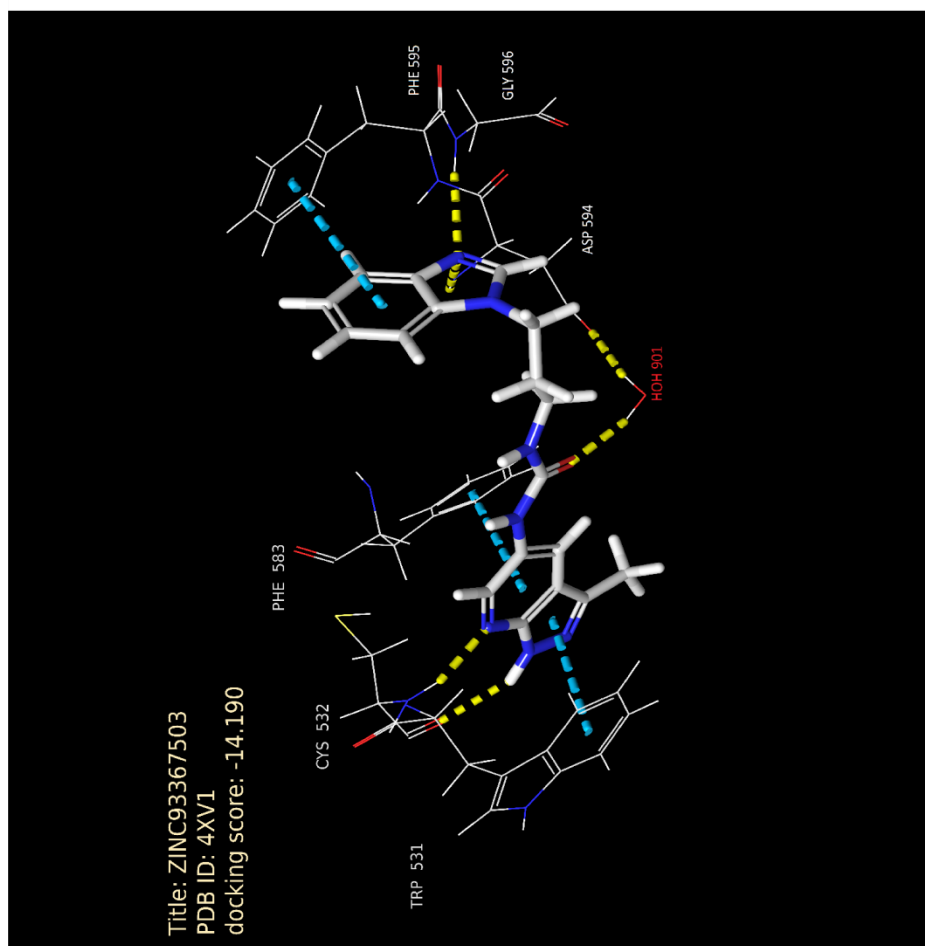


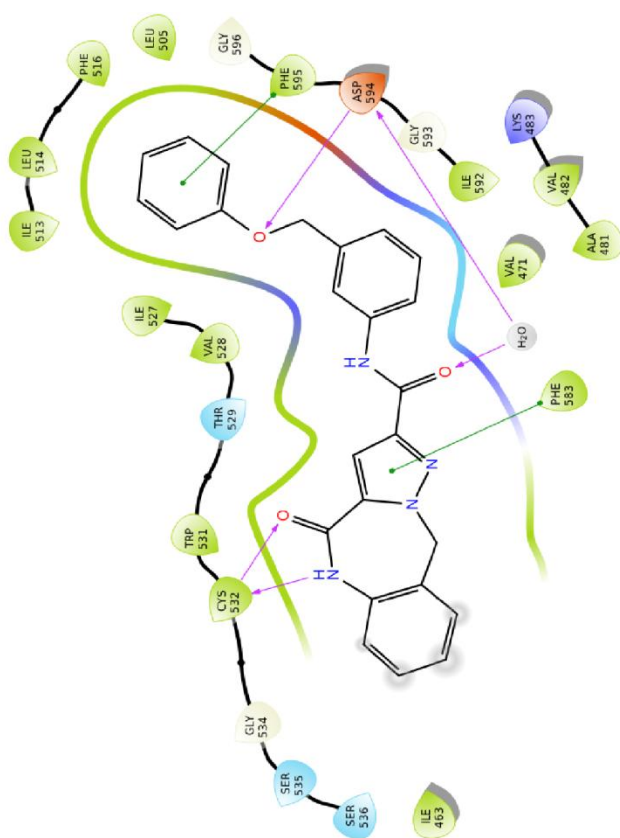
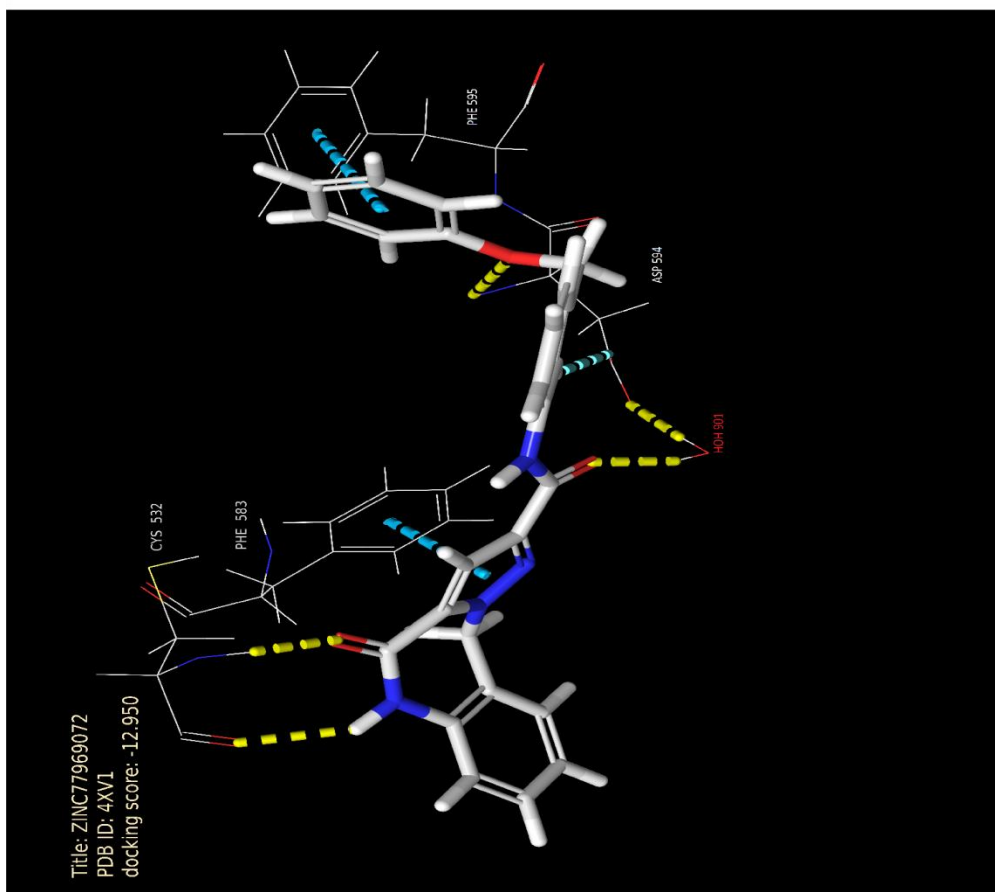


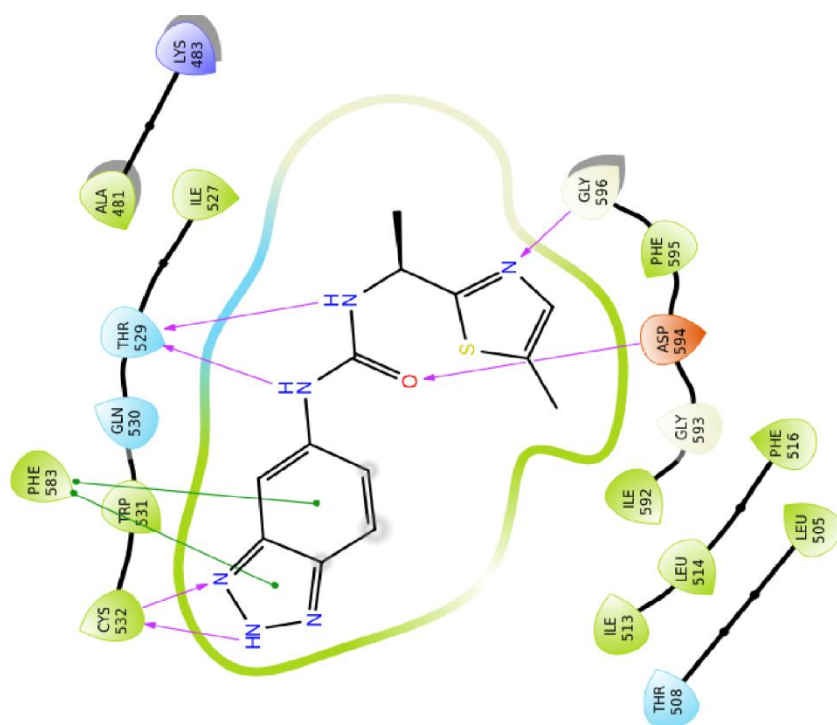
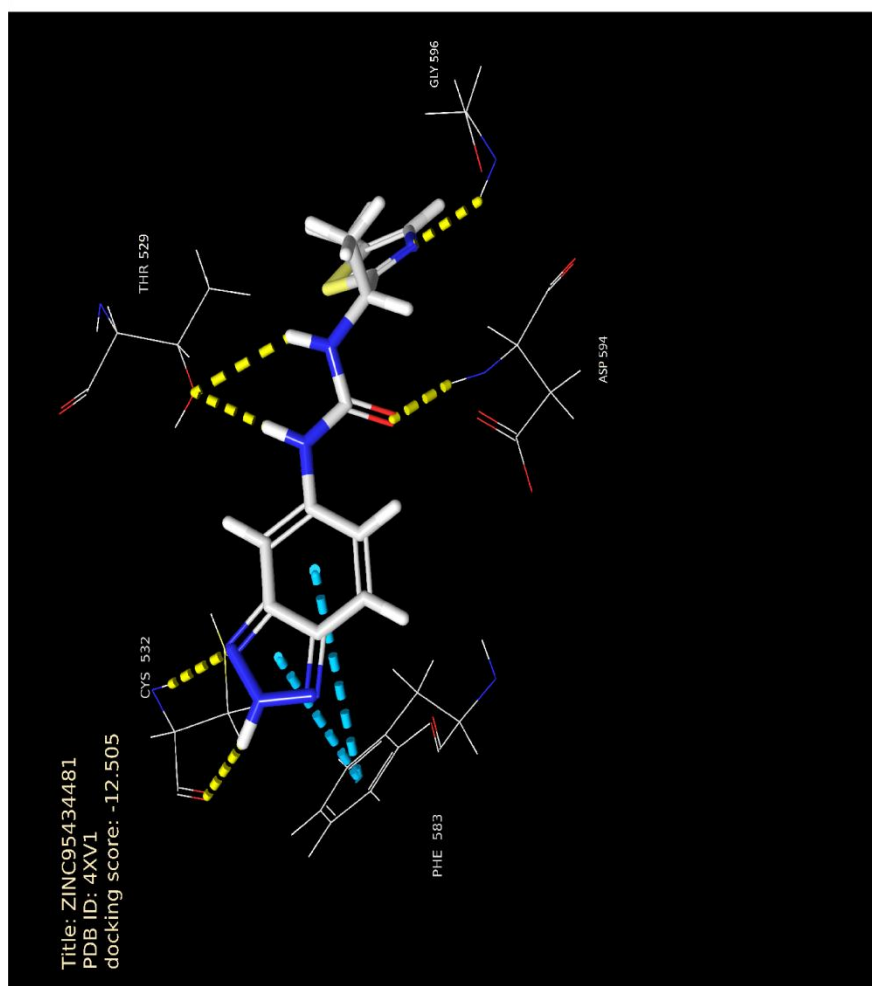


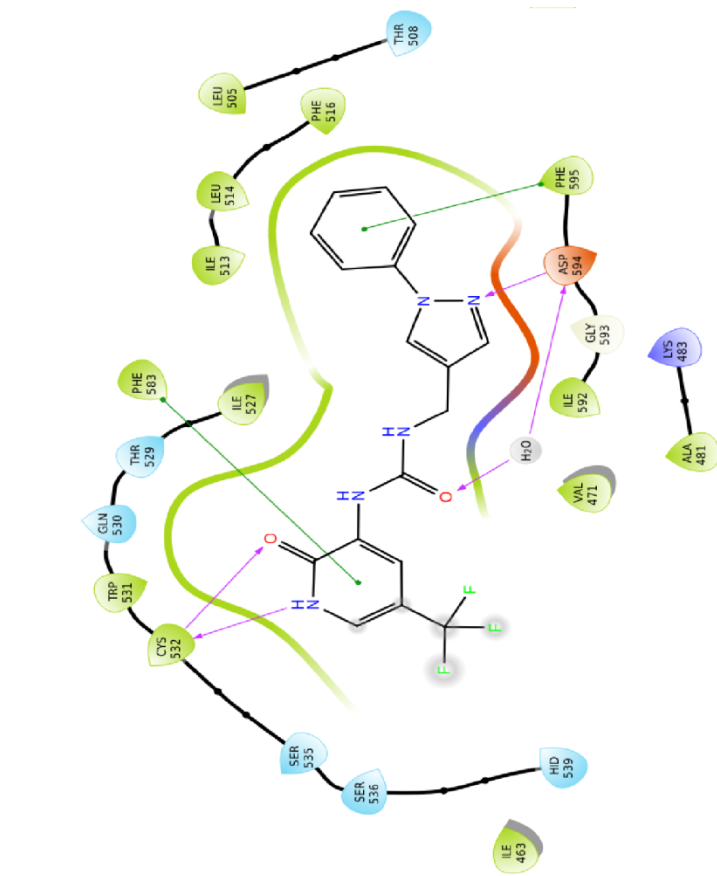
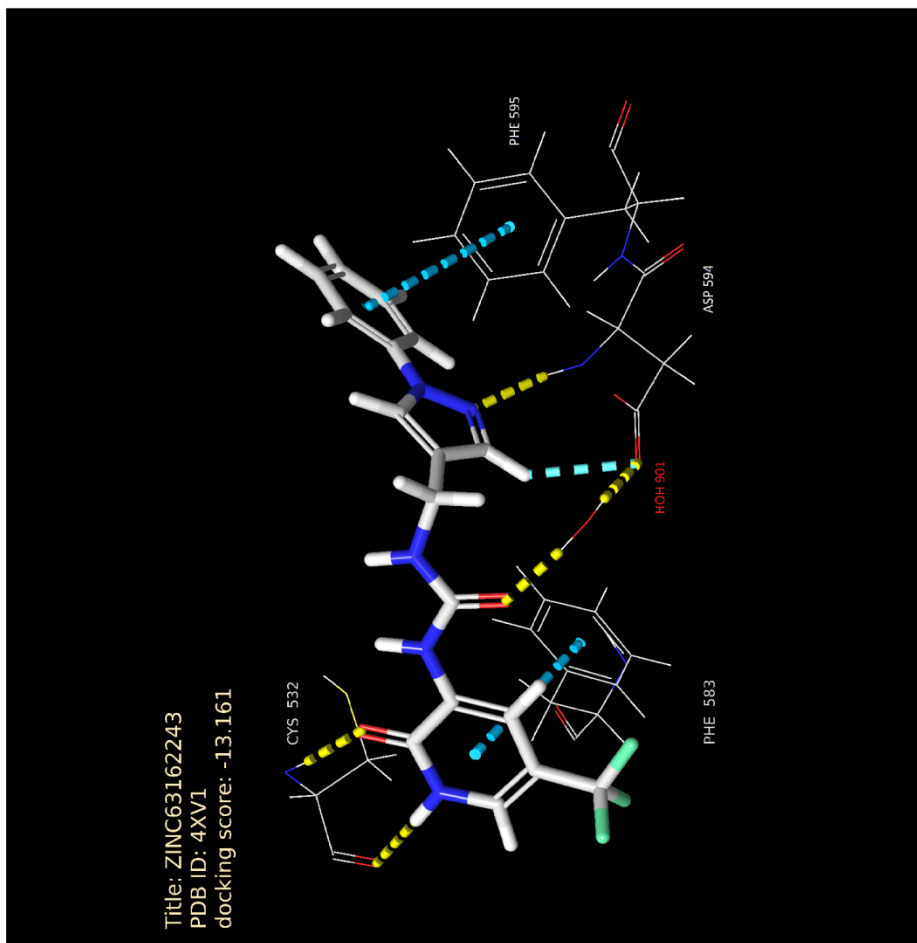


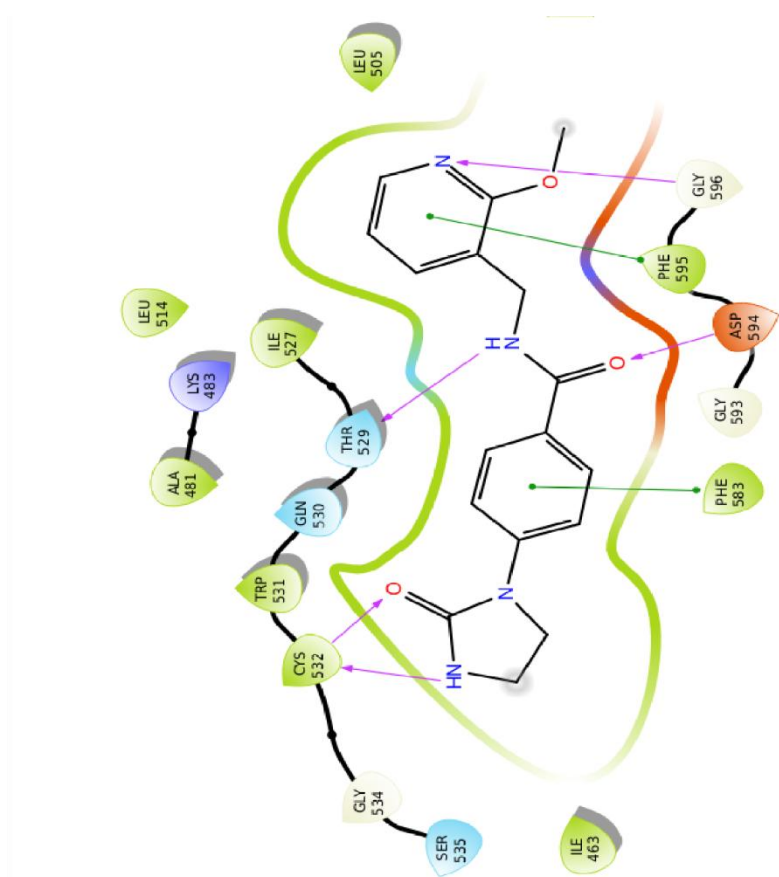
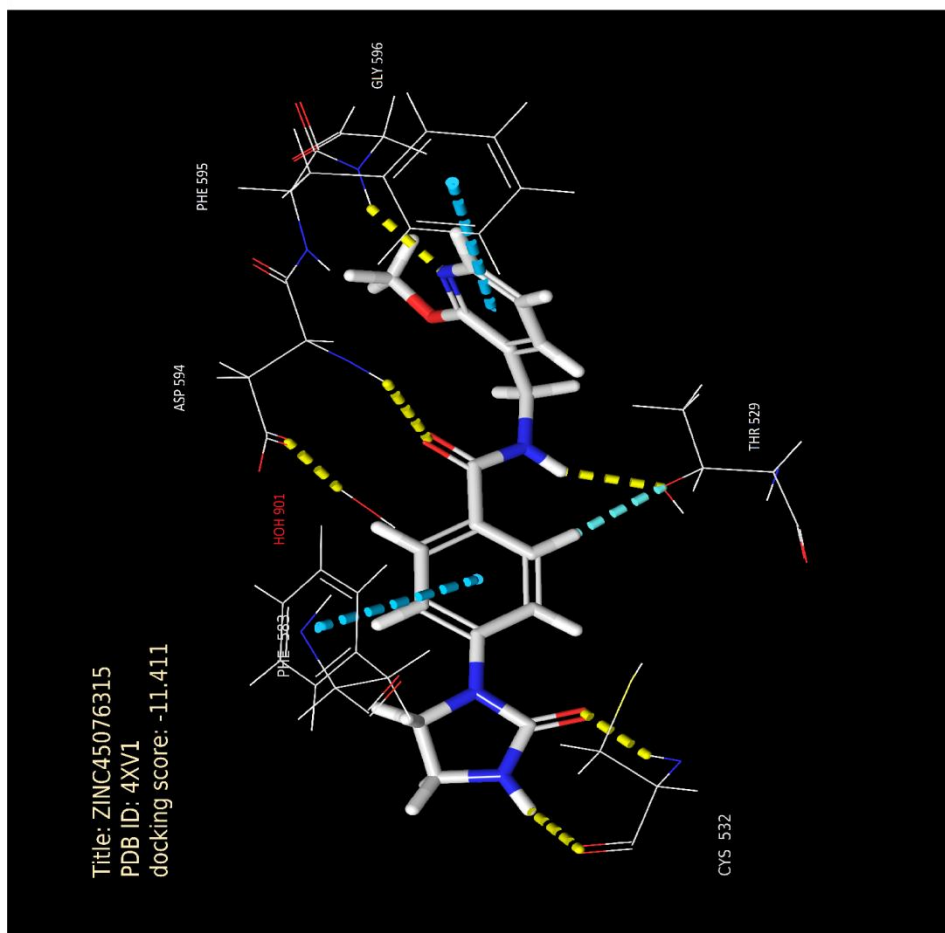


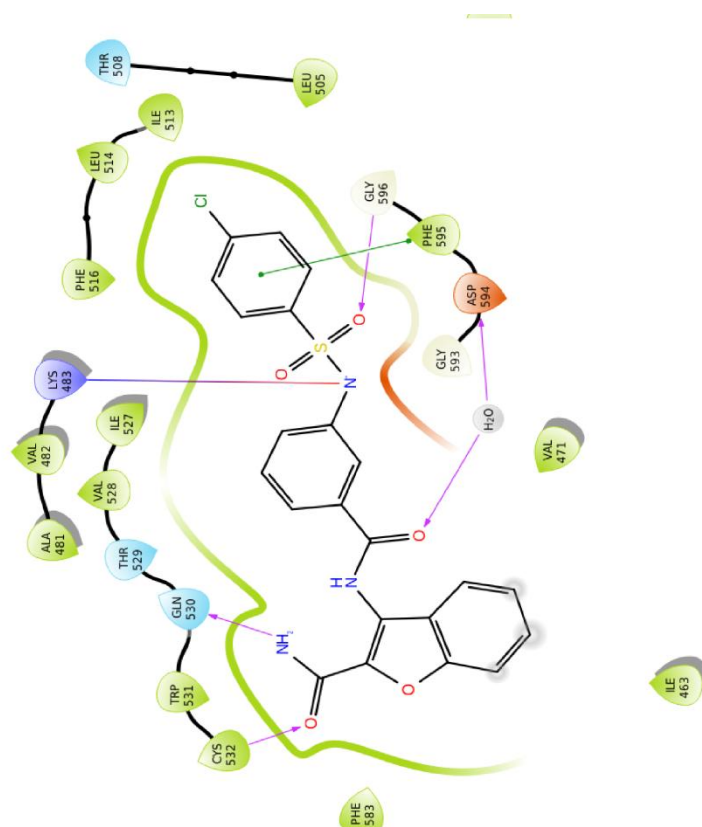
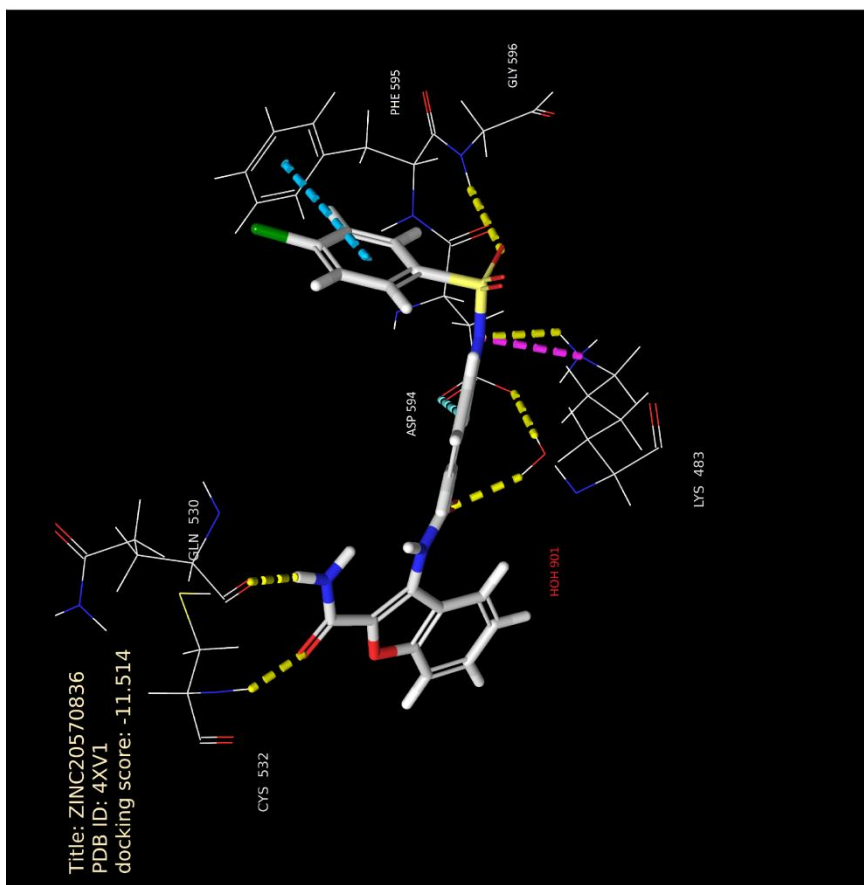


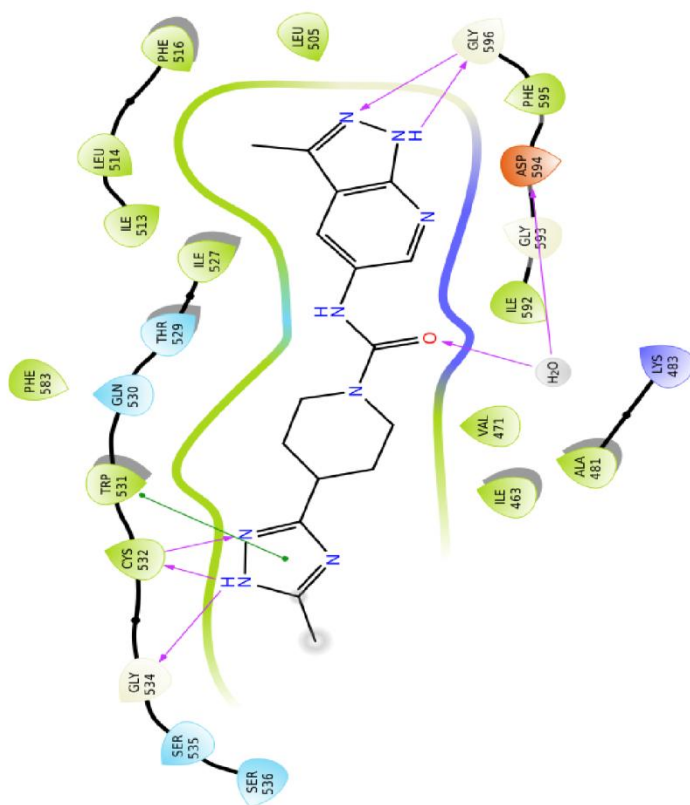
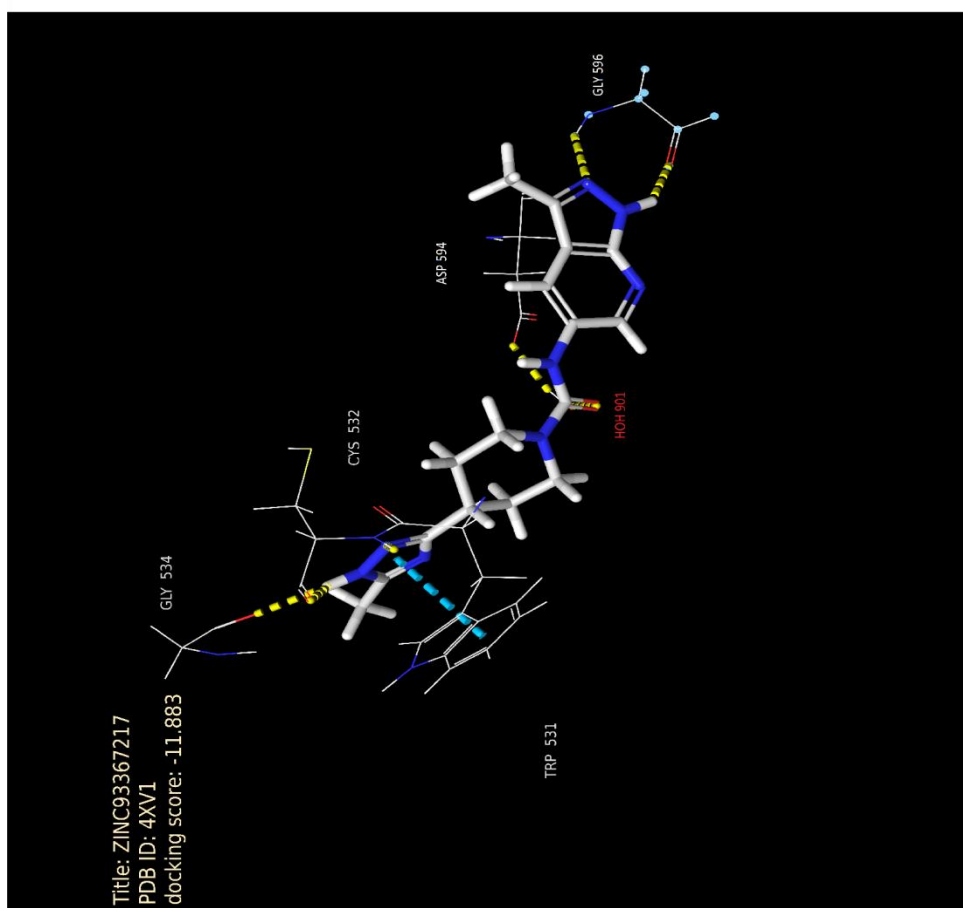


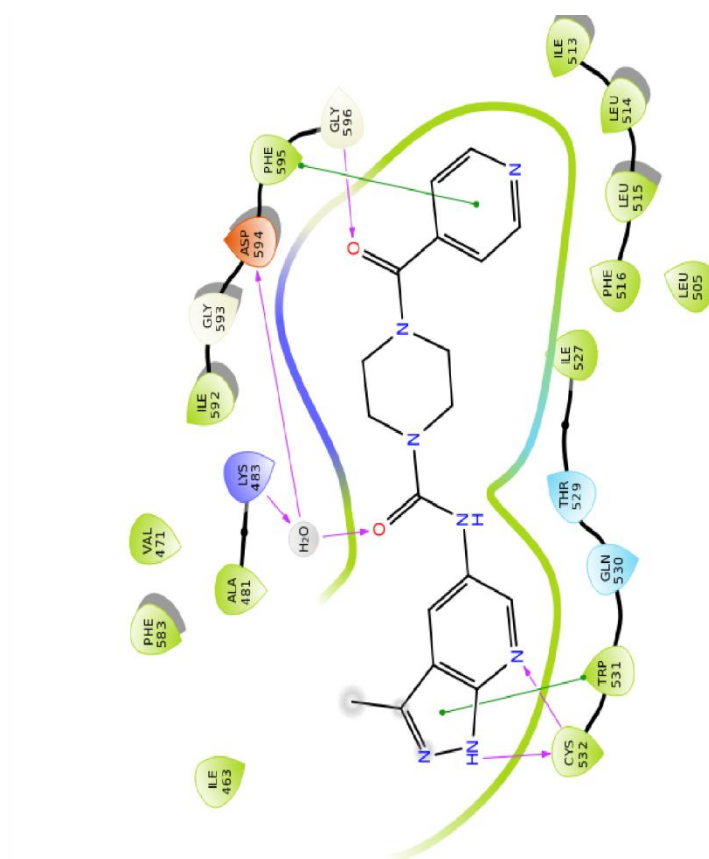
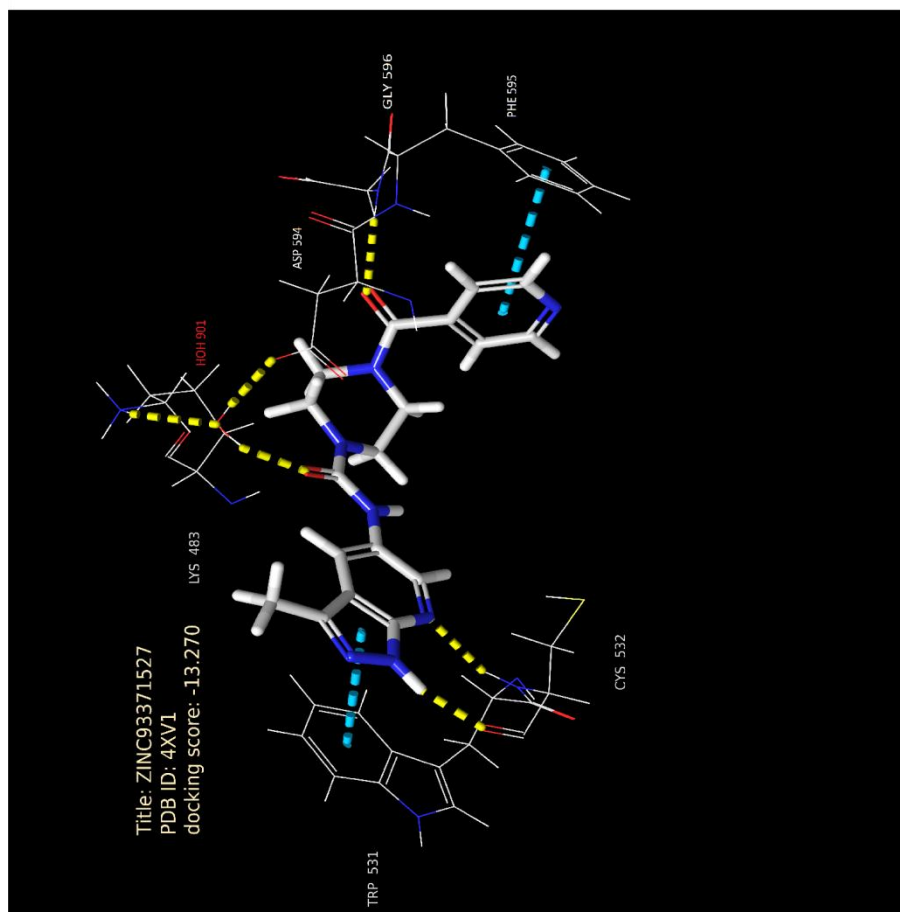


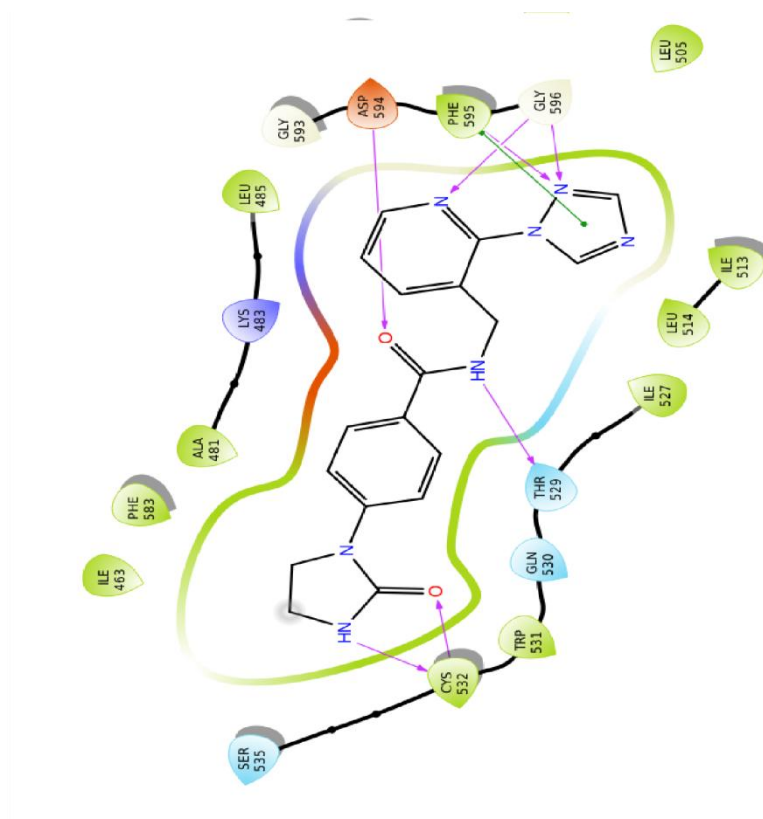
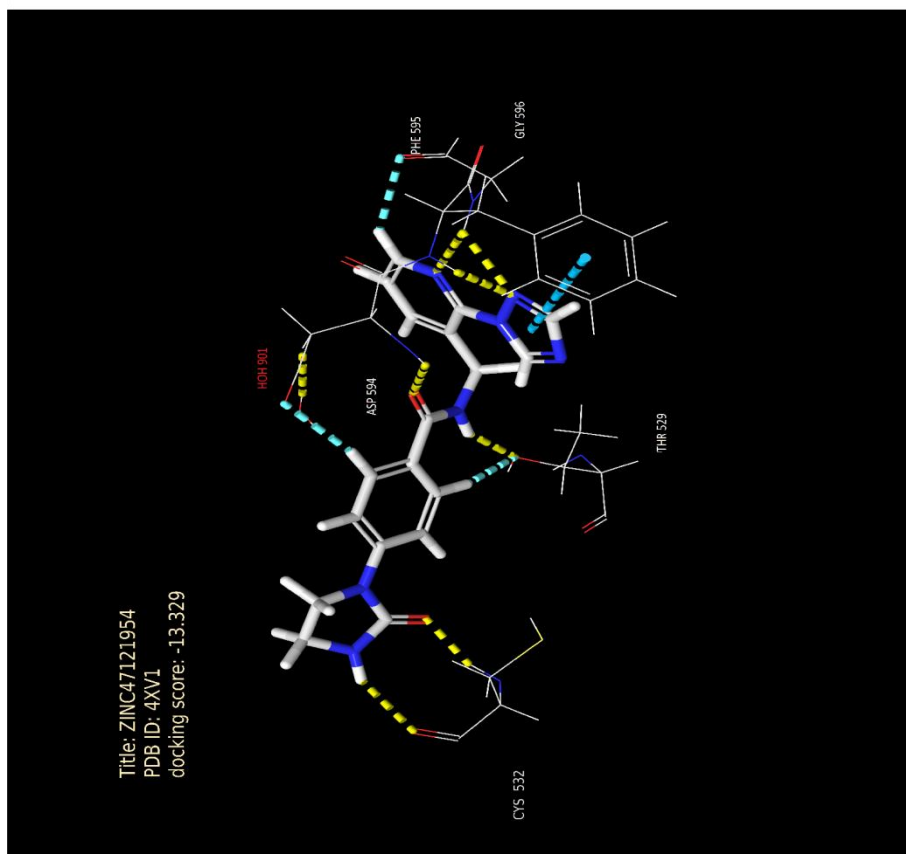


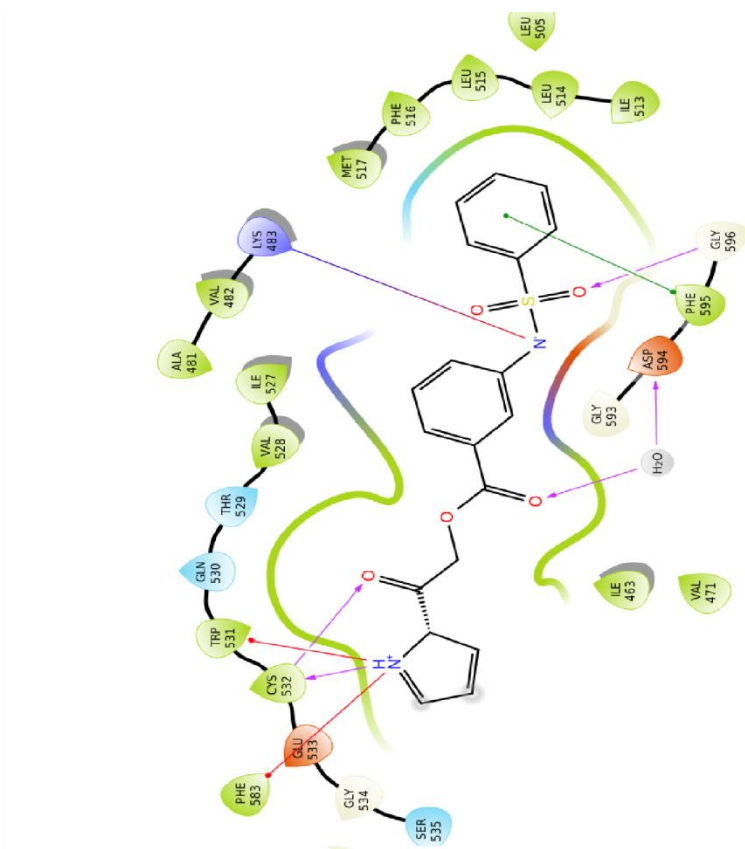
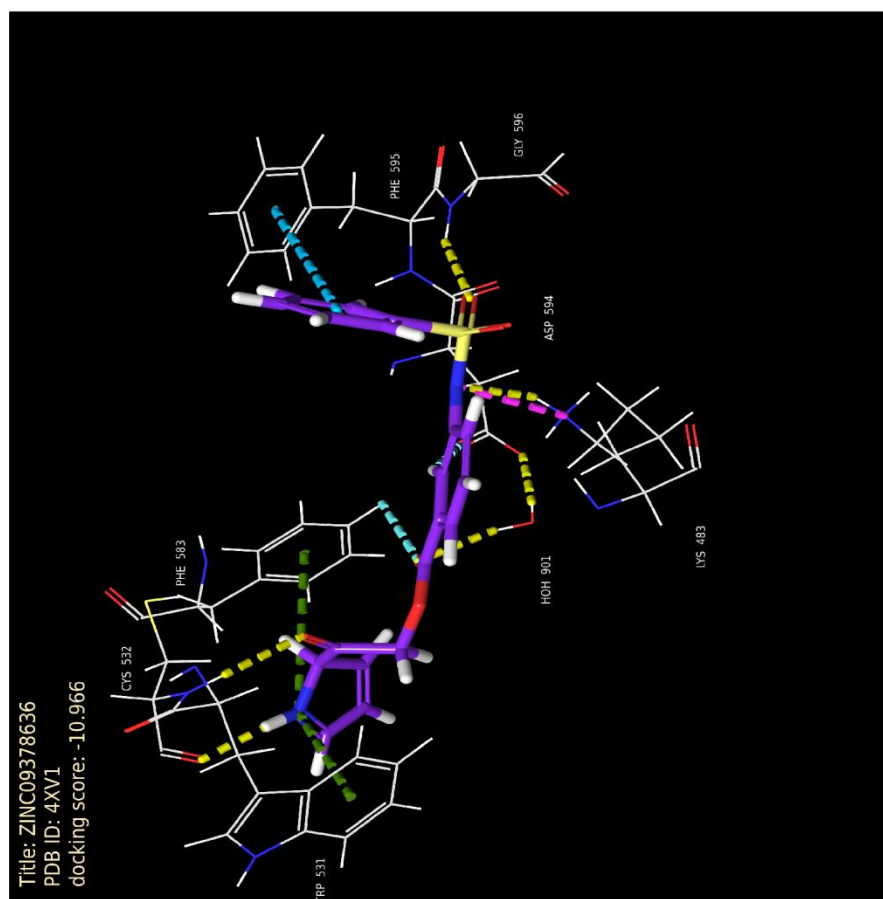












12 Βιβλιογραφία

1. R. Porter, ' . *The Greatest Benefit to Mankind: A Medical History of Humanity from Antiquity to the Present*. (1999).
2. Houghton, P. J. Products of chemistry: old yet new - pharmaceuticals from plants. *J. Chem. Educ.***78**, 178–184 (2001).
3. W. C. Agosta. Medicines and Drugs from Plants. *J. Chem. Educ.***74**, 857 (1997).
4. Ragozin, B. V. The history of the development of Ayurvedic medicine in Russia. *Ancient Science of Life***35**, 143–149 (2016).
5. Scheindlin Stanley. A brief history of pharmacology. *Mdd***4**, 87–88 (2001).
6. Schmiedeberg, O. Das Muscarin : Das giftige Alkaloid des Fliegenpilzes (*Agaricus muscarius* L.) : seine Darstellung, chemischen Eigenschaften ... (1869).
7. Bezdek, J. Fuzzy models—What are they, and why? [Editorial]. *IEEE Trans. Fuzzy Syst.***1**, 1–6 (1993).
8. Van Drie, J. H. Computer-aided drug design: the next 20 years. *J. Comput. Aided. Mol. Des.***21**, 591–601 (2007).
9. DiMasi, J. A., Grabowski, H. G. & Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J. Health Econ.***47**, 20–33 (2016).
10. PhRMA. Profile Biopharmaceutical Research Industry. *Pharm. Res. Manuf. Am.* 76 (2015).
11. Commissioner, O. of the. The Drug Development Process - Step 2: Preclinical Research.
12. Commissioner, O. of the. The Drug Development Process - Step 3: Clinical Research.
13. K. Appelt, R. J. Bacquet, C. A. Bartlett, C. L. J. Booth, S. T. Freer, M. A. M. Fuhry, M. R. Gehring, S. M. Herrmann, E. F. Howland, C.I A. Janson, T. R. Jones, C.. C. Kan, Vinit Kathardekar, Kathleen K. Lewis, Gifford P. Marzoni,

- David A. Matthews, C. Mo, K. M. W. and J. W. Design of enzyme inhibitors using iterative protein crystallographic analysis. *J. Med. Chem***34**, 1925–1934 (1991).
14. J. A. Montgomery. Purine Nucleoside Phosphorylase: A Target for Drug Design. *Med. I Res. Rev.***13**, 209–228 (1993).
 15. S. Ekins, J. Mestres, and B. T. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br. J. Pharmacol.***152**, 9–20 (2007).
 16. E. Martis. High-Throughput Screening: The Hits and Leads of Drug Discovery- An Overview | Elvis Martis - Academia.edu. *J. Appl. Pharm. Sci.***1**, 02–10 (2011).
 17. S. A. Eagger, R. Levy, and B. J. S. Tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet***337**, 989–992 (1991).
 18. M. von Itzstein. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.***6**, 967–974 (2007).
 19. D. J. Wilson, R. D. Hernadez, P. Andolfatto, and M. P. Population Genetics- Phylogenetics Approach to Inferring Natural Selection in Coding Sequences. *PLOS Genet.***7**, 1–13 (2011).
 20. Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J. & Lowe, E. W. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol. Rev.***66**, 334–95 (2014).
 21. J. P. Overington, B. A.-L. A. L. H. How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.***5**, 993–996 (2006).
 22. C. G. Wermuth, C. R. Ganellin, P. Lindberg, and L. A. M. Glossary of Terms Used in. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.***20**, 647–671 (2002).
 23. E. A. Hecker, C. Duraiswami, T. A. Andrea, and D. J. D. Use of catalyst pharmacophore models for screening of large combinatorial libraries. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.***20**, 647–671 (2002).
 24. S. L. Dixon, A. M. Smondyrev, E. H. Knoll, S. N. Rao, D. E. Shaw, and R. A. F. PHASE: A new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. Methodology and preliminary results. *J. Comput. Aided. Mol. Des.***20**, 647–671 (2006).

25. Sunseri, J. & Koes, D. R. Pharmit: interactive exploration of chemical space. *Nucleic Acids Res.***44**, gkw287- (2016).
26. Wolber, G. & Langer, T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.***45**, 160–169 (2005).
27. M. L. Verdonk et al. Virtual Screening Using Protein - Ligand Docking : Avoiding Artificial Enrichment. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.***44**, 793–806 (2004).
28. S. G. Rohrer and K. Baumann. Maximum unbiased validation (MUV) data sets for virtual screening based on PubChem bioactivity data. *J. Chem. Inf. Model.***49**, 169–184 (2009).
29. EMBL-EBI. Annual Scientific Report 2010 EMBL-EBI. (2010).
30. N. Huang, B. K. Shoichet, and J. J. I. Benchmarking Sets for Molecular Docking Benchmarking Sets for Molecular Docking. *Society***49**, 6789–6801 (2006).
31. T. Langer, and R. D. H. *Pharmacophores and Pharmacophore Research*. (2006).
32. H. Gao, C. Williams, P. Labute, and J. B. Binary Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) Analysis of Estrogen Receptor Ligands. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.***39**, 164–168 (1999).
33. Pagano Marcello, Gauvreau Kimberlee. *Αρχές Βιοστατιστικής*. (2002).
34. N. J. Richmond, C. A. Abrams, P. R. N. Wolohan, E. Abrahamian, P. Willett, and R. D. C. GALAHAD: 1. Pharmacophore identification by hypermolecular alignment of ligands in 3D. *J. Comput. Aided. Mol. Des.***20**, 567–587 (2006).
35. J. J. Irwin and B. K. Shoichet. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening,. *J. Chem. Inf. Model.***45**, 177–182 (2005).
36. T. I. Oprea. Virtual screening in lead discovery: A viewpoint. *Molecules*,**7**, 51–62 (2002).
37. M. D. Barratt and J. J. Langowski. Validation and Subsequent Development of the Derek Skin Sensitization Rulebase by Analysis of the BgVV List of Contact

- Allergens. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.***39**, 294–298 (1999).
38. J. C. Dearden et al. The Development and Validation of Expert Systems for Predicting Toxicity. *Altern. to Lab. Anim.***25**, 223–252 (1997).
 39. S.-Y. Huang, S. Z. Grinter, and X. Z. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.***12**, 12899–908 (2010).
 40. J. C. Cole, J. W. M. Nissink, and R. T. Protein-ligand Docking and Virtual Screening 234 with GOLD in Virtual Screening in Drug Discovery. (2005).
 41. G. M. Morris, R. Huey, and A. J. O. Using AutoDock for Ligand-Receptor Docking. *Cur. Prot. Bioinforma.* (2008).
 42. R. A. Friesner et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.***47**, 1739–1749 (2004).
 43. I. J. Chen and N. Foloppe. Drug-like bioactive structures and conformational coverage with the ligprep/confgen suite: Comparison to programs MOE and catalyst. *J. Chem. Inf. Model***50**, 822–839 (2010).
 44. G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, and W. S. Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.***27**, 221–234 (2013).
 45. Burotto, M., Chiou, V. L., Lee, J.-M. & Kohn, E. C. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer***120**, 3446–56 (2014).
 46. Lito, P. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat. Med.***19**, (2013).
 47. Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F. & McMahon, M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat. Rev. Cancer***14**, 455–67 (2014).
 48. Thevakumaran, N. et al. Crystal structure of a BRAF kinase domain monomer explains basis for allosteric regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.***22**, 37–43 (2015).
 49. Davies, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature***417**, 949–954 (2002).

50. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, V. V. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*.**418**, 934 (2002).
51. Karoulia, Z., Gavathiotis, E. & Poulidakos, P. I. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. *Nat. Rev. Cancer***17**, 676–691 (2017).
52. Anforth, R., Fernandez-Peñas, P. & Long, G. V. Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. *Lancet Oncol.***14**, e11–e18 (2013).
53. Gibney, G. T., Messina, J. L., Fedorenko, I. V., Sondak, V. K. & Smalley, K. S. M. Paradoxical oncogenesis—the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.***10**, 390–399 (2013).
54. Callahan, M. K. *et al.* Progression of RAS-Mutant Leukemia during RAF Inhibitor Treatment. *N. Engl. J. Med.***367**, 2316–2321 (2012).
55. Andrews, M. C. *et al.* BRAF Inhibitor–Driven Tumor Proliferation in a *KRAS* - Mutated Colon Carcinoma Is Not Overcome by MEK1/2 Inhibition. *J. Clin. Oncol.***31**, e448–e451 (2013).
56. Abel, E. V. *et al.* Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J. Clin. Invest.***123**, 2155–2168 (2013).
57. Zhang, C. *et al.* RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature***526**, 583–586 (2015).
58. Wolber, G., Dornhofer, A. A. & Langer, T. Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. *J. Comput. Aided. Mol. Des.***20**, 773–788 (2007).
59. Schrodinger LLC. (2017).
60. Maestro. Protein Preparation Wizard, Epik. (2014).
61. Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F. & McMahon, M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat. Rev. Cancer***14**, 455–67 (2014).
62. Arora, R. *et al.* Structural Investigation of B-Raf Paradox Breaker and Inducer Inhibitors. *J. Med. Chem.***58**, 1818–1831 (2015).

