

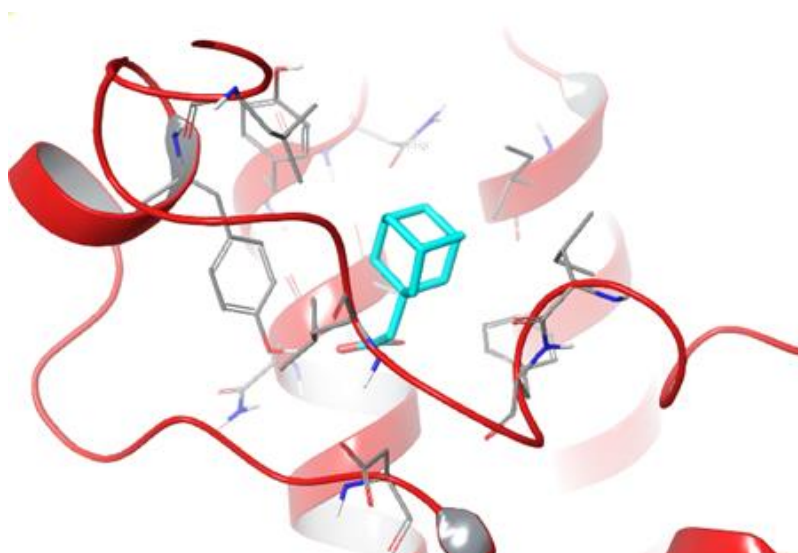
1837
2017
ΧΡΟΝΙΑ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

Διπλωματική Εργασία στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης «Σχεδιασμός και Ανάπτυξη νέων Φαρμακευτικών Ενώσεων με κατεύθυνση Φαρμακευτική Χημεία» με τίτλο:

Σχεδιασμός Φαρμάκων με τη χρήση μορίων- θραυσμάτων για τον επιγενετικό στόχο PB1A5



Ρούτση Μαρία

Φαρμακοποιός

Επιβλέπων καθηγητής:

Εμμανουήλ Μικρός

Αθήνα, Απρίλιος 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.Η βιολογία της επιγενετικής	5
1.1 Τι είναι επιγενετική;	5
1.2 Ο κώδικας της ιστόνης	5
1.3 Σημασία της μελέτης της επιγενετικής	7
1.4 Ρόλος των readers	9
1.5 Η σημασία της ακετυλίωσης της λυσίνης	9
1.6 Τι είναι τα bromodomains.....	11
1.7 Ρόλος των bromodomains.....	15
1.8 Το Polybromo 1 (5)	17
2. Η διαδικασία της ανακάλυψης φαρμάκων.....	21
2.1 Οι δοκιμασίες σάρωσης υψηλής αποτελεσματικότητας (HTS: High-Throughput Screening)	23
2.1.1 Η φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης.....	24
2.1.2 Σάρωση μέσω φασματοσκοπίας NMR.....	26
2.1.2a Μέθοδοι παρατήρησης της πρωτεΐνης.....	26
2.1.2β Πειράματα παρατήρησης των μικρών μορίων	26
2.1.3 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC-Isothermal Titration Calorimetry)	31
2.2 Ο σχεδιασμός φαρμάκων με in silico μεθόδους.....	33
2.3 Ο σχεδιασμός φαρμάκων με χρήση μορίων-θραυσμάτων	35
2.3.1. Οι βιβλιοθήκες μορίων-θραυσμάτων	37
2.3.2 Συνθετική επεξεργασία- Βελτιστοποίηση	40
2.4 Παραδείγματα μορίων που βρίσκονται στην κλινική πράξη ή σε κλινικές μελέτες που προέκυψαν από τη διαδικασία του FBDD	43
<i>Zelboraf</i>	43
<i>ABT-199 (Venetoclax)</i>	44
<i>AT13387</i>	46
ΣΚΟΠΟΣ	48
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
1.Θεωρητικοί υπολογισμοί	49
2.Υπερέκφραση και καθαρισμός της PB1A(5)	51
3.Η φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης	55

4.STD-NMR	56
5.Συγκρουστικότητα μορίων με την πρωτεΐνη PB1A5.....	57
6.ITC.....	62
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
1.Η βιβλιοθήκη μορίων-θραυσμάτων.....	63
2.Καθαρισμός της πρωτεΐνης PB1A5	70
3.Αποτελέσματα από DSF	72
4.Αποτελέσματα από το πείραμα STD-NMR.....	76
5.Induced Fit Docking	78
6.Κρυστάλλωση των μορίων 19E5 και 11E6	81
7.Μελέτες μοριακής Δυναμικής.....	84
8.Μελέτες φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης αδαμαντανικών αναλόγων	88
9.Βιοφυσικές μελέτες σε lead-like μόρια.....	93
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	100
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	102
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....	103
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	118

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω κατά αρχάς τον καθηγητή και επιβλέποντα της εργασίας μου Εμμανουήλ Μικρό για την πίστη του και εμπιστοσύνη σε μένα καθ' όλη τη διάρκεια των τριών χρόνων της συνεργασίας μας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαράκο και τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Αντώνιο Κολοκούρη για την ανάγνωση της διπλωματικής εργασίας μου και τις υποδείξεις τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και πρώτον από όλους το συνεργάτη μου, μεταδιδάκτορα Βασίλειο Μυριανθόπουλο για τη βοήθεια και τη συνεργασία μας τόσο κατά τη διάρκεια της πτυχιακής όσο και κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την ΕΤΕΠ Δήμητρα Μπενάκη (Ph.D) για την πολύτιμη βοήθεια της στα πειράματα STD-NMR και τον ΕΔΙΠ Γεώργιο Λαμπρινίδη (Ph.D) για τη βοήθεια του σε οποιοδήποτε πρόβλημα στα υπολογιστικά πειράματα. Οφείλω να ευχαριστήσω τον προπτυχιακό φοιτητή Δημήτρη-Ηλία Μπαλούρδα για την εκτέλεση ορισμένων επιπλέον πειραμάτων στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης μετά το πέρας της δικής μου παραμονής εκεί.

Οφείλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή Stefan Knapp και την ομάδα του από το Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης για τη φιλοξενία του στο εργαστήριο του, καθώς και τον καθηγητή Κωνσταντίνο Βοργιά και την ομάδα του για την καθοδήγηση στις πρώτες μου απόπειρες υπερέκφρασης και καθαρισμού πρωτεΐνης.

Οφείλω να εκφράσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τον επίκουρο καθηγητή Γκίκα Ευάγγελο, την υποψήφια Διδάκτορα Ζάντζα Ηλιάνα και την υποψήφια Διδάκτορα Άννα Μαρία Φαντέλ για την ψυχολογική τους υποστήριξη και τη δημιουργία ενός ευχάριστου εργασιακού περιβάλλοντος.

Και τέλος, περισσότερο από όλους, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένεια μου για την αέναη υποστήριξη και ενθάρρυνση τους σε οτιδήποτε με το οποίο καταπιάνομαι.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η βιολογία της επιγενετικής

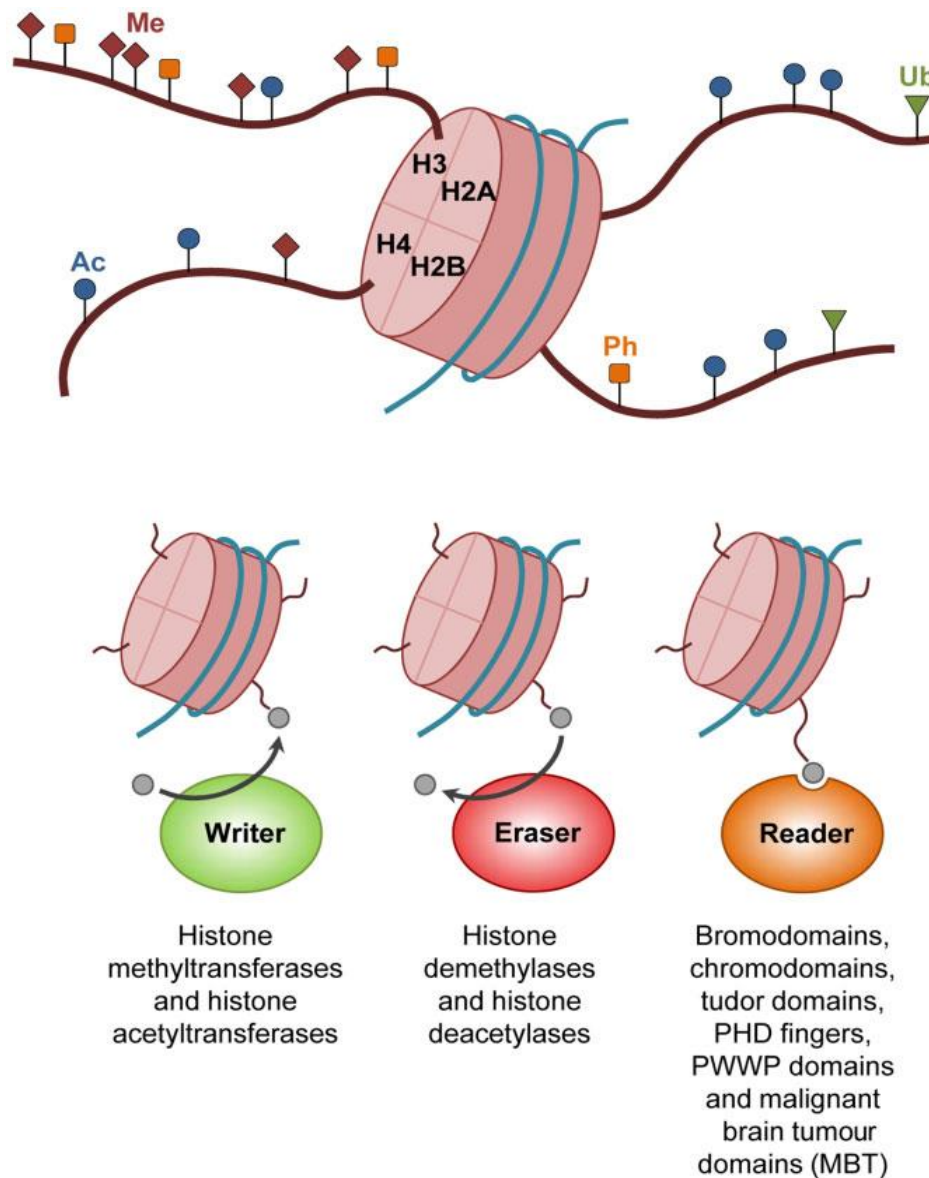
1.1 Τι είναι επιγενετική;

Τα κύτταρα των θηλαστικών περιέχουν περίπου δύο μέτρα γραμμικό DNA το οποίο βρίσκεται πακεταρισμένο στον πυρήνα. Αυτό επιτυγχάνεται από την αλληλεπίδραση του DNA με πρωτεΐνες με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα, τις ιστόνες, για να σχηματιστεί η συμπακνωμένη δομή της χρωματίνης. Τα νουκλεοσώματα αντιπροσωπεύουν τη βασική υπομονάδα της χρωματίνης και αποτελούνται κυρίως από οκταμερή ιστόνης που αποτελούνται από τις ιστόνες H2A H2B, H3, H4 και διμερή αυτών γύρω από τα οποία τυλίγεται το DNA έκτασης περίπου 147 ζευγών βάσεων σχηματίζοντας 1.7 αριστερόστροφες στροφές . Τα νουκλεοσώματα διαχωρίζονται μεταξύ τους από DNA μήκους 80 ζευγών βάσεων το οποίο επικαλύπτεται με την ιστόνη H1. Τα κύτταρα σε έναν οργανισμό περιέχουν ταυτόσημο γενετικό υλικό αλλά όλα έχουν τη δυνατότητα να διατηρούν το συγκεκριμένο φαινότυπο και τις βιολογικές λειτουργίες των ιστών και οργάνων στα οποία είναι ενσωματωμένα. Η δυνατότητα αυτή διασφαλίζεται από τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη χρωματίνη και τις κληρονομήσιμες χημικές τροποποιήσεις των ιστονών και της αλληλουχίας του DNA: το επιγονιδίωμα. Η έννοια της επιγενετικής εισήχθη για πρώτη φορά το 1939 από τον Waddington για να περιγράψει "τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και των προϊόντων τους, τα οποία φέρουν το φαινότυπο σε λειτουργία", και αργότερα ορίστηκε ως «οι κληρονομικές μεταβολές στην έκφραση γονιδίου οι οποίες δεν οφείλονται σε μεταβολές στην αλληλουχία του DNA.»

1.2 Ο κώδικας της ιστόνης

Αν και αυτές οι τροποποιήσεις δεν συνεπάγονται αλλαγές στη γραμμική αλληλουχία DNA, είναι θεμελιώδους σημασίας για τη διατήρηση της ταυτότητας των κυττάρων και τη ρύθμιση διεργασιών, όπως η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, ο πολλαπλασιασμός και η ακεραιότητα του γονιδιώματος. Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν την επιγενετική

γονιδιακή ρύθμιση μέσω αλλαγών στη δομή της χρωματίνης, αλλά οι ομοιοπολικές αλλαγές στις ιστόνες και το DNA είναι πιθανόν τα πιο καθοριστικά στοιχεία που συντονίζουν αυτή τη διαδικασία. Οι τροποποιήσεις στη χρωματίνη είναι υπεύθυνες για αλλαγές στη διαμόρφωση της μέσω των αποτελεσμάτων που επιφέρουν στην αλληλεπίδραση DNA αλληλουχίας και ιστονών που καθορίζουν την πρόσβαση σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος ή μέσω της δημιουργίας σημείων πρόσδεσης για τους επιγενετικούς ρυθμιστές. Ο χάρτης των συνδυασμών των ομοιοπολικών τροποποιήσεων είναι γνωστός ως «histone code» και περιλαμβάνει τέσσερις διαφορετικές τροποποιήσεις του DNA και τουλάχιστον 16 διαφορετικές αλλαγές στις ιστόνες όπως φωσφορυλίωση, ακετυλίωση, μεθυλίωση, ουβικουτινίωση και SUMOτυλίωση (sumoylation). Οι τροποποιήσεις αυτές λαμβάνουν χώρα κυρίως στις N-τελικές ουρές των ιστονών, οι οποίες προεξέχουν από το σφαιρικό πυρήνα του νουκλεοσώματος. Έρευνες των τελευταίων ετών έχουν αυξήσει σημαντικά τη γνώση μας σχετικά με τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με αυτές τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με τη χρωματίνη και καταλύουν, αναγνωρίζουν ή απομακρύνουν αυτές τις συγκεκριμένες χημικές τροποποιήσεις. Είναι γνωστές ως writers, readers και erasers αντίστοιχα. Οι περισσότερες από αυτές τις πρωτεΐνες διαθέτουν εξειδικευμένες πρωτεϊνικές περιοχές που είναι ικανές να αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος υπό την καθοδήγηση του histone code. Οι πιο γνωστοί writers είναι η ακετυλοτρανσφεράση της ιστόνης (HAT), η μεθυλοτρανσφεράση της ιστόνης (HMT) και ορισμένες κινάσες. Στην κατηγορία των erasers, δηλαδή των ενζύμων που απομακρύνουν τις τροποποιήσεις των writers ανήκουν η δεακετυλάση της ιστόνης, οι δεμεθυλάσες και οι φωσφατάσες. Για τους readers θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω.



Εικόνα 1: Το νουκλεόσωμα που αποτελεί τη βασική μονάδα της χρωματίνης, που αποτελείται από DNA τυλιγμένο γύρω από ιστόνες. Οι "ουρές" των ιστονών υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, που διαμεσολαβούνται από τους readers, τους writers και τους erasers. (Simó- Riudalbas, Esteller, 2015)

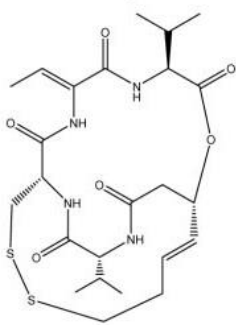
1.3 Σημασία της μελέτης της επιγενετικής

Απορρύθμιση του επιγενετικού ελέγχου συνδέεται συχνά με διάφορες ανθρώπινες ασθένειες όπως ο καρκίνος. Τα καρκινικά κύτταρα υπόκεινται σε γενική επιγενετική αναδιοργάνωση με αποτέλεσμα τη CpG-εκλεκτική υπερμεθυλίωση των υποκινητών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (δηλαδή την υπερμεθυλίωση σε περιοχές των υποκινητών που περιέχουν πολλά γειτονικά νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης) και τη γενικευμένη απώλεια της μεθυλίωσης του DNA σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και εκκινητές ογκογονιδίων. Επιπροσθέτως, γονίδια που κωδικοποιούν επιγενετικούς

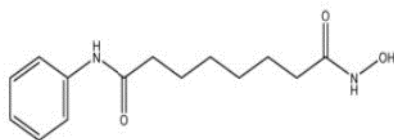
ρυθμιστές υφίστανται διάφορες αλλαγές στον καρκίνο όπως σημειακές μεταλλάξεις, μεταθέσεις, ενίσχυση ή αποσιώπηση. Ανάλογα με την πρωτεΐνη που εμπλέκεται και το βιολογικό μονοπάτι που επηρεάζεται, αυτές οι τροποποιήσεις θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αλλαγές στη μεταγραφή ή σε μεγαλύτερες αλλαγές στη δομή της χρωματίνης.

Σε αντίθεση με τις μη αντιστρεπτές γενετικές μεταλλάξεις που απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια ή ενεργοποιούν ογκογονίδια στον καρκίνο, οι επιγενετικές τροποποιήσεις μπορούν να αντιστραφούν. Επομένως, η δυναμική του επιγονιδιώματος επιτρέπει την επιδιόρθωση των ανώμαλων επιγενετικών προφίλ μέσω φαρμακευτικής παρέμβασης. Οι επιγενετικές θεραπείες που στοχεύουν ρυθμιστές της χρωματίνης, έχουν ήδη εγκριθεί από τον FDA. Μια τέτοια περίπτωση είναι αυτή των φαρμάκων 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη και 5-αζακυτιδίνη, που είναι ανάλογα νουκλεοζιτών που αποκλείουν μη αντιστρεπτά τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες DNMT1 και DNMT3B και χρησιμοποιούνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS). Το vorinostat (SAHA) και το romidepsin είναι αναστολείς της δεακετυλάσης της ιστόνης (HDAC) και είναι εγκεκριμένα για τη θεραπεία του ανθεκτικού δερματικού λεμφώματος των T-κυττάρων. Παρά το γεγονός ότι η εισαγωγή αυτών των μορίων στην κλινική πράξη αποτελεί μεγάλη επιτυχία για τον κλάδο, ο ακριβής μηχανισμός δράσης τους παραμένει ασαφής και δεν υπάρχουν αξιόπιστοι βιοδείκτες για την πρόβλεψη της κλινικής δράσης τους.

Romidepsin



Vorinostat



Εικόνα 2 Αναστολείς της HDAC (Simó- Riudalbas, Esteller, 2015)

1.4 Ρόλος των readers

Οι readers των τροποποιήσεων των ιστονών συχνά χρησιμεύουν ως πλατφόρμες για τη σύνδεση με άλλες πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των readerπρωτεϊνών και των τροποποιήσεων των ιστονών είναι πολύ συγκεκριμένες και επηρεάζονται περαιτέρω και από γειτονικές τροποποιήσεις, εξ ου και η ιδέα του histone code. Πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι ξεχωριστές τοπικές αλλαγές μπορεί να έχουν δραματική αλλαγή στην πρόσδεση των reader πρωτεϊνών, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν το μοριακό αποτέλεσμα των αντίστοιχων αλληλεπιδράσεων.

Η παρεμπόδιση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αποτελούν σε γενικές γραμμές μια πρόκληση και υπάρχουν λίγα μόρια στη βιβλιογραφία που μπορούν να την επιτύχουν διατηρώντας παράλληλα τα απαραίτητα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά.

Τα μόρια αυτά αναγνωρίζουν όχι μόνο αμινοξέα τα οποία έχουν υποστεί διαφορετική τροποποίηση αλλά και διαφορετικές τροποποιήσεις στο ίδιο αμινοξύ. Για παράδειγμα η λυσίνη μπορεί να υποστεί διάφορες ομοιοπολικές τροποποιήσεις όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση ουβικουιτινιλίωση και SUMOτυλίωση. Επιτυγχάνονται διαφορετικά επίπεδα πολυπλοκότητας όταν κάθε κατάλοιπο λυσίνης υφίσταται διαφορετικούς βαθμούς μεθυλίωσης: μονομεθυλίωση, διμεθυλίωση, ή ακόμη και τριμεθυλίωση. Πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν τέτοια μοτίβα είναι τα Tudor domains, τα chromodomains, τα PWWP domains και τα Plant homeo domain fingers. Κάθε πρωτεϊνική περιοχή εντός μια οικογένειας πρωτεϊνών μπορεί να έχει παραλλαγές που διαφοροποιούν το προτιμώμενο υπόστρωμα πρόσδεσής τους. Τα bromodomains είναι οι μοναδικές μονάδες αλληλεπίδρασης που αναγνωρίζουν ειδικά την ε-N-ακετυλίωση των κατάλοιπων λυσίνης. (Simó- Riudalbas, Esteller, 2015)

1.5 Η σημασία της ακετυλίωσης της λυσίνης

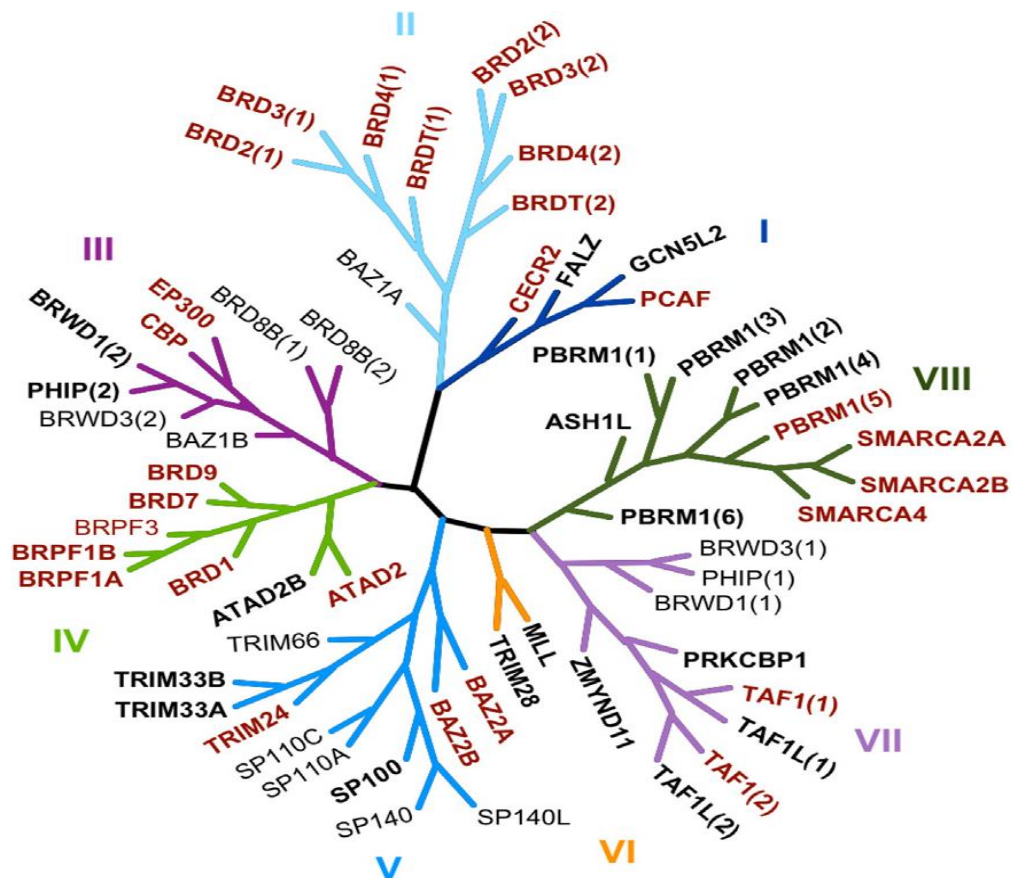
Η ακετυλίωση προσδιορίστηκε για πρώτη φορά στις ιστόνες το 1964 ως μια πιθανή ρυθμιστική διαδικασία της σύνθεσης του RNA. Διαδοχικές ανακαλύψεις το 1996 απέδειξαν ότι η σταθερή κατάσταση ισορροπίας των στόνων καταλύεται από ένζυμα με αντιτιθέμενες δραστηριότητες (Gcn5p ακετυλο-τρανσφεράση και Rpd3p δεακετυλάση), τα οποία ήταν ήδη γνωστοί ρυθμιστές της μεταγραφής γονιδίων, και

επομένως έτσι συνδέθηκε η διαδικασία της ακετυλίωσης των ιστόνων με τη μεταγραφή. Η ακετυλίωση της λυσίνης είναι γνωστό ότι συμβαίνει σε πάνω από 40 μεταγραφικούς παράγοντες, ειδικοί για ορισμένες αλληλουχίες, και επηρεάζουν τη δυνατότητα σύνδεσης στο DNA, τη σύνδεση με άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες, τον εντοπισμό στον πυρήνα, τη φωσφορυλίωση, την ουβικουιτινίωση και τη σταθερότητα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτού του είδους η τροποποίηση επάγει τη μεταγραφή. Ωστόσο η ακετυλίωση των NF-κB, RelA, TCF (*Drosophila*), HMG1(Y), C/EBPb, IRF2, IRF7, E2f και AFXa εμποδίζει τη μεταγραφή, πράγμα το οποίο μπορεί να λειτουργεί ως μηχανισμός ανάδρασης για τον έλεγχο της διάρκειας της μεταγραφής. Η ακετυλίωση της λυσίνης λαμβάνει χώρα επίσης σε μεταγραφικούς συν-ρυθμιστές, γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες και σε παράγοντες που δρουν στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Ιδιαίτερως, η ακετυλίωση των παραγόντων ACTR, TAF_i68 και Brgm απενεργοποιεί τη μεταγραφή και η αυτοακετυλίωση των μεταγραφικών συνενεργοποιητών PCAF και p300 ρυθμίζει τη δραστηριότητα της ακετυλοτρανσφεράσης τους. Όπως φαίνεται και στον πίνακα η ακετυλίωση τροποποιεί και ευκαρυωτικές πρωτεΐνες εκτός των ιστόνων που εμπλέκονται στην αντιγραφή, τη συνοχή των αδελφών χρωματίδων, την κυτταρική μεταγωγή σήματος και την κυτταρική κινητικότητα. Αυτό που κινεί το ενδιαφέρον είναι πως οι τροποποιήσεις αυτές ρυθμίζουν τη λειτουργία αρκετών ιικών και βακτηριακών πρωτεϊνών. Συμπερασματικά, η ακετυλίωση της λυσίνης, συμβαίνει όχι μόνο σε πολλές πρωτεΐνες του πυρήνα, αλλά επίσης σε πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και πρωτεΐνες ιών και βακτηρίων.(Xiang-Jiao Yang, 2004)

Η ακετυλίωση των ιστόνων σε γενικές γραμμές συνδέεται με βελτιωμένη ικανότητα πρόσβασης στο DNA και ενεργοποίηση της μεταγραφής. Η ακετυλίωση αποδυναμώνει τις αλληλεπιδράσεις ιστόνης και DNA καθώς καθιστά ουδέτερες, τις θετικά φορτισμένες λυσίνες και έτσι επάγει δομικές αλλαγές στις ιστόνες. Η ακετυλίωση επίσης χαλαρώνει το πακετάρισμα του νουκλεοσώματος με τη χρωματίνη, αυξάνοντας έτσι την προσβασιμότητα στο DNA. Ένα ακόμη γεγονός που προκύπτει από την ακετυλίωση είναι η επιστράτευση παραγόντων μεταγραφής και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, οι οποίοι με τη σειρά τους οδηγούν σε βελτιωμένη μεταγραφική δραστηριότητα. Τέτοιοι παράγοντες συνήθως επιστρατεύονται μέσω των bromodomains, τα οποία είναι πρωτεϊνικές λειτουργικές μονάδες επιγενετικών αναγνωστών (readers) που αναγνωρίζουν ειδικά τις ε-N ακετυλιωμένες λυσίνες (Kac).

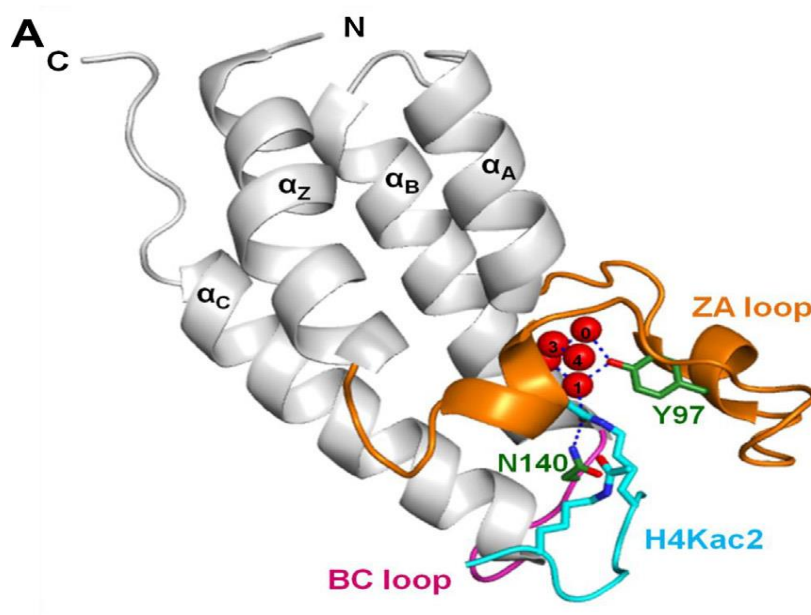
1.6 Τι είναι τα bromodomains

Τα bromodomains (BRDs) πήραν το όνομά τους από την πρωτεΐνη brahma της *Drosophila*, στην οποία ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 46 διαφορετικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν συνολικά 61 BRDs. (P. Filippakopoulos, S. Knapp, 2012). Οι πρωτεΐνες αυτές περιλαμβάνουν τις HAT και πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις HAT (όπως π.χ. η KAT2A), CPB/P300 συσχετιζόμενοι παράγοντες (PCAF ή αλλιώς KAT2B) ή η πρωτεΐνη BRD9, μεθυλοτρανσφεράσες της ιστόνης (π.χ. η ASH1L και η MLL (mixed leukemia protein)), ελικάσες (π.χ. SMARCA), συμπλέγματα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης εξαρτώμενα από το ATP (π.χ. BAZ1B, γνωστό και ως μεταγραφικός παράγοντας του συνδρόμου του Williams), μεταγραφικοί συνενεργοποιητές (π.χ. TRIMs και TAFs) και μεταγραφικοί διαμεσολαβητές (π.χ. TAF1), πρωτεΐνες του πυρηνικού σκελετού (π.χ. Polybromo 1 (PBRM1)), όπως και η υποοικογένεια των BET πρωτεϊνών. (Filippakopoulos, Knapp, 2014)



Εικόνα 3 Το φυλογενετικό δέντρο των BRDs με βάση τη δομή. Οι διάφορες οικογένειες συμβολίζονται με λατινικούς αριθμούς. (P. Filippakopoulos, S. Knapp, 2012)

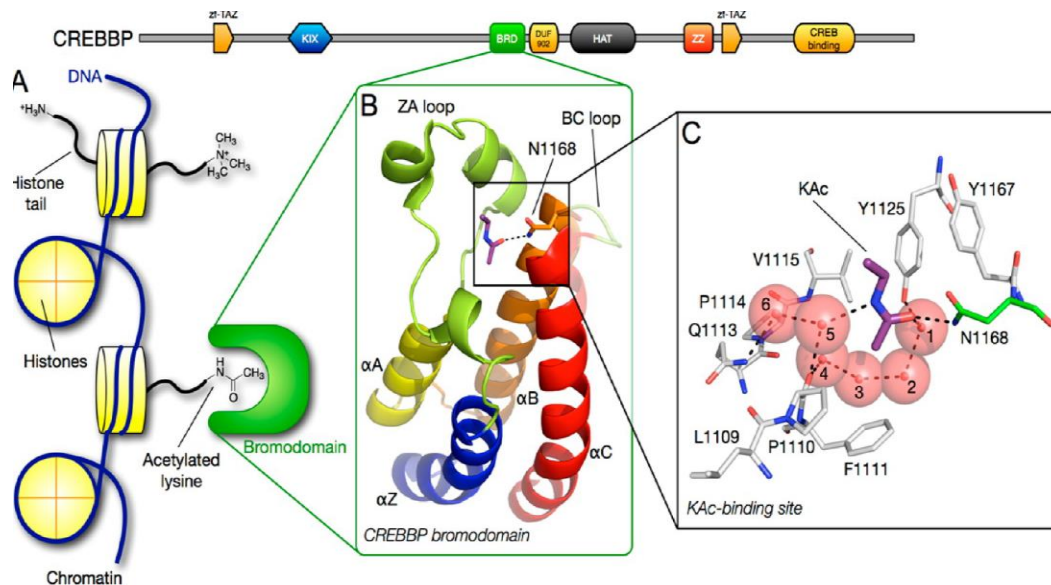
Μετά από κατηγοριοποίηση με βάση τη δομή, προέκυψαν 8 οικογένειες που περιλαμβάνουν τα 61 BRDs. (Filipakopoulos, Knapp, 2012). Το καλύτερα μελετημένο γκρουπ των BRDs είναι ένα κομμάτι της οικογένειας II, τα BET (Bromodomain and Extra-Terminal BRDs). Παρά το χαμηλό βαθμό γενικής ομολογίας της ακολουθίας, όλα τα BRDs μοιράζονται ένα συντηρημένο τρόπο αναδίπλωσης που συνίσταται από τέσσερις α -έλικες (α_z , α_A , α_B , α_C) που συνδέονται με μεταβλητές περιοχές, τους βρόχους, (ZA και BC βρόχοι) που σχηματίζουν το σημείο πρόσδεσης για τα αναγνωριζόμενα μοτίβα αλληλεπίδρασης. Το C- και το N-τελικό άκρο διαφέρουν αρκετά στα BRDs και μπορεί να συνδέονται είτε με επιπλέον έλικες που επεκτείνουν τη συνηθισμένη αναδιπλωμένη μορφή του BRD (π.χ. το έκτο BRD του PB1 έχει μία επιπλέον έλικα στο C-τελικό του άκρο), είτε να έχουν εκτεταμένες μπερδεμένες έλικες ως επέκταση του N- ή του C-τελικού άκρου (π.χ. στο TAF1L ή στο ATAD2).



Εικόνα 4 Η δομή του Bromodomain BRD4 μαζί με το διακετυλιωμένο πεπτίδιο της ιστόνης ως προσδέτη. Η εικόνα δείχνει την αναδίπλωση του BRD και τις λεπτομέρειες που καθιστούν δυνατές τις αλληλεπιδράσεις για πρόσδεση (Ferri E., 2016)

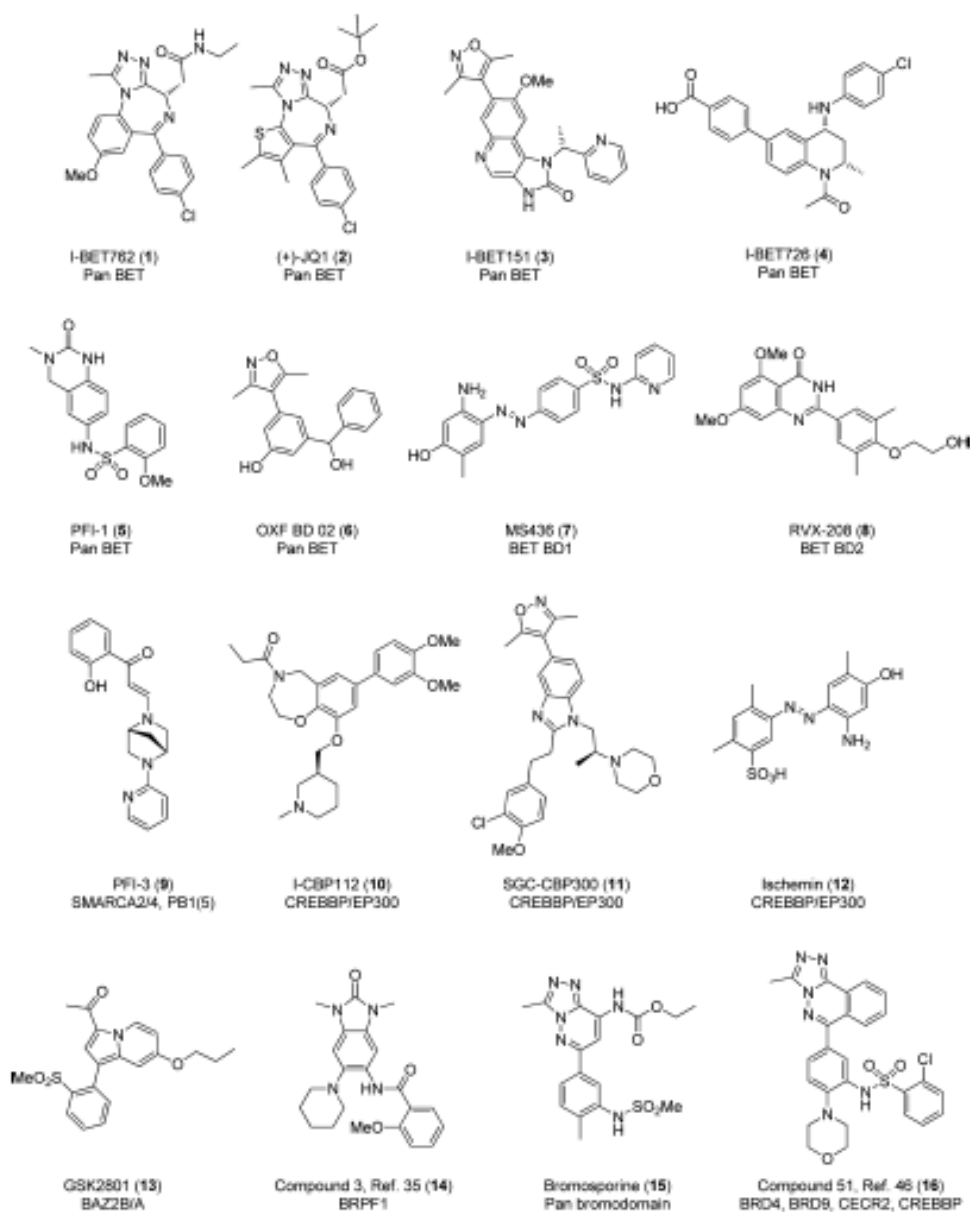
Οι τέσσερις έλικες σχηματίζουν μια βαθιά κοιλότητα που παρατείνεται κατά τις δύο περιοχές των βρόχων ZA και BC, δημιουργώντας μία πολύ υδρόφοβη κοιλότητα πρόσδεσης της Kac. Η πιο αξιοσημείωτη δομική διαφορά μεταξύ του βασικού σκελετού διαφόρων BRDs είναι η δομή φουρκέτας που βρίσκεται ανάμεσα στην έλικα α_z και το βρόχο ZA, που βρίσκεται σε όλες τις πρωτεΐνες της οικογένειας VIII. Η εγγύτητα στο σημείο πρόσδεσης της Kac υποδηλώνει ότι αυτό το πρόσθετο κομμάτι μπορεί να παίζει ρόλο στην κινητοποίηση ακετυλιωμένων προσδεμάτων. Αλληλουχίες αμινοξέων που παρεμβάλλονται στο βρόχο ZA είναι συνήθεις, πράγμα που οδηγεί στην

ύπαρξη σημαντικών διαφορών στο άκρο του σημείου πρόσδεσης της Kac. Σε αντίθεση με τον συντηρημένη τριτοταγή δομή, τα BRDs διαφέρουν πολύ μεταξύ τους στις ιδιότητες της επιφάνειάς τους. Το ηλεκτροστατικό δυναμικό της επιφάνειας κοντά στο σημείο πρόσδεσης της Kac μπορεί να είναι από πολύ θετικό έως και ισχυρά αρνητικό, πράγμα που υποδηλώνει πως τα BRDs αναγνωρίζουν αρκετά διαφορετικές αλληλουχίες (P. Filippakopoulos, S. Knapp et.al., 2012). Δύο αμινοξικά κατάλοιπα υπεύθυνα για την αναγνώριση της Kac, που είναι συντηρημένα στα περισσότερα BRDs είναι μια τυροσίνη στο βρόχο ZA και μια ασπαραγίνη στο βρόχο BC. Αυτά τα αμινοξέα σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου απευθείας ή μέσω μορίου νερού με την Kac και την ακετυλο-ομάδα αντίστοιχα. Ορισμένα BRDs έχουν διαφορετικά αμινοξέα στη θέση της ασπαραγίνης (μια θρεονίνη ή τυροσίνη στις περισσότερες περιπτώσεις) και παρουσιάζουν ασυνήθιστες διαμορφώσεις του βρόχου ZA π.χ. PHIP(2), BRWD3(2), WDR9(2), SP110, SP140, MLL, ZMYND11, ASH1L, TRIM28 και PBRM1(1). Το γεγονός ότι κάποια από αυτά τα BRDs δένονται παρόλα αυτά σε ιστόνες με τρόπο εξαρτώμενο της ακετυλίωσης υποδηλώνει πως χρησιμοποιούν εναλλακτικούς τρόπους αναγνώρισης της Kac, οι οποίοι δεν είναι ακόμη ξεκάθαροι. Ένα ακόμη πολύ καλά συντηρημένο χαρακτηριστικό στα BRDs τα τέσσερα-έξι (ανάλογα με το BRD) μόρια νερού (οι κόκκινες σφαίρες την ακόλουθης εικόνας) που βρίσκονται «θαμμένα» στην υδρόφοβη κοιλότητα. Σε αρκετές κρυσταλλογραφίες BRDs, έχουν συγκρυσταλλωθεί 1 ή 2 ακόμη μόρια νερού, τα οποία αλληλεπιδρούν με το κανάλι ZA. Αυτά τα μόρια νερού παρατηρούνται συνεχώς στις κρυσταλλογραφίες των BRDs και έχει βρεθεί πως αλληλεπιδρούν με προσδέτες και αναστολείς με παρόμοιο τρόπο, καθιστώντας τα σημαντικό χαρακτηριστικό για το σχεδιασμό φαρμάκων και τις στρατηγικές εικονικής σάρωσης (Ferri E., Petosa, McKenna, 2016). Αυτά τα μόρια νερού χαίρουν εξέχουσας σημασίας για το σχεδιασμό φαρμάκων.



Εικόνα 5 Η ακετυλίωση της Lys στο CREBBP και η "ανάγνωση" της αλλαγής από το BRD του πρωτεϊνικού συμπλέγματος. Η δομή του BRD με την Kac με έμφαση στο δίκτυο των νερών και στις αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων με την Kac (Conway, 2012)

Τέλος σε πολλά BRDs, συμπεριλαμβανομένης και της υποοικογένειας BET αλλά και άλλων, υπάρχει μια συντηρημένη αλληλουχία τριών αμινοξέων γνωστή ως «WPF shelf». Η παρουσία ή η απουσία της μπορεί να διερευνηθεί με σκοπό την εκλεκτική αναστολή των BET από τα υπόλοιπα BRDs.

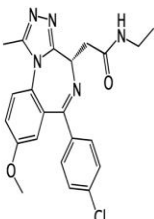
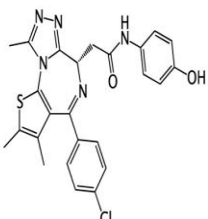
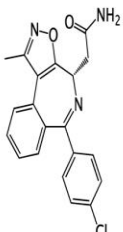
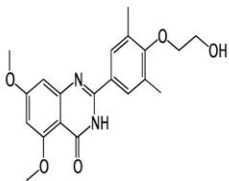


Εικόνα 6 Δομές γνωστών αναστολέων διαφόρων BRDs (N. Theodoulou, etal. 2015)

1.7 Ρόλος των bromodomains

Οι πρωτεΐνες που περιέχουν BRDs συχνά απορυθμίζονται σε παθολογικές καταστάσεις και τα bromodomains φαίνεται να έχουν ρόλους στο μηχανισμό πρόκλησης της ασθένειας. Μεταξύ των κατηγοριών των πρωτεϊνών αυτών που έχουν συσχετιστεί με κάποια ασθένεια, περιλαμβάνονται συν-ρυθμιστές της μεταγραφής (π.χ. η BRD4 που ανήκει στα BET και η ATAD2), μεταγραφικοί καταστολείς (π.χ. BAZ2A ή αλλιώς TIP5), παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (π.χ. BAZ1A, BPTF, CECR2),

ακετυλοτρανσφεράσες της ιστόνης (π.χ. CREBBP και EP300) και E3 λιγάσες της ουβικουιτίνης (π.χ. TRIM24) μεταξύ άλλων. Η σύνδεση του ρόλου των πρωτεϊνών που διαθέτουν BRDs έχει πυροδοτήσει την ανάπτυξη αναστολέων των BRDs για σκοπούς ανακάλυψης νέων φαρμάκων (Galdeano, Ciulli, 2016). Τα τελευταία πέντε χρόνια έχουν προκύψει πολλοί αναστολείς που στοχεύουν την υποοικογένεια των BET. Μέχρι στιγμής, έχουν ανακαλυφθεί δέκα μόρια που μπλοκάρουν τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στα BET και έχουν περάσει στο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Ένα από αυτά το RVX-208 έφτασε στη φάση III το φθινόπωρο του 2015 για τη θεραπεία της αρτηριοσκλήρυνσης που σχετίζεται με καρδιαγγειακή νόσο. Τρεις ακόμη αναστολείς των BET έχουν φτάσει στη φάση II των κλινικών δοκιμών (OTX015, BMS-9861158 και GSK525762). Το OTX015 βρίσκεται μάλιστα σε 4 διαφορετικές κλινικές δοκιμές για τη θεραπεία της οξείας λευχαιμίας και αιματολογικών κακοηθειών, για προχωρημένους συμπαγείς όγκους, για επανεμφανιζόμενο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα και σε συνδυασμό με την αζακυτιδίνη σε ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση οξείας μυελογενούς λευχαιμίας που δε αποτελούν υποψήφιοι για την συνηθισμένη θεραπεία.

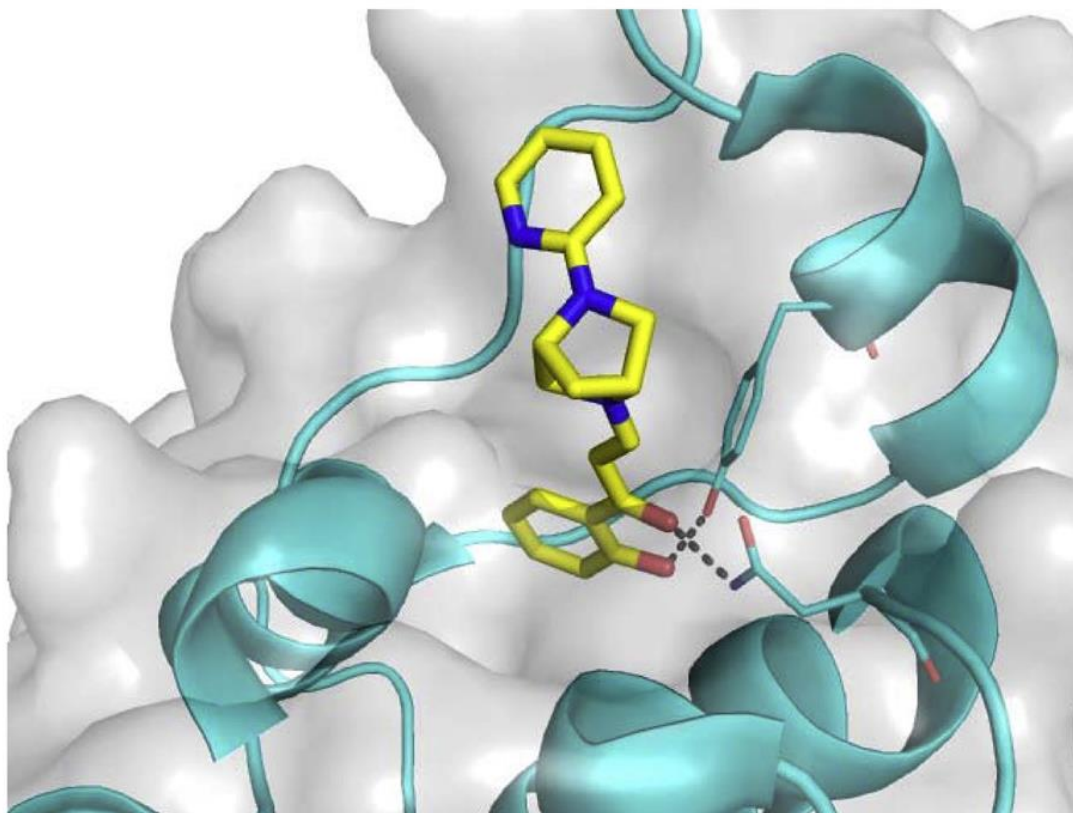
BET inhibitor	Chemical structure	Condition (Phase & status)
I-BET762 (GSK525762)		NMC and other cancers (Phase 1, recruiting) Hematologic malignancies (Phase 1, recruiting)
OTX-015		AML, Diffuse Large B-cell Lymphoma, Acute Lymphoblastic Leukemia, MM (Phase 1, ongoing, but not recruiting) NMC, Triple Negative Breast Cancer, CRPC, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Non-small Cell Lung Cancer With Rearranged ALK Gene/Fusion Protein or KRAS Mutation (Phase 1, ongoing, but not recruiting) Glioblastoma Multiforme (Phase 2, terminated)
CPI-0610		Lymphoma (Phase 1, recruiting) MM (Phase 1, recruiting) AML, MDS, Unclassifiable, Myelofibrosis, Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasm (Phase 1, recruiting)
RVX208		Diabetes Mellitus, Type 2, Coronary Artery Disease, Cardiovascular Diseases (Phase 3, recruiting) Diabetes (Phase 2, completed) Atherosclerosis, Coronary Artery Disease (Phase 2, completed) Coronary Artery Disease, Dyslipidemia (Phase 2, completed) Dyslipidemia, Atherosclerosis, Acute Coronary Syndrome, Cardiovascular Disease (Phase 2, completed) Coronary Artery Disease (Phase 2, completed) Dyslipidemia, Coronary Artery Disease (Phase 2, terminated)

Εικόνα 7 Αναστολείς της υποοικογένειας BET σε κλινικές μελέτες. (Tomomi Noguchi-Yachide ,2016)

1.8 Το Polybromo 1 (5)

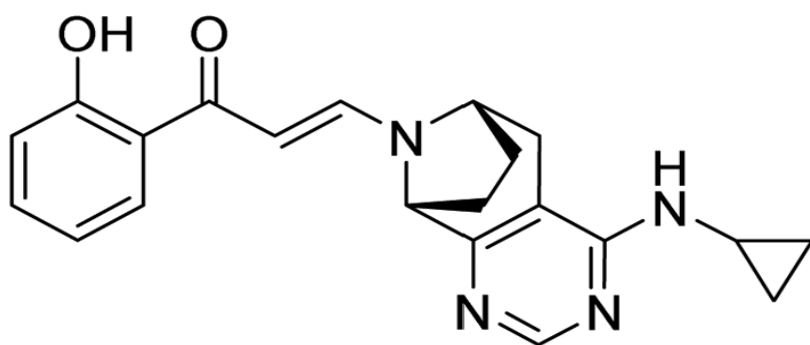
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το πέμπτο BRD του Polybromo 1 (PB1(5)). Η πρωτεΐνη PB1 περιλαμβάνει έξι BRDs που έχουν κατηγοριοποιηθεί στην οικογένεια VIII των πρωτεϊνών που περιέχουν BRDs με βάση τη δομική και αλληλουχική τους ομολογία. Το PB1 βρίσκεται στο σύμπλεγμα PBAF (Polybromo Brg-1 associated factors) μαζί είτε με το SMARCA2 ή το SMARCA4 (Gerstenberger et al,2016). Τα BRDs του PB1 έχει δειχθεί ότι προσδένονται σε οποιοδήποτε ακετυλιωμένη λυσίνη στο N-τελικό άκρο της H3 ιστόνης. Η Pfizer και το SGC (Structural Genome Consortium) ανέπτυξαν το PFI-3 ως chemical probe για τα SMARCA2/4 και το PB1(5), που διαθέτει εκλεκτικότητα για αυτά σε σχέση με την υποοικογένεια BET.

Αποτελώντας ανάλογο που αναπτύχθηκε από το σαλικυλικό οξύ, το PFI-3, παρουσιάζει έναν ιδιαίτερα ασυνήθιστο τρόπο πρόσδεσης στα BRDs καθώς απομακρύνει τέσσερα μόρια νερού από την κοιλότητα, τα οποία είναι καλά συντηρημένα σε πολλές κρυσταλλογραφικές δομές BRDs. Το παράγωγο του σαλικυλικού που μιμείται την Kac αλληλεπιδρά απευθείας με τόσο με την ασπαραγίνη της κοιλότητας (N1464) όσο και με την τυροσίνη (Y1421), σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση μέσω νερού που παρατηρείται συνήθως στην τυροσίνη. Η γέφυρα του πιπεραζινικού δακτυλίου όχι μόνο προσδίδει σχηματική συμπληρωματικότητα στο bromodomain, αλλά και η τοποθέτηση του πυριδινικού δακτυλίου μέσα στην υδρόφοβη κοιλότητα είναι επίσης σημαντική για την στερεοχημική παρεμπόδιση της υδρόλυσης της εναμίνης.



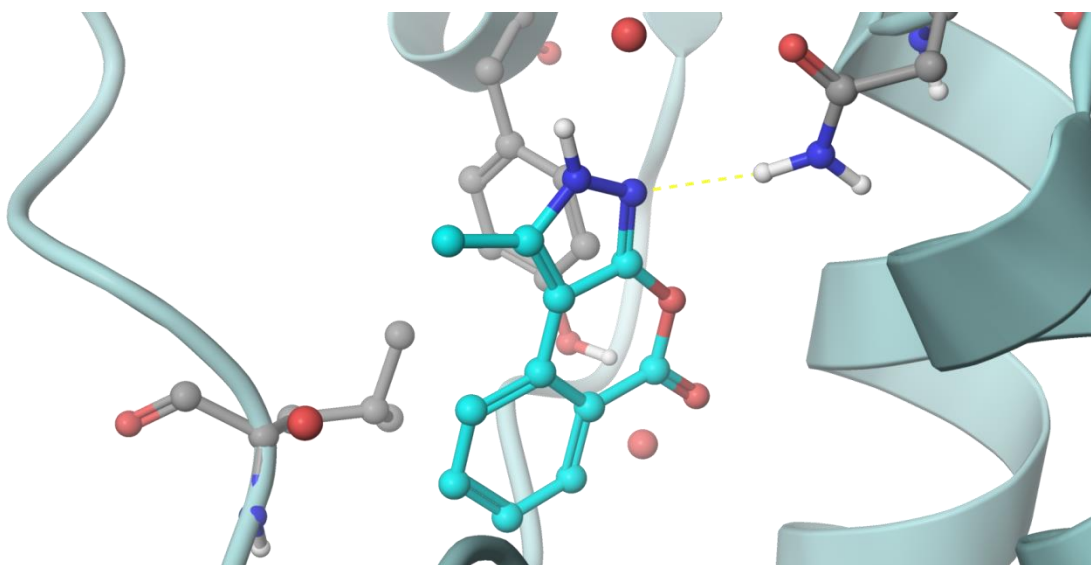
Εικόνα 8 Κρυσταλλογραφία του PFI-3 στο σημείο πρόσδεσης της PB1(5)

Πριν λίγους μήνες έγινε σύνθεση του παρακάτω ανάλογου του PFI-3 με ακόμη μεγαλύτερη δραστηριότητα.



Εικόνα 9 Ο αναστολέας του PB1A5 που προέκυψε από διαδικασία σχεδιασμού φαρμάκων από μόρια-θραύσματα (Gerstenberger et al,2016)

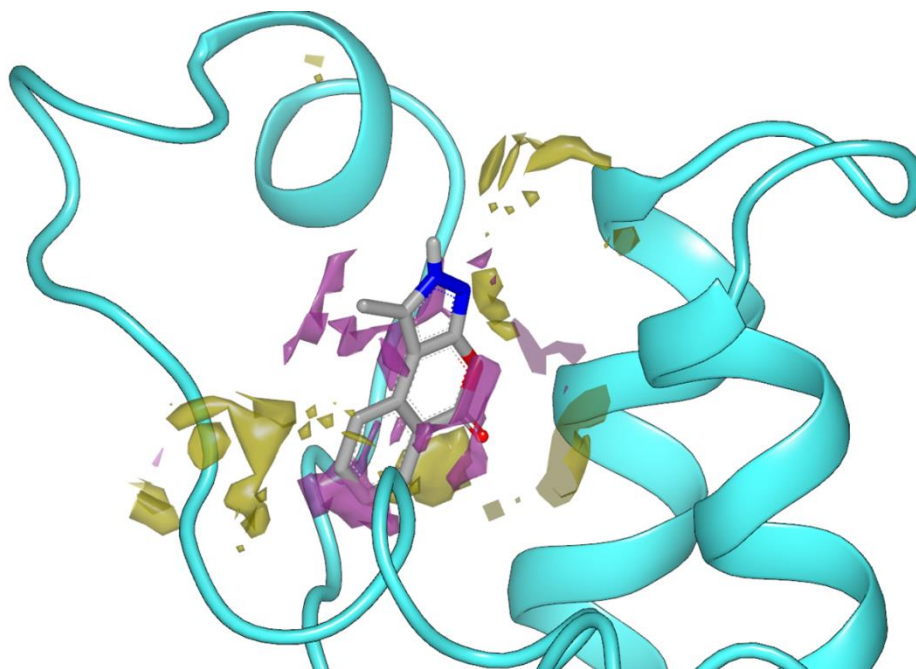
Στο εργαστήριό μας, έχει ξεκινήσει μία μελέτη για το PB1(5), η οποία μάλιστα κατέληξε και στην εύρεση ενός αναστολέα με K_d της τάξης του $1,4\mu\text{M}$ (Myrianthopoulos et al,2016). Αρχικά ανακαλύφθηκε μια ένωση οδηγός μετά από *in silico* αξιολόγηση της ψηφιακής βιβλιοθήκης της NCI, με 3 διαφορετικές μεθόδους (2D similarity, 3D similarity και docking), το 1-Methylisochromeno[3,4-c]pyrazol-5(2H)-one.



Εικόνα 10 Το 1-methylisochromeno[3,4-c]pyrazol-5(2H)-one στο ενεργό κέντρο της PB1(5) αλληλεπιδρά με την Asn707

Για τη βελτιστοποίηση της δράσης, εφόσον δεν υπήρχε κάποιο αμινοξύ κοντά στο σημείο πρόσδεσης του μορίου, με το οποίο θα μπορούσε να γίνει κάποιος δεσμός

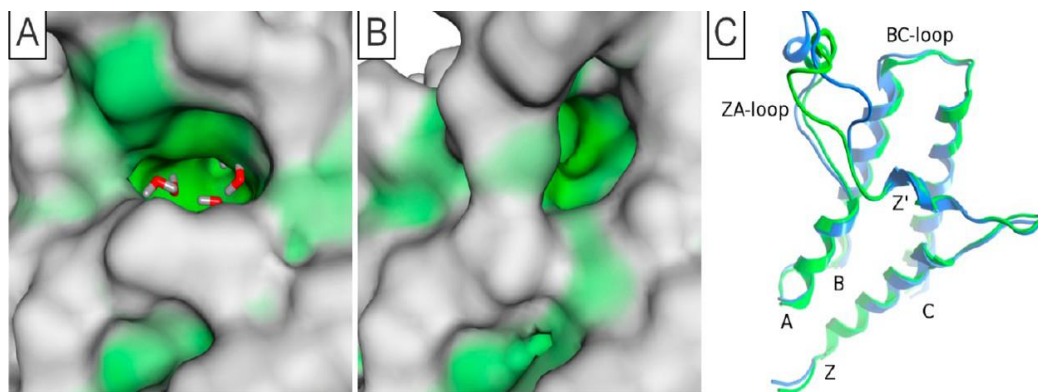
υδρογόνου έγινε ανάλυση της ενυδάτωσης της υδρόφοβης κοιλότητας με χρήση του αλγορίθμου SZMAP.



Εικόνα 11 Το αποτέλεσμα της μελέτης ενυδάτωσης τουSZMAPγια το 1-methylisochromeno [3,4-c]pyrazol-5-(2H)-one

Με βάση τα αποτελέσματα του SZMAP αποφασίστηκε η αντικατάσταση του μεθυλίου στο πυραζόλιο με μια βούτυλο-ομάδα, η οποία τελικά μας έδωσε το μόριο-αναστολέα.

Η ανάπτυξη αναστολέων για τα SMARCA 2/4 και τα PB1 θα ήταν χρήσιμη για τη μελέτη και την κατανόηση διαδικασιών που διαμεσολαβούνται μέσω του SWI/SNF συμπλέγματος, που παίζει σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες κυτταρικής διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού (Gerstenberger et al,2016). Μετά από έκθεση εμβρυακών βλαστοκυττάρων στο PFI-3, παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στη γονιδιακή έκφραση που είναι σημαντική για την κυτταρική διαφοροποίηση. Επιπροσθέτως, το PFI-3 επάγει βελτιωμένη διαφοροποίηση στα βλαστοκύτταρα τροφοβλαστών, υπονοώντας ότι τα SMARCA2/4 και το PB1(5) παίζουν σημαντικό ρόλο στην συντήρηση και τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων (Theodoulou, Humphreys et al, 2016).



Εικόνα 12 Η H-PB1(5) στη συνηθέστερη (A) και στην πιο ασυνήθιστη (B) διαμόρφωση στην οποία έχει κρυσταλλογραφηθεί. C: Υπόθεση των 2 διαμορφώσεων. Vidler L., Brown N., Knapp S., Hoelder S., (2012)

2. Η διαδικασία της ανακάλυψης φαρμάκων

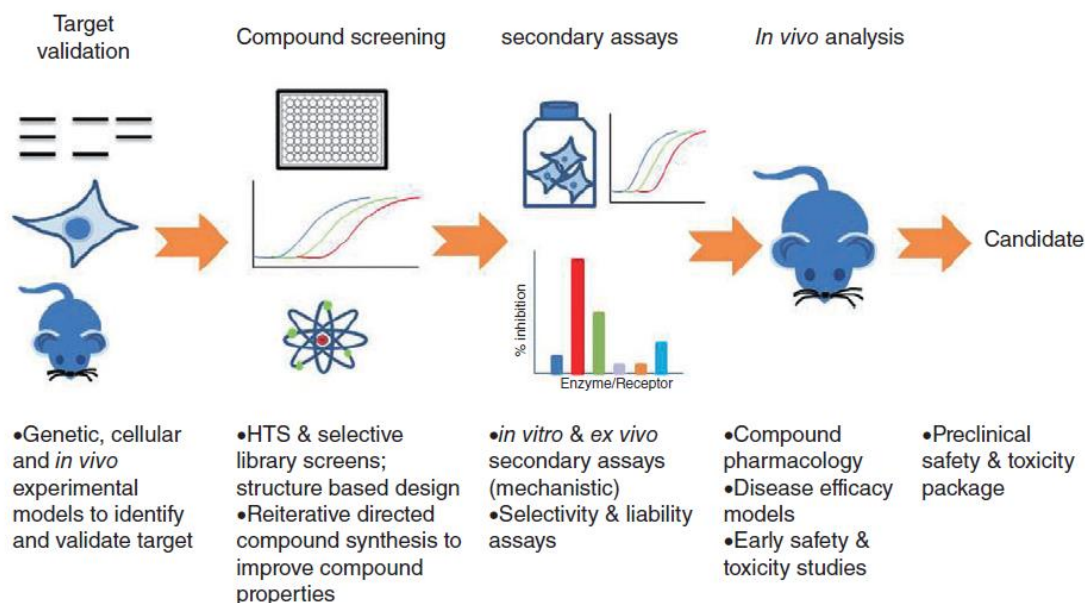
Η εξέλιξη της μοριακής βιολογίας μέσω της χρήσης νέων τεχνολογιών τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχουν επιφέρει μια τεράστια έκρηξη στο πεδίο της φαρμακοχημείας. Η αλληλούχιση του γονιδιώματος, η πρωτεωμική και η εξέλιξη της δομικής βιολογίας έφεραν στο φως πληθώρα πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε πολλά βιοχημικά μονοπάτια και κατά συνέπεια, νέους φαρμακολογικούς στόχους. Η ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου ξεκινά με την ταυτοποίηση ενός βιολογικού στόχου, ο οποίος συσχετίζεται σε μία συγκεκριμένη νόσο ή παθολογική κατάσταση. Η επικύρωση ενός φαρμακολογικού στόχου πρέπει να πραγματοποιείται σε μοριακό, σε κυτταρικό επίπεδο και τέλος και σε ζωικό μοντέλο. Πρόκληση αποτελεί σε αυτό το στάδιο ο σχεδιασμός των βιολογικών δοκιμασιών που είναι κατάλληλες για τον προσδιορισμό της βιοδραστικότητας του βιολογικού στόχου

Τη διαδικασία της επικύρωσης του φαρμακολογικού στόχου, ακολουθεί αλλά και συμπληρώνει η διαδικασία της εύρεσης του μορίου-οδηγού η οποία επιτελείται μέσω δοκιμασιών σάρωσης. Οι δοκιμασίες σάρωσης υψηλής αποτελεσματικότητας (high-throughput screening- HTS) μπορεί να περιλαμβάνουν τη σάρωση ολόκληρων βιβλιοθηκών μορίων στο μόριο-στόχο *in vitro* ή και σε πιο περίπλοκα συστήματα όπως είναι οι κυτταρικές σειρές, όπου βέβαια αναγκαία είναι τα επιπλέον τεστ ώστε να επιβεβαιωθεί το σημείο δράσης. Οι βιοφυσικές τεχνικές που επιστρατεύονται για τη διαδικασία του HTS χρησιμοποιούνται για την ανάλυση της πρόσδεσης ενός μικρού μορίου σε ένα μακρομόριο. Οι διαθέσιμες τεχνολογίες διαφέρουν αναφορικά με τη φυσική αρχή η οποία ανιχνεύει την πρόσδεση, την αποτελεσματικότητα, το

περιεχόμενο της πληροφορίας, τις απαιτήσεις του δείγματος, την ευαισθησία και την αξιοπιστία της μεθόδου (Renaud et al., 2016).

Η γνώση της δομής της πρωτεΐνης-στόχου ή και μορίων που έχουν δράση στο στόχο αποτελούν αφετηρίες για μελέτες μοριακής μοντελοποίησης και εικονικών σαρώσεων βιβλιοθηκών εναντίον του στόχου είτε τη σάρωση των βιβλιοθηκών με αλγορίθμους ομοιότητας με τους ήδη υπάρχοντες αναστολείς (Hughes et al., 2011). Πρόκληση για τους φαρμακοχημικούς είναι η ανακάλυψη και η συνθετική βελτιστοποίηση μορίων, τα οποία να μπορούν να επέμβουν στη λειτουργία πρωτεϊνών που είναι υπεύθυνες για παθολογικές καταστάσεις. Η απόδοση δομής και τρόπου πρόσδεσης μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ είναι απαραίτητη για να περάσει ένα μόριο στις επόμενες φάσεις ανάπτυξης, που περιλαμβάνουν τη σύνθεση αναλόγων της αρχικής ένωσης οδηγού με μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για το στόχο.

Τα τελευταία 20 χρόνια, σε αντίθεση με τη σάρωση βιβλιοθηκών με μόρια που διαθέτουν χαρακτηριστικά φαρμάκου, ολοένα και πιο δημοφιλής η τεχνική του σχεδιασμού φαρμάκων με μόρια θραύσματα (Fragment-based drug design-FBDD). Αυτή περιλαμβάνει την ανάπτυξη βιβλιοθηκών με μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, τα οποία περνούν από δοκιμασίες σάρωσης σε υψηλές συγκεντρώσεις και για την περαιτέρω βελτιστοποίηση της δράσης τους, κρίνεται απαραίτητη η απόκτηση κρυσταλλογραφικής δομής (Hughes et al., 2011).



Εικόνα 13 Επισκόπηση της διαδικασίας σάρωσης για την ανακάλυψη πιθανών φαρμακομορίων (Hughes et al., 2011)

2.1 Οι δοκιμασίες σάρωσης υψηλής αποτελεσματικότητας (HTS: High-Throughput Screening)

Το HTS αποτελεί μια διαδικασία ρουτίνας για την εύρεση ενώσεων-οδηγών στις φαρμακοβιομηχανίες, η οποία πλέον εφαρμόζεται με επιτυχία και στην ακαδημαϊκή κοινότητα. Οι νέες τεχνολογίες με τα ρομποτικά συστήματα που εκτελούν σαρώσεις-βιοχημικά τεστ σε εκατομμύρια μόρια ανά μέρα έδωσαν τη δυνατότητα στις μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες να δημιουργήσουν βιβλιοθήκες μορίων που βοήθησαν στην ανακάλυψη πολλών μορίων οδηγών για πρωτεΐνες-στόχους. Δυστυχώς σε νεότερους στόχους οι συγκεκριμένες βιβλιοθήκες δεν είχαν την ίδια επιτυχία (Erlanson et al., 2016). Ειδικότερα στην κατηγορία των στόχων όπου έχουμε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (PPIs), έχουμε hits με χαμηλή αποτελεσματικότητα και δυσκολία στην εύρεση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και αυτό γιατί στόχος σε αυτή την περίπτωση αποτελεί όχι μια πρωτεϊνική κοιλότητα, αλλά μία επιφάνεια (Scott et al., 2016). Τα bromodomains, να διευκρινιστεί σε αυτό το σημείο, πως αποτελούν μια ειδική κατηγορία PPI, όπου ένα πεπτίδιο με ένα τροποποιημένο αμινοξικό κατάλοιπο εξαιτίας μιας μετα-μεταφραστικής τροποποίησης αλληλεπιδρά εισερχόμενο στην συγκεκριμένη κοιλότητα πρόσδεσης που αυτά διαθέτουν.

Τα βιοχημικά πειράματα που χρησιμοποιούνται για τη σάρωση των βιβλιοθηκών θα πρέπει να είναι επαρκώς ευαίσθητα ώστε να ανιχνεύονται οι ασθενείς αλληλεπιδράσεις των μορίων-θραυσμάτων με τις πρωτεΐνες. Οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι θα πρέπει επίσης να είναι ισχυρές ώστε να αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα εξαιτίας παρεμβολής με την ανάγνωση της ανάλυσης. Το high-throughput screening εμπεριέχει τεχνικές βιοφυσικές και βιοχημικές καθώς και τεχνικές που πραγματοποιούνται σε κυτταρικές σειρές. Ο άμεσος προσδιορισμός φθορισμού είναι πιθανότατα η απλούστερη τεχνική που χρησιμοποιείται τόσο σε βιοχημικές όσο και σε κυτταρικά τεστ. Τέτοια τεστ είναι το FRET (Fluorescence Energy Transfer) και Alpha Screen (Janzen, 2014).

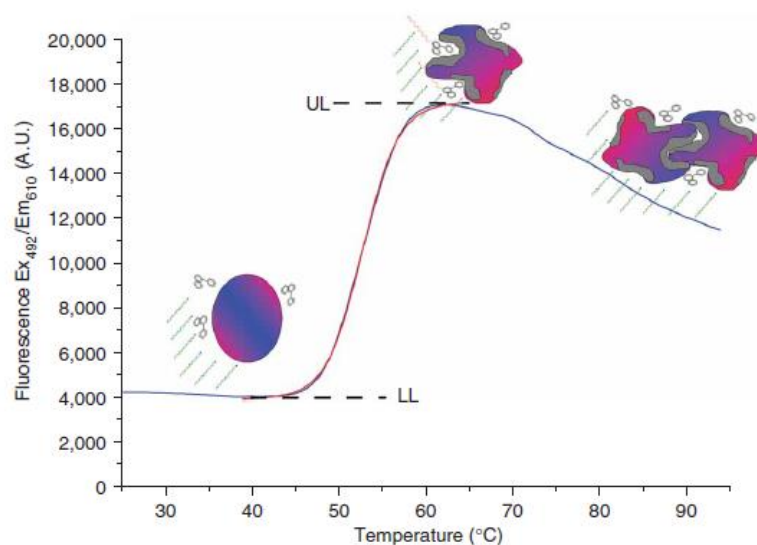
Κλασικές βιοφυσικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη σάρωση των μικρών μορίων είναι η φασματοσκοπία NMR, η συντονισμός πλασμονίου επιφανείας (SPR: Surface Plasmon Resonance), και η κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Επιπροσθέτως οι μέθοδοι θερμικής μετατόπισης όπως η φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης (DSF: Differential Scanning Fluorimetry) χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο λόγω του χαμηλού κόστους και χρόνου που χρειάζονται για την εκτέλεση του πειράματος (Erlanson et al., 2016). Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των τεχνικών που χρησιμοποιούνταν τόσο στον ακαδημαϊκό χώρο όσο και σε μεγάλες φαρμακοβιομηχανίες. Ορισμένα από αυτά χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα πτυχιακή.

2.1.1 Η φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης

Το συγκεκριμένο πείραμα παρακολουθεί τη μετουσίωση μιας πρωτεΐνης έπειτα από θέρμανση παρουσία μιας φθορίζουσας χρωστικής και συνήθως εκτελείται με τη βοήθεια ενός οργάνου real-time PCR. Η χρωστική που χρησιμοποιείται φθορίζει σε μη πολικό περιβάλλον όπως είναι τα υδρόφοβα αμινοξέα που αποκαλύπτονται καθώς μετουσιώνεται η πρωτεΐνη ενώ στο υδατικό περιβάλλον ο φθορισμός είναι ασθενής.

Η σταθερότητα μιας πρωτεΐνης σχετίζεται με την ελεύθερη ενέργεια κατά Gibbs της αποσταθεροποίησης ΔG_u της η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η σταθερότητα των περισσότερων πρωτεϊνών μειώνεται με τη θερμοκρασία και μηδενίζεται στο σημείο ισορροπίας όπου η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην αναδιπλωμένη και μη αναδιπλωμένη μορφή της είναι ίδια. Στο σημείο αυτό η θερμοκρασία ορίζεται ως

θερμοκρασίας τήξης (T_m). Αν η πρωτεΐνη χάσει την αναδιπλωμένη της μορφή με έναν αντιστρεπτό τρόπο δύο σταδίων τότε θα μπορεί να εφαρμοστεί το μοντέλο θερμοδυναμικής ισορροπίας. Εάν ένα μόριο προσδένεται σε μια πρωτεΐνη η συνεισφορά σε ελεύθερη ενέργεια εξαιτίας της πρόσδεσης, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα αύξηση στη ΔG_u η οποία με τη σειρά της προκαλεί αύξηση στην T_m . Η σταθεροποίηση που προκαλείται στις πρωτεΐνες εξαιτίας των μικρών μορίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους και της συγγένειας πρόσδεσης.



Εικόνα 14 Τυπικό διάγραμμα της έντασης του φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία για την αναδίπλωση της πρωτεΐνης παρουσία του SYPRO orange. Η χρωστική συμβολίζεται ως ένα μόριο αποτελούμενο από 3 δακτυλίους. Παρουσία της σφαιρικής μορφής της πρωτεΐνης (βάση της καμπύλης) παρατηρείται μια βασική ένταση φθορισμού στα 492nm (πράσινα βέλη). Κατά την αναδίπλωση της πρωτεΐνης τα υδρόφοβα κομμάτια (γκρι κομμάτια) εκτίθενται και στα 610nm εκπέμπεται ακτινοβολία φθορισμού (πορτοκαλί βέλη) από τα μόρια της χρωστικής που αλληλεπιδρούν με τα υδρόφοβα κομμάτια. Μετά το μέγιστο, ακολουθεί μια σταδιακή μείωση της έντασης, η οποία εξηγείται από το γεγονός ότι η πρωτεΐνη καθιζάνει και δημιουργεί συσσωματώματα (H Niesen et al., 2007).

Στο συγκεκριμένο πείραμα, η ένταση του φθορισμού συναρτάται με τη θερμοκρασία. Κατά αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια σιγμοειδής καμπύλη, η οποία μπορεί να περιγραφεί από μια μεταβατική κατάσταση δύο καταστάσεων.

2.1.2 Σάρωση μέσω φασματοσκοπίας NMR

Η φασματοσκοπία NMR ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για τη σάρωση μορίων-θραυσμάτων και αποτελεί μία από τις συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Τα πειράματα NMR που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη σύνδεσης των μικρών μορίων με πρωτεΐνες διακρίνονται σε πειράματα στα οποία παρατηρείς κορυφές που ανήκουν στην πρωτεΐνη (protein observed) και σε πειράματα που παρακολουθείς κορυφές που ανήκουν στο μικρό μόριο (ligand observed) (Erlanson et al., 2016).

2.1.2a Μέθοδοι παρατήρησης της πρωτεΐνης

Στα πειράματα της πρώτης κατηγορίας η σύνδεση του μικρού μορίου ανιχνεύεται από τις χημικές μετατοπίσεις στην επισημασμένη πρωτεΐνη-στόχο. Συνήθως λαμβάνονται φάσματα ^1H - ^{15}N -HSQC και τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται η πιο ευαίσθητη μέθοδος ^1H - ^{13}C HMQC. Η παλμική ακολουθία του HSQC έχει υποστεί βελτιστοποιήσεις για την ανίχνευση σημάτων σε μεγαλύτερες πρωτεΐνες και η μέθοδος καλείται TROSY. Αυτά τα 2D πειράματα παρέχουν ένα «δακτυλικό αποτύπωμα» του πρωτεϊνικού στόχου και οι συντονισμοί είναι πολύ ευαίσθητοι σε αλλαγές σε pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση αλάτων ή στην πρόσδεση με το μικρό μόριο (Joseph-McCarthy et al., 2014). Η τιτλοδότηση με τον πιθανό προσδέτη μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη σταθερά διάστασης K_D της αλληλεπίδρασης και η αντιστοίχιση των κορυφών συντονισμών μπορεί να φανερώσει τα αμινοξικά κατάλοιπα με τα οποία αλληλεπιδρά το μικρό μόριο. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή και ως SAR-by-NMR. Η συγκεκριμένη τεχνική πλεονεκτεί στην ευαισθησία και στην εγκυρότητα αλλά μειονεκτεί ως προς το γεγονός ότι απαιτεί μεγάλη ποσότητα επισημασμένης με ^{15}N και/ή ^{13}C πρωτεΐνης και επίσης στο ότι εφαρμόζεται με μεγαλύτερη επιτυχία σε πρωτεΐνες με μοριακό βάρος μικρότερο των 50 kDa (Erlanson et al., 2016).

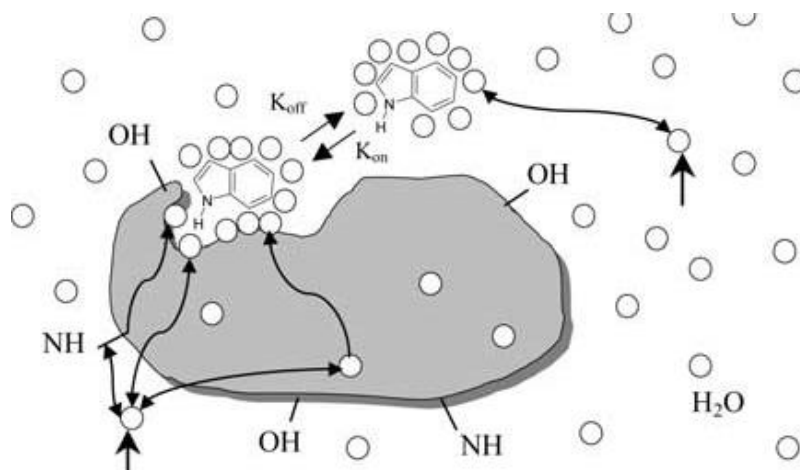
2.1.2β Πειράματα παρατήρησης των μικρών μορίων

Οι συγκεκριμένες μέθοδοι, οι οποίες επικεντρώνονται στις αλλαγές στα φάσματα των μικρών μορίων, αποτελούν δημοφιλείς τακτικές. Υπερτερούν στο ότι δε χρειάζεται επισημασμένη πρωτεΐνη, δεν υπάρχει περιορισμός ως προς το μέγεθος της πρωτεΐνης και στο ότι μπορούν να ανιχνεύσουν την πρόσδεση σε μικρές συγκεντρώσεις

πρωτεΐνης, (Peng et al., 2016). Ο στόχος των προσπαθειών αυτών είναι η ταυτοποίηση συγκεκριμένων προσδετών για ένα φαρμακολογικό στόχο και η χρήση αυτών ως σημεία έναρξης για βελτιστοποίηση μέσω συνθετικής χημείας, η αποκάλυψη κοιλοτήτων σε πρωτεΐνες-στόχους όπου μπορεί να αλληλεπιδράσει κάποιο φαρμακομόριο ή, τέλος, η χαρτογράφηση του διαθέσιμου χώρου αλληλεπίδρασης (Peng et al., 2016). Οι δύο δημοφιλέστερες τεχνικές είναι το Saturation Transfer Difference (STD) και Water-LOGSY (Water-Ligand Observed via Gradient SpectroscopY). Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στο φαινόμενο της σύζευξης διπόλου-διπόλου όπως επίσης και στο NOE. Το φαινόμενο NOE (Nuclear Overhauser Effect) ορίζεται ως η αλλαγή στην ένταση του συντονισμού ενός πυρήνα όταν οι μεταβάσεις του spin στον συντονισμό ενός άλλου πυρήνα διαταράσσονται από τους πληθυσμούς σε ισορροπία. Μέσω αυτού του φαινομένου είναι δυνατή η διευκρίνιση τρισδιάστατων χαρακτηριστικών και στερεοχημείας στο NMR, σε συνδυασμό με πληροφορίες από το spin coupling. (Viegas et al., 2011). Όταν χρησιμοποιούνται πειράματα στα οποία ανιχνεύονται πρωτόνια σε αρχικού σταδίου δοκιμασίες σάρωσης συνήθως τα μικρά μόρια σαρώνονται σε δείγματα ανά 6-12 μόρια, τα οποία επιλέγονται με γνώμονα να μην υπάρχει αλληλεπικάλυψη μεταξύ των κορυφών και να μην αντιδρούν μεταξύ τους (Peng et al., 2016).

Water-LOGSY

Στο συγκεκριμένο πείραμα η μαγνήτιση στον κύριο όγκο του νερού μεταφέρεται μερικώς μέσω του συμπλέγματος πρωτεΐνης-μικρού μορίου στο ελεύθερο μικρό μόριο κατά τρόπο εκλεκτικό. Σε αυτό το πείραμα οι συντονισμοί των μορίων που δεν προσδένονται στο φαρμακολογικό στόχο εμφανίζονται με αντίθετο σήμα και τείνουν να είναι ασθενέστεροι σε σύγκριση με τα σήματα των μορίων που αλληλεπιδρούν.



Εικόνα 15 Η αρχή λειτουργίας του WaterLOGSY. Η πρωτεΐνη αναπαρίσταται με τις κοιλότητες της και το ενεργό σημείο πρόσδεσης. Ο προσδέτης φαίνεται τόσο στην προσδεσμένη κατάσταση. Η διέγερση των μορίων του νερού (αναπαρίστανται με κύκλους) φαίνεται στην εικόνα με ένα συνεχές βέλος ενώ με βέλη απεικονίζεται και η μεταφορά της μαγνήτισης (Dalvit et al., 2001).

Στην απλούστερη εκδοχή του, το πείραμα αρχίζει με εκλεκτική διέγερση των μορίων του νερού, πράγμα για το οποίο υπάρχουν διάφορες τεχνικές. Ιδιαίτερη σημασία έχει για τα πειράματα αυτά ο χρόνος ανάμιξης, ο οποίος εξαρτάται από το μέγεθος του συμπλέγματος. Κατά τη διάρκεια αυτού, η μαγνήτιση του νερού η οποία έχει μεταφερθεί στην πρωτεΐνη, μεταφέρεται είτε άμεσα, είτε έμμεσα στον προσδέτη. Για μεγάλες πρωτεΐνες όταν γίνεται έμμεση μετάδοση του σήματος, η διαδικασία καλείται «διάχυση του spin» και είναι εξαιρετικά γρήγορη και σε αυτές τις περιπτώσεις ακόμη και οι μικροί χρόνοι ανάμιξης αρκούν για να μεταφερθεί η μαγνήτιση σε ολόκληρη την πρωτεΐνη. Το πείραμα δεν περιορίζεται μόνο στην ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων μικρών μορίων με πρωτεΐνες αλλά και με μακρομόρια όπως είναι το DNA ή το RNA. Μειονέκτημα της μεθόδου θα μπορούσε να αποτελέσει η αδυναμία της να ανιχνεύσει αλληλεπιδράσεις μεταξύ προσδετών με υψηλή συγγένεια για το βιολογικό στόχο εξαιτίας των αργών ρυθμών διάστασης και της περίσσειας του προσδέτη στο διάλυμα. Η ανίχνευση προσδετών με K_D της τάξης των 100nM καθίσταται δυνατή (Dalvit et al., 2001).

STD-NMR : Φάσματα διαφοράς με μεταφορά Κορεσμού(Saturated Transfer Difference- 1H STD-NMR)

Το πείραμα STD-NMR βασίζεται στο φαινόμενο NOE και στην παρατήρηση των σημάτων συντονισμού του προσδέτη. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια τεχνική σάρωσης για την ταυτοποίηση μορίων-οδηγών ή σαν ένα εργαλείο χρήσιμο για τον

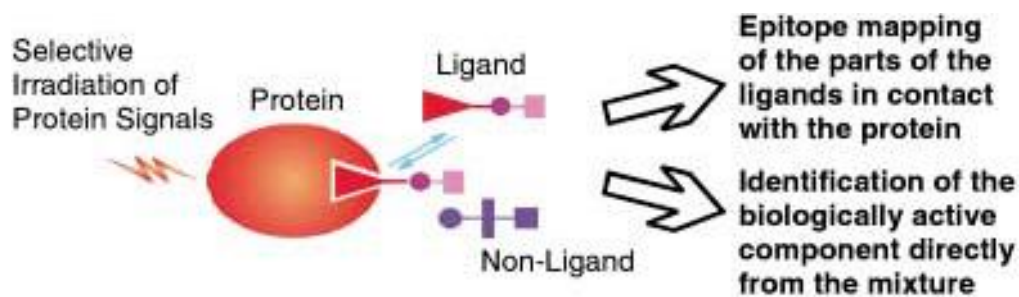
προσδιορισμό των ομάδων του προσδέτη που είναι καθοριστικές για την πρόσδεση. Ο όρος «επίτοπος πρόσδεσης- binding epitope» χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία που αφορά το συγκεκριμένο πείραμα για να χαρακτηρίσει τα υδρογόνα του μικρού μορίου που προσεγγίζουν την πρωτεΐνη κατά την πρόσδεση (Viegas et al., 2011).

Φασματοσκοπικά το πείραμα STD-NMR είναι ιδιαίτερα απλό. Σε ένα δείγμα που περιλαμβάνει τον πρωτεϊνικό στόχο (μακρομόριο μεγαλύτερο από 15kDa) σε χαμηλές συγκεντρώσεις ($10^{-7} - 10^{-8}$ M) και σε μεγάλη περίσσεια (από 1:10 έως και 1:1000) μια συλλογή από μικρά μόρια προς έλεγχο, καταγράφονται δύο πειράματα.

1. Ένα πείραμα ^1H NMR σε συνθήκες θερμικής ισορροπίας το οποίο καλείται φάσμα αναφοράς ή αλλιώς πείραμα off resonance. Στο συγκεκριμένο πείραμα, η συχνότητα ακτινοβολίας ρυθμίζεται σε μία τιμή εκτός της περιοχής των σημάτων συντονισμού των διαφόρων πρωτονίων (περίπου στα 40 ppm), όπου και λαμβάνεται ένα φάσμα 1D NMR του μίγματος (Meyer and Peters, 2003).
2. Ένα δεύτερο πείραμα ^1H NMR, το πείραμα on resonance, όπου κάποια πρωτόνια της πρωτεΐνης-στόχου ακτινοβολούνται εκλεκτικά σε συχνότητες χαμηλής έντασης (για μαγνήτη των 500MHz η συχνότητα των -1.5 ppm αποτελεί συνήθως καλή επιλογή) για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (χρόνος κορεσμού- saturation time), το οποίο μπορεί να ποικίλει συνήθως εντός του εύρους των δευτερολέπτων (Angulo and Nieto, 2011).

Η αφαίρεση του φάσματος on resonance από το off resonance φάσμα, οδηγεί στη λήψη ενός φάσματος διαφοράς (Meyer and Peters, 2003) στο οποίο οι κορυφές των πρωτονίων του μορίου που αλληλεπιδρά έχουν εντάσεις $I_{\text{STD}} = I_0 - I_{\text{sat}}$. Εφόσον οι συνθήκες ακτινοβολίας έχουν επιλεγεί σωστά, καθίσταται δυνατός ο κορεσμός μόνο των πρωτονίων του μακρομορίου και όχι του προσδέτη. Σε αυτή την περίπτωση, εάν πραγματοποιηθεί η πρόσδεση, ο κορεσμός από τα πρωτόνια του μακρομορίου θα μεταφερθεί στα πρωτόνια του μικρού μορίου τα οποία βρίσκονται κοντά στο χώρο με την πρωτεΐνη στην προσδεδεμένη κατάσταση.

Σε αυτή την κατάσταση, η περιστροφή του μικρού μορίου γύρω από τους άξονες του καθορίζεται από την περιστροφή της πρωτεΐνης. Επομένως, η μεταφορά του κορεσμού στο πείραμα on resonance οδηγεί σε μια σημαντική μείωση της έντασης του σήματος των κορυφών του μικρού μορίου εφόσον ο χρόνος συσχέτισης τ_c είναι μεγάλος.



Εικόνα 16 Αναπαράσταση της φασματοσκοπίας STD NMR. Όταν τα πρωτόνια σε μια πρωτεΐνη κορεστούν, τα μικρά μόρια που ανταλλάσσονται μεταξύ της προσδεδεμένης και της ελεύθερης κατάστασης στο διάλυμα υφίστανται επίσης κορεσμό. Μέσω αυτής της ανταλλαγής ο κορεσμός μεταφέρεται στο διάλυμα όπου και τελικά ανιχνεύεται. Με αφαίρεση αυτού του φάσματος από το φάσμα, χωρίς την ακτινοβολία της πρωτεΐνης, παραλαμβάνεται ένα φάσμα NMR, στο οποίο τα μόνα ορατά σήματα προέρχονται από μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη. Οι κορυφές από μόρια τα οποία δεν αλληλεπιδρούν δεν εμφανίζονται στο φάσμα διαφοράς. Η πρωτεΐνη υφίσταται κορεσμό από έναν εκλεκτικό για αυτήν παλμό. Η διάρκεια του χρόνου κορεσμού συνήθως ποικίλει από 1 έως 2 s. Το μικρό μόριο συνήθως χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 100 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της πρωτεΐνης, επιτρέποντας τη χρήση συγκέντρωσης της τάξης των μΜ αναφορικά με την πρωτεΐνη (Meyer and Peters, 2003).

Ο κορεσμός της πρωτεΐνης και του μορίου-προσδέτη είναι πολύ γρήγορος (περίπου χρειάζεται 100 ms). Επομένως ο γρήγορος ρυθμός αποσύνδεσης του μικρού μορίου μεταφέρει την πληροφορία του κορεσμού γρήγορα στο μόριο που βρίσκεται στο κυρίως διάλυμα. Εάν το πείραμα διεξάγεται υπό συνθήκες περισσειας του μικρού μορίου, πολλά τέτοια μόρια θα μπορούσαν να οδηγηθούν σε κορεσμό από ένα μόνο σημείο πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα. Οι προσδέτες χάνουν την πληροφορία σχετικά με τον κορεσμό μέσω T1/T2 αποδιέγερσης, η οποία είναι της τάξης του ενός δευτερολέπτου για μικρά μόρια. Επομένως η αναλογία των κορεσμένων μορίων στο διάλυμα αυξάνεται κατά το χρόνο κορεσμού και επομένως η πληροφορία σχετικά με την προσδεδεμένη κατάσταση λόγω του κορεσμού της πρωτεΐνης ενισχύεται. Πρακτικά αυτό μεταφράζεται ως εξής: μια σχετικά μικρή ποσότητα πρωτεΐνης μας αρκεί για την εκτέλεση του συγκεκριμένου πειράματος (Meyer and Peters, 2003).

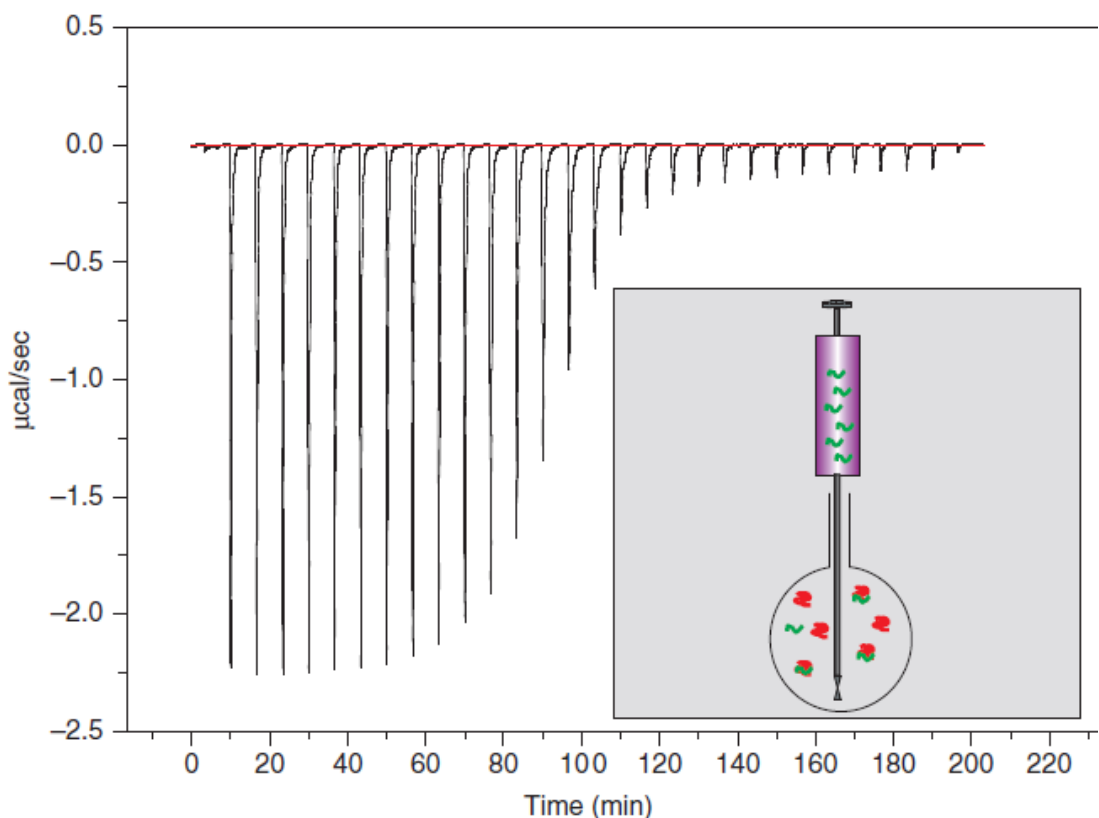
Επίσης ποιοτικά μπορεί να υποτεθεί πως όσο ισχυρότερη είναι η ένταση της κορυφής ενός πρωτονίου ενός προσδέτη στο STD NMR φάσμα, τόσο μικρότερη είναι και η απόσταση μεταξύ του συγκεκριμένου πρωτονίου και του σημείου πρόσδεσης. Προκειμένου να αποκτηθεί μια αρχική εκτίμηση για το πώς προσδένεται το μικρό μόριο στην πρωτεΐνη, συγκρίνεται ο επί τοις εκατό σχετικός κορεσμός που λαμβάνεται από τα διάφορα πρωτόνια του μορίου. Αυτό γίνεται μέσω κανονικοποίησης όλων των μετρούμενων εντάσεων ($I_0 - I_{sat}/I_0$) με την ισχυρότερη ένταση, η οποία αυθαίρετα θεωρείται ως το 100%. Κατά αυτόν τον τρόπο οι επι τοις εκατό τιμές που προκύπτουν αποτελούν κατά κάποιο τρόπο ένα χάρτη των αλληλεπιδράσεων μικρού μορίου-

πρωτεΐνης, ο οποίος φανερώνει ποιες χημικές ομάδες του μορίου παίζουν ρόλο στη σύνδεση με τον υποδοχέα (Angulo and Nieto, 2011).

2.1.3 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC-Isothermal Titration Calorimetry)

Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει τη μέτρηση της μεταβολής της ενθαλπίας κατά τη διάρκεια μιας αλληλεπίδρασης σε μια σταθερή θερμοκρασία και πίεση. Η συγκεκριμένη μέθοδος πρέπει να τονίσουμε πως δεν είναι μέθοδος υψηλής απόδοσης, ωστόσο είναι μία από τις πλέον απαραίτητες βιοφυσικές δοκιμασίες, καθώς από αυτήν εξάγουμε το θερμοδυναμικό προφίλ της αλληλεπίδρασης του μορίου με την πρωτεΐνη-στόχο.

Η μέτρηση πραγματοποιείται καθώς το ένα συστατικό της αντίδρασης προστίθεται στο άλλο σε ενέσεις ίδιου όγκου. Οι συγκεντρώσεις των συστατικών που συμμετέχουν στην αντίδραση συνήθως ρυθμίζονται έτσι ώστε να διασφαλιστεί πως όλα τα σημεία πρόσδεσης υπόκεινται σε κορεσμό. Η μεταβολή της θερμότητας κατά την αλληλεπίδραση επομένως (είτε αυτή είναι εξώθερμη είτε είναι ενδόθερμη) αποτελεί έναν ανιχνευτή της ποσότητας του μικρού μορίου που προσδένεται στην πρωτεΐνη σε κάθε ένεση, καθώς η ποσότητα θερμότητας (q_i) είναι ανάλογη της ποσότητας του μορίου που προστίθεται σε κάθε ένεση ($v \times \Delta L$) και της χαρακτηριστικής για κάθε αντίδραση ενθαλπίας ΔH σύμφωνα με την εξίσωση $q_i = v \times \Delta H \times \Delta L_i$, όπου v ο όγκος του κελιού όπου πραγματοποιείται η αντίδραση και ΔL_i η αύξηση στη συγκέντρωση του προσδεδεμένου μορίου μετά από την i ένεση. Καθώς τα περισσότερα σύγχρονα μηχανήματα λειτουργούν με βάση την αρχή της αποκατάστασης της θερμικής ισορροπίας το μετρούμενο σήμα είναι η ποσότητα ενέργειας (εκφρασμένη σε microcalories ανά δευτερόλεπτο) που χρειάζονται για να διατηρηθεί σταθερή η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του κελιού όπου γίνεται η αντίδραση και του κελιού αναφοράς. Η θερμότητα μετά από κάθε ένεση υπολογίζεται από το εμβαδόν της περιοχής κάτω από κάθε κορυφή. Επειδή το ποσό της ελεύθερης πρωτεΐνης σταδιακά μειώνεται μετά από κάθε ένεση, το μέγεθος των κορυφών σταδιακά μειώνεται μέχρι να επιτευχθεί κορεσμός (Leavitt and Freire, 2001).



Current Opinion in Structural Biology

Εικόνα 17 Τυπικό πείραμα ITC. Το πείραμα που απεικονίζεται αντιστοιχεί στην τιτλοδότηση του πεπτιδίου της φωσφοτυροσίνης με τον SH2 επίτοπο του Lck. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε 10 mM HEPES, pH=7.5 στους 15°C. [SH2]=81μM και [πεπτιδίου]=0.4mM. Έπειτα από ανάλυση των δεδομένων, βρέθηκε $K_d = 5.8 \times 10^{-6} M^{-1}$ και $\Delta H = -13.5 \text{ kcal/mol}$. Το ένθετο παρουσιάζει τη δομή του κελιού του μηχανήματος ITC. Ο όγκος του κελιού είναι 1,4mL και πληρώνεται με το διάλυμα της πρωτεΐνης (κόκκινο). Η σύριγγα ένεσης, η οποία περιστρέφει το διάλυμα ώστε να εξασφαλίσει την ομαλή ανάμιξη, η πληρώνεται με το διάλυμα του μικρού μορίου (πράσινο). Σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, ένας μικρός όγκος (συνήθως 10μL) του διαλύματος του μορίου ενίονται στο κελί και έτσι προκύπτουν τα χαρακτηριστικά αποτελέσματα της έκλυσης θερμότητας. Όταν η πρωτεΐνη κορεστεί τα αποτελέσματα της παραγωγής θερμότητας προκύπτουν από τη διαλυτοποίηση του πεπτιδίου και επίσης τα μηχανικά αποτελέσματα προκύπτουν από τη διαλυτοποίηση του πεπτιδίου και από τα μηχανικά αποτελέσματα που σχετίζονται με την ένεση. Αυτά τα αποτελέσματα χρειάζεται να αφαιρεθούν πριν γίνει η θερμοδυναμική ανάλυση. Στο ITC, η ποσότητα που μετράται και φαίνεται στον άξονα y αποτελεί χρονική εξάρτηση της ηλεκτρικής ενέργειας (μcal/sec), η οποία είναι απαραίτητη για να διατηρήσει σταθερή τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ της αντίδρασης και του κελιού αναφοράς μετά από κάθε ένεση αντιδραστήριου. Η περιοχή κάτω από κάθε κορυφή αντιστοιχίζεται στη θερμότητα (εκφρασμένη σε microcalories) η οποία σχετίζεται με αυτή τη διαδικασία (Ladbury, 2001).

Κατά αυτόν τον τρόπο, τόσο η αναλογία μεταξύ προσδεδεμένων και ελεύθερων συστατικών, όσο και η σταθερά πρόσδεσης (K_D) μπορούν να προσδιοριστούν. Έχοντας προσδιορίσει την K_D σε μια δεδομένη θερμοκρασία πειράματος, η ελεύθερη ενέργεια μπορεί να προσδιοριστεί κάνοντας χρήση της εξίσωσης $\Delta G_0 = -RT \ln K_D$

Επιπλέον, γνωρίζοντας το ΔG_0 αλλά και τη μεταβολή της ενθαλπίας ΔH η εντροπία της αντίδρασης μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

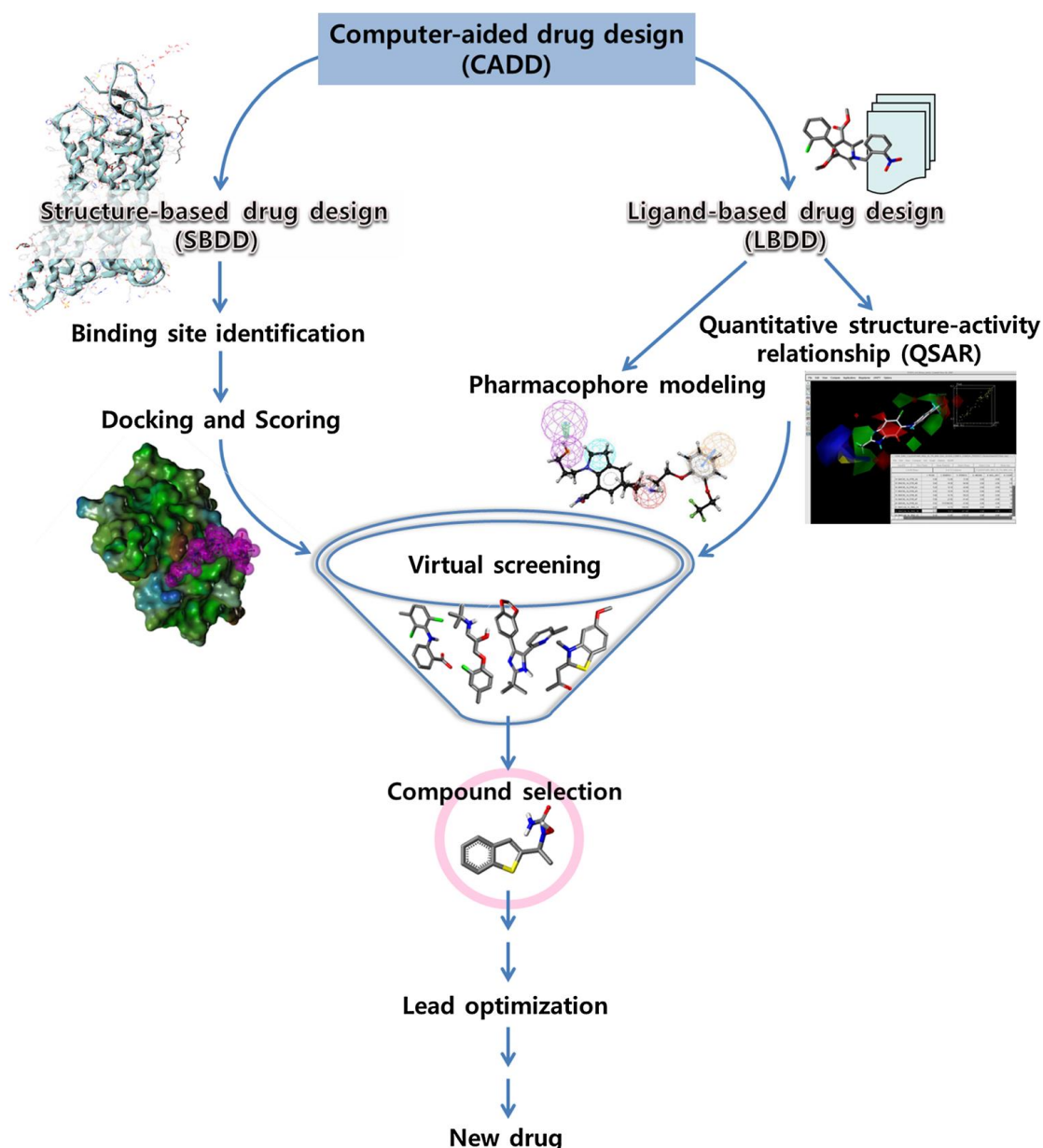
Επομένως από ένα μόνο πείραμα, ένα πλήρης θερμοδυναμικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης σε μία δεδομένη θερμοκρασία μπορεί να ληφθεί (Ladbury, 2001).

Σχετικά με τη χρήση της μεθόδου στη μέθοδο του σχεδιασμού φαρμάκων με χρήση μορίων-θραυσμάτων, αναφέρεται πως υπάρχουν λίγα παραδείγματα στη βιβλιογραφία της χρήσης του ITC ως κύρια μέθοδο εύρεσης μορίων-οδηγών. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να σαρώσει πολλά μόρια παράλληλα αλλά και γιατί οι αλληλεπιδράσεις που προκύπτουν από τα μικρά αυτά μόρια είναι πολύ ασθενείς και επομένως οι σταθερές πρόσδεσης δεν μπορούν να προσδιοριστούν με αξιοπιστία. Αντιθέτως η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί με μεγαλύτερη ασφάλεια στο στάδιο της βελτιστοποίησης (Renaud et al., 2016).

2.2 Ο σχεδιασμός φαρμάκων με in silico μεθόδους

Η ενσωμάτωση των in silico υπολογιστικών μεθοδολογιών πέρα του ότι παρέχει την κατανόηση της περίπλοκης φύσης των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, αποτελεί και ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία για τη γρήγορη αξιολόγηση μεγάλων ψηφιακών χημικών βιβλιοθηκών. Ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τη δομή (Structure based drug design-SBDD) με μεθόδους όπως είναι οι μοριακές μελέτες πρόσδεσης (Molecular Docking, Structure based Virtual Screening) και η Μοριακή Δυναμική (Molecular Dynamics-MD) είναι ανάμεσα στις συχνότερα χρησιμοποιούμενες στρατηγικές εξαιτίας του ευρέος φάσματος εφαρμογών στην ανάλυση των φαινομένων μοριακής αναγνώρισης όπως είναι η ενέργεια πρόσδεσης, οι διαμοριακές αλλαγές και οι επαγόμενες διαμορφωτικές αλλαγές. Υπάρχουν και οι μέθοδοι σχεδιασμού φαρμάκου με βάση το μόριο-προσδέτη όπως είναι οι τεχνικές εικονικής σάρωσης με βάση αυτό (Ligand based Virtual screening), οι τεχνικές εύρεσης ομοιότητας, η μοντελοποίηση σχέσεων δομής δράσης (QSAR modelling) και η εύρεση φαρμακοφόρου (Ferreira et al., 2015). Οι τεχνικές εικονικής σάρωσης αποτελούν σημαντικό εργαλείο για την εξερεύνηση του ποσοστού εκείνου των χημικών δομών που έχει βιολογική δράση. Το σύνολο των πιθανών χημικών δομών που μπορεί να προκύψει, είναι άλλωστε αχανές και υπολογίζεται πως 10^{63} είναι ο αριθμός των πιθανών φαρμακομορίων (Erlanson et al., 2016). Σε αντίθεση με το HTS, γίνεται δυνατή η επεξεργασία μεγάλων βιβλιοθηκών (συνήθως βιβλιοθηκών μεγαλύτερων από αυτές που επεξεργάζεται κανείς με HTS) και οποιουδήποτε στόχου για τον οποίο είναι

διαθέσιμη μια κρυσταλλογραφική δομή(Shoichet, 2004). Αλγόριθμοι όπως είναι αυτοί των προγραμμάτων DOCK, GOLD, Flex, Glide ή Autodock αποτελούν ορισμένους από τους δημοφιλέστερους αλγορίθμους για εικονικές σαρώσεις. Όλα αυτά τα εργαλεία έχουν μικρές διαφορές το ένα από το άλλο, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν τη δυνατότητα ευκαμψίας του μικρού μορίου ή του υποδοχέα ή την επιβολή περιορισμών στον αλγόριθμο της πρόσδεσης αναφορικά με συγκεκριμένες διαμορφώσεις(Klebe, 2006). Η κατάταξη των μορίων μιας βιβλιοθήκης αναφορικά με τη θεωρητική τιμή της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης προκύπτει από μία συνάρτηση βαθμονόμησης. Ωστόσο όλοι οι αλγόριθμοι των μελετών πρόσδεσης απέχουν πολύ από το ιδανικό και δεν μπορούν να υποκαταστήσουν την πειραματική διαδικασία.

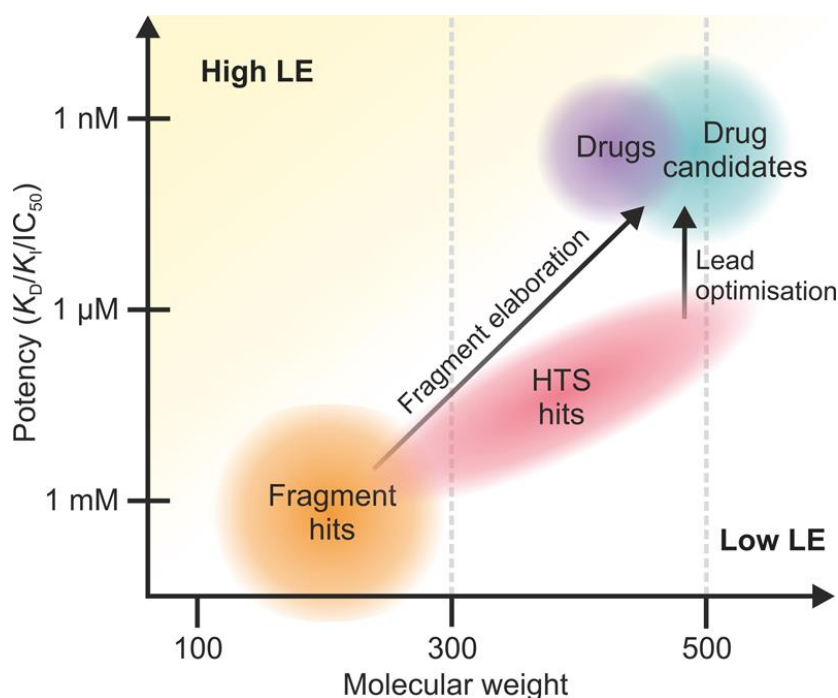


Εικόνα 18 Αντιπροσωπευτικό διάγραμμα ροής για τη διαδικασία του σχεδιασμού φαρμάκων με χρήση υπολογιστικών τεχνικών (Macalino et al., 2015).

2.3 Ο σχεδιασμός φαρμάκων με χρήση μορίων-θραυσμάτων

Ο σχεδιασμός φαρμάκων με τη χρήση μορίων-θραυσμάτων αποτελεί μια τεχνική που αναπτύχθηκε πριν μια 20ετία και τα τελευταία 10 δέκα χρόνια αποτελεί απαραίτητο όπλο στη φαρέτρα των φαρμακοχημικών. Η προσέγγιση που υιοθετεί η συγκεκριμένη τεχνική προτείνει αντί για τη χρήση εκατομμυρίων μορίων με μεγάλο μοριακό βάρος και drug-like χαρακτηριστικά, τη χρήση μικρών συλλογών με μόρια χαμηλού μοριακού βάρους. Τα μόρια θραύσματα ορίζονται ως μόρια με λιγότερα από 20 «βαριά» άτομα, δηλαδή άτομα, διάφορα του υδρογόνου. Αυτό το γεγονός καθιστά τις συλλογές με

τέτοιου είδους μόρια μικρότερες και επομένως ευκολότερα διαχειρίσιμες. Απόδειξη για το μικρό μέγεθος των συλλογών αυτών αποτελεί η δουλειά των Raymond et al, οι οποίοι υπολογιστικά απαρίθμησαν όλα τα πιθανά μόρια που μπορούν να προκύψουν από τους συνδυασμούς ατόμων άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου, φθορίου, χλωρίου, βρωμίου και ιωδίου. Ο αριθμός των μορίων που υπολόγισαν ήταν 166 εκατομμύρια μόρια με 17 το πολύ «βαριά» (Raymond et al., 2006), ένας αριθμός σαφώς μικρότερος από το 10^{63} που αναφέρθηκε πιο πάνω. Επιπλέον οι κακές φαρμακοκινητικές ιδιότητες των μορίων που προέκυψαν από τις στρατηγικές της συνδυαστικής χημείας ήταν μία ακόμη αιτία για την προτίμηση της συγκεκριμένης τεχνικής όπου αρχίζοντας από χαμηλού μοριακού βάρους μόρια, έχει κανείς τη δυνατότητα να πραγματοποιήσει τις κατάλληλες συνθετικές τροποποιήσεις με βάση τη δομή του στόχου, καταλήγοντας σε drug-like μόρια με ιδιότητες συμβατές με τον κανόνα του Lipinski.



Εικόνα 19 Σύγκριση του μοριακού βάρους σε σχέση με την φαρμακολογική ισχύ σε μόρια-οδηγούς που προέκυψαν από εργασίες High-throughput screening και FBDD. Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται τα όρια για τα μόρια που περιλαμβάνονται στον κανόνα του Lipinski και για τα μόρια που εντάσσονται στον κανόνα του 3 για το FBDD (Scott et al., 2012).

Η θεωρητική βάση της συγκεκριμένης μεθόδου δημοσιεύτηκε αρκετά χρόνια πριν και πρότεινε πως η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας που συνοδεύει την πρόσδεση ενός μορίου A-B σε μια πρωτεΐνη μπορεί να περιγραφεί ως το άθροισμα των επιμέρους «ενεργειών πρόσδεσης» των θραυσμάτων A και B, η οποία προέρχεται κυρίως από τις

μεταβολές στην εντροπία του συστήματος λόγω περιστροφής και μετατόπισης (Jencks, 1981).

Παρά το γεγονός πως η παραπάνω υπόθεση δεν ισχύει (Biela et al., 2012), αποτέλεσε το έναυσμα και την έμπνευση για τη διαδικασία του FBDD μέσω της οποίας ανακαλύπτονται νέοι μοριακοί σκελετοί για φαρμακολογικούς στόχους. Κατά την τελευταία δεκαετία η συγκεκριμένη τεχνική έχει γίνει ένα όπλο στη φαρέτρα των φαρμακοχημικών που στοχεύουν αυτή την κατηγορία των αλληλεπιδράσεων, για τις οποίες μέχρι πρόσφατα υπήρχαν ελάχιστα ή και κανένα βιοχημικό εργαλείο-αναστολέας. Επειδή ένα τόσο μικρό μόριο, είναι απίθανο να μπορεί να διαταράξει μια τέτοια αλληλεπίδραση, συνήθως πραγματοποιούνται βιοχημικές σαρώσεις με στόχο της εύρεση προσδέτη για το πρωτεϊνικό κομμάτι με καθορισμένη τριτοταγή δομή που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση (Scott et al., 2016).

Κάθε πρόγραμμα ανακάλυψης φαρμάκων με χρήση μορίων θραυσμάτων περιλαμβάνει 3 στάδια:

1. Την κατασκευή μια βιβλιοθήκης με μόρια-θραύσματα
2. Την εκτέλεση βιοχημικών πειραμάτων- σαρώσεων υψηλής απόδοσης με στόχο την ανακάλυψη ενός πιθανού προσδέτη.
3. Την επιστράτευση υπολογιστικών τεχνικών και της συνθετικής χημείας με σκοπό τη δημιουργία ενός μορίου με drug-like ιδιότητες.

2.3.1. Οι βιβλιοθήκες μορίων-θραυσμάτων

Αναφορικά με την κατασκευή της βιβλιοθήκης των μορίων-θραυσμάτων συνηθίζεται να τηρείται ο επονομαζόμενος “Κανόνας του 3 (Rule of three)” σε αντιδιαστολή με τον κανόνα του Lipinski, γνωστό και ως “Κανόνα του 5 (Rule of 5)” που εφαρμόζεται στα drug-like μόρια. Σύμφωνα με το “Κανόνα του 3” τα μόρια-θραύσματα που χρησιμοποιούνται στις βιβλιοθήκες πρέπει να διαθέτουν τα εξής χαρακτηριστικά:

1. Μοριακό βάρος <300
2. $clogP < 3$
3. Άτομα που είναι δέκτες δεσμού υδρογόνου <3
4. Άτομα που είναι δότες δεσμού υδρογόνου <3

Η προσεκτική επιλογή των μορίων που θα μουν στη βιβλιοθήκη είναι αναγκαία για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας εύρεσης ψευδώς θετικού αποτελέσματος, για αυτό και απομακρύνονται μόρια που έχουν μη ειδική πρόσδεση σε πρωτεΐνες, μόρια που αντιδρούν και σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με αμινοξέα της πρωτεΐνης, μόρια που σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα και μόρια που σχηματίζουν συσσωματώματα. Αυτά τα προβλήματα προκαλούνται από μόρια με χημικές ομάδες που δρουν ως δότες Michael, υδραζίνες, υδροξυλαμίνες και ελεύθερες θειόλες μεταξύ άλλων (Harner et al., 2013).

Δεδομένου ότι η βιβλιοθήκη με τα μικρά αυτά μόρια θα χρησιμοποιηθεί για την έναρξη ενός προγράμματος ανακάλυψης νέων φαρμάκων, αντιλαμβανόμαστε το πόσο αναγκαίο είναι τα μόρια που θα προκύψουν από τα βιοχημικά-βιοφυσικά πειράματα σάρωσης να μπορούν να βελτιστοποιηθούν αναφορικά με τη συγγένεια ως προς το μόριο-στόχο. Κατά συνέπεια θα πρέπει να το μικρό μόριο να διαθέτει τουλάχιστον μία χαρακτηριστική χημική ομάδα που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συνθετική λαβή. Ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα που καλούνται οι φαρμακοχημικοί να αντιμετωπίσουν είναι πως πολικές ομάδες όπως οξέα ή αμίνες επιτελούν τις καθοριστικές αλληλεπιδράσεις στα μικρά αυτά μόρια και η όποια συνθετική τροποποίηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε αδρανές μόριο. Για αυτό το λόγο επιστρατεύονται συχνά για τη βελτιστοποίηση μέθοδοι υπολογιστικής χημείας (π.χ. τεχνικές σχεδιασμού φαρμάκων με βάση τη δομή του μορίου-στόχου) (Keserü et al., 2016).

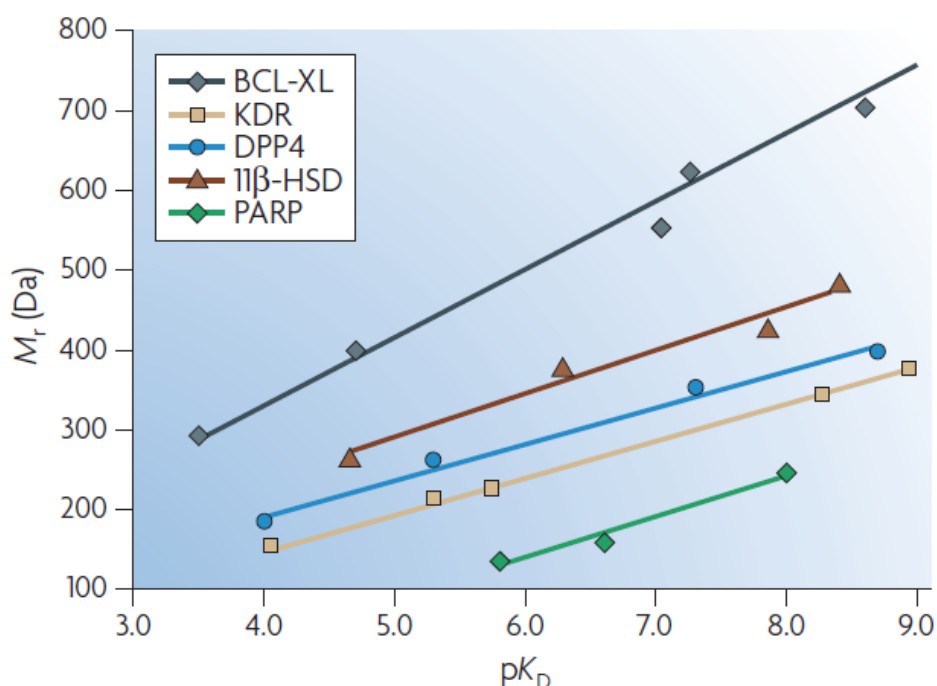
Υπάρχουν διαθέσιμες πολλές έτοιμες βιβλιοθήκες μορίων θραυσμάτων οι οποίες υπακούν τις περισσότερες φορές στον κανόνα του 3 και πολλές μάλιστα είναι βιβλιοθήκες φθορίου, εξειδικευμένες για πειράματα ^{19}F NMR ή βιβλιοθήκες βρωμίου εξειδικευμένες για πειράματα σάρωσης με κρυσταλλογραφία.

vendor	web site	library	no. of compds	commercially available
3D Fragment Library Consortium	ref 86.	increased shape diversity through greater three dimensionality	>500 ¹³⁵	N
ACB Blocks	www.acbblocks.com	¹⁹ F NMR-oriented, RO3 compliant, predicted to be soluble, purity >96%	1280	Y
Analyticon	www.ac-discovery.com	FRGx: fragments from nature; RO3 compliant, high solubility, purity >95%	213	Y
AnCoreX	www.ancorex.com	MetaKel (metal chelating. MW < 300)	>500	N
		TCI-Frag (targeted covalent inhibitor fragment screening; mildly reactive functionalities, RO3 compliant)	>100	
Asinex	www.asinex.com	fragment library	22524	Y
Beactica	www.beactica.com	SPRINT: validated for SPR. 2000 purchased fragments	1946	N
Beryllium	www.be4.com	fragments of life ¹³⁸	1500	N
BioBlocks	www.bioblocks.com	proprietary fragment library based on exploration of 3D shapes	~1000	N
Charles River	www.criver.com	core fragment library, 500 member kinase focused set, and 500 member ¹⁹ F labeled	1500	N
ChemBridge	www.chembridge.com	ChemBridge Fragment Library, RO3 compliant with predicted solubility; minimum purity 90% by ¹ H NMR	>7000	Y
ChemDiv	www.chemdiv.com	3D designed fragment library	4283	Y
Enamine	www.enamine.com	RO3 compliant	18108	Y
		golden	1794	
		fragment library (diverse subset of full library), "simple" fragment library: RO3 compliant ≤20 heavy atoms from screening collection	126597	
		other smaller sets of fluorinated, brominated (for X-ray), covalent sp ³ rich and PPI fragments		
InFarmatik	www.infarmatik.com	consolidated library from different concepts, In3D, GPCR, kinase	1700	Y
IOTA	www.iotapharma.com	diverse, mainly RO3 compliant	1500	Y
Integrex	www.integrexresearch.com	diversity in shape and chemical structure, RO3 allowing one violation	1500	Y
Key Organics	www.keyorganics.net	fragment library	26000	Y
		2nd generation with assured aqueous solubility, RO3 compliant	1166	
		fragments from nature: RO3 compliant, assured solubility and high Fsp ³ content	183	
		CNS fragment library: more stringent filters (e.g., mw <240)	700	
		fluorine	1950	
		bromine	1656	
Life Chemicals	www.lifechemicals.com	general	31000	Y
		RO3 compliant (and subsets of predicted soluble, fluorinated, brominated, and Fsp ³ enriched, covalent and PPI focused)	14000	
Maybridge	www.maybridge.com	RO3 compliant diversity fragment library with assured solubility in DMSO and PBS buffer; 1000 fragment subset available	2500	Y
		fragment collection, filtered by purity, mw <350 and substructures	>30000	
Otava	www.otavachemicals.com	general RO3 compliant, predicted to be soluble	12486	Y
		assured solubility in DMSO and PBS	1000	
		fluorine	1217	
		metal chelator	1023	
		halogen-enriched with bromine for X-ray studies	618	
Prestwick Chemical	www.prestwickchemical.com	Prestwick Fragment Library mainly derived from drug fragments, RO3 compliant	910	Y
Selcia	www.selcia.com	Selcia Fragment Library, RO3 compliant, predicted and measured solubility with purity >95%	1400	Y
TimTec	www.timtec.net	fragment-based library structurally diverse with predicted high solubility	3200	Y
Vitas-M	www.vitasmlab.com	RO3 compliant	18932	Y
Zenobia	www.zenobiafragments.com	fragment library from different design paradigms, cores from drugs, higher Fsp ³ flexible cores etc.	968	Y
ZoBio	www.zobio.com	RO3 compliant diverse commercially available and a smaller proprietary library	2300	N

Εικόνα 20 Λίστα με προμηθευτές εμπορικών βιβλιοθηκών μορίων-θραυσμάτων, η οποία υπογραμμίζει τη ποικιλία που υπάρχει αναφορικά με τις αρχές σχεδιασμού τους και του αριθμού των μορίων τους. (Keserü et al., 2016)

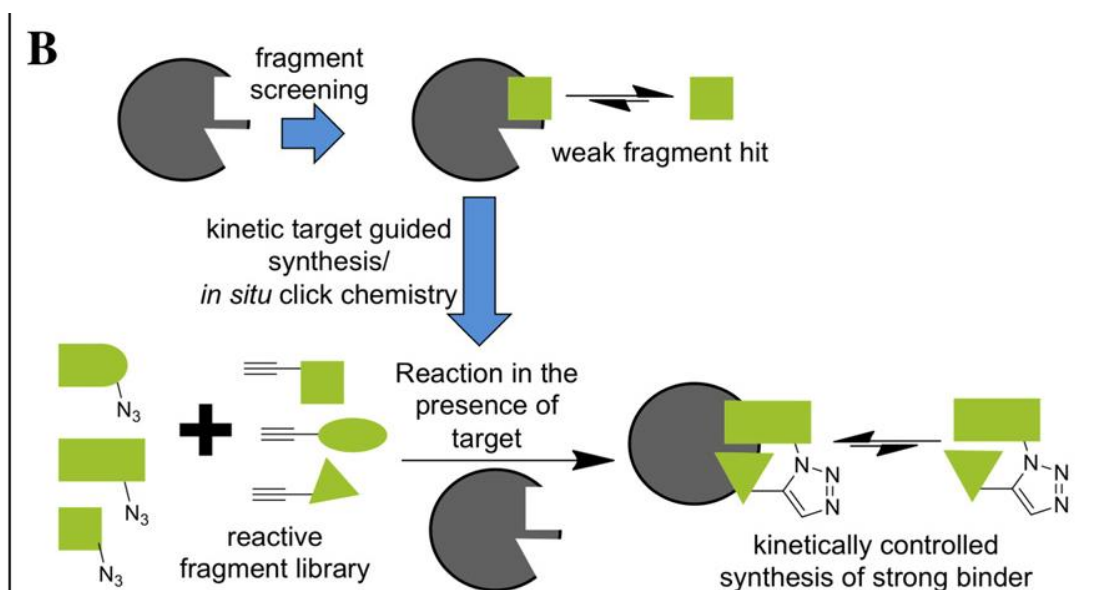
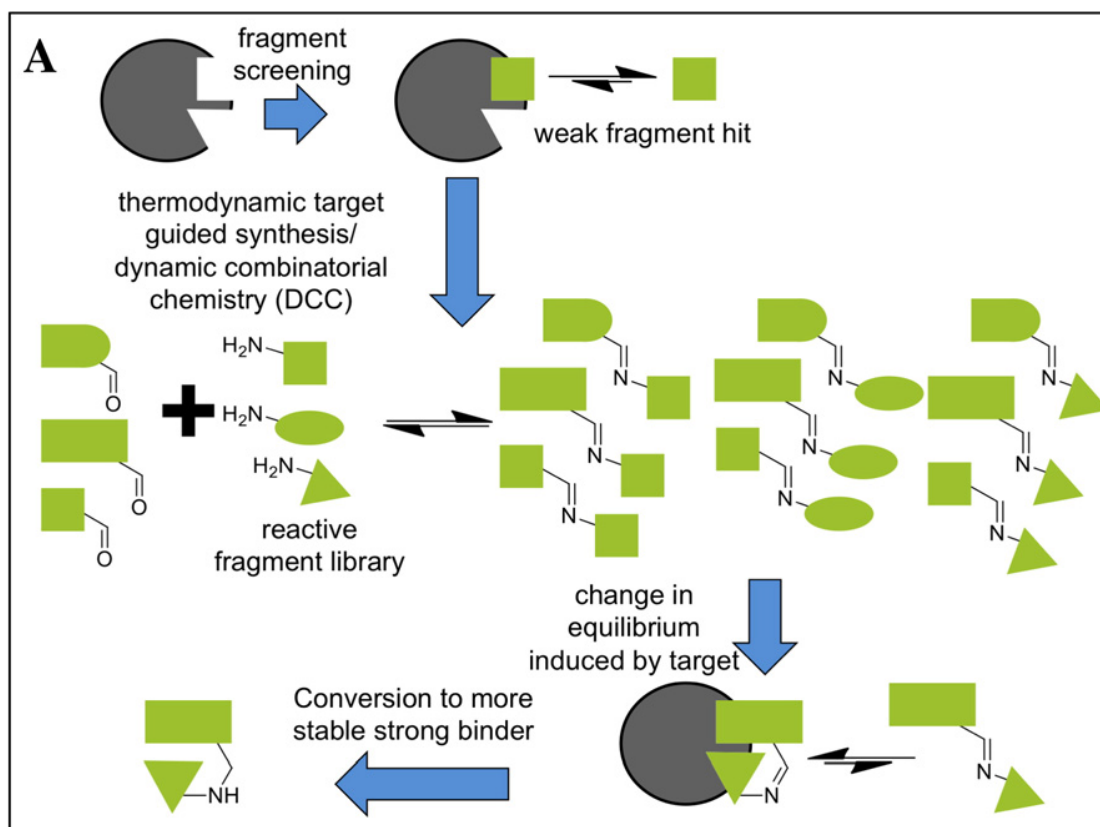
2.3.2 Συνθετική επεξεργασία- Βελτιστοποίηση

Συνήθως από μια σάρωση μορίων-θραυσμάτων θα προκύψουν μερικά τέτοια μόρια τα οποία προσδένονται αποτελεσματικά αλλά με χαμηλή συγγένεια ακόμη και πρωτεΐνες-στόχους με κακή φαρμακοφορητικότητα (druggability) (Doak et al., 2016). Σύμφωνα με μελέτη των Keseru et al. τα ποσοστά επιτυχίας σε εύρεση μικρών μορίων που αλληλεπιδρούν με τους κατά περίπτωση υποδοχείς από τις φαρμακευτικές εταιρείες, κυμαίνονται από 0.2-62%, χρησιμοποιώντας βιοχημικές και βιοφυσικές τεχνικές σάρωσης, ενώ κατά μέσο όρο τα αντίστοιχα ποσοστά με χρήση αποκλειστικά βιοφυσικών μεθόδων κυμαίνονται στο 2-8% (Keserü et al., 2016). Τα πρόδρομα δραστικά μόρια (hits) που θα προκύψουν από το αρχικό πείραμα σάρωσης είναι συνήθως μόρια που έχουν χαμηλή συγγένεια για το στόχο. Σε αυτό το στάδιο επιστρατεύεται η φαρμακοχημεία με στόχο την ανάπτυξη μορίων τα οποία να προσδένονται ισχυρότερα στην πρωτεΐνη-στόχο, προσφέροντας δυνατότητες και στρατηγικές για την ανάπτυξη των καινοτόμων δομών, οι οποίες να διατηρούν drug-like χαρακτηριστικά. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα που ακολουθεί για ένα υποσύνολο 5 αναστολέων, υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ μοριακού βάρους και φαρμακολογικής ισχύος, κατά την πορεία της χημικής βελτιστοποίησης. Στην πραγματικότητα η σχέση αυτή είναι σχεδόν γραμμική με τη μέση τιμή της κλίσης της καμπύλης να είναι ίση με 64. Ακολούθως, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας βελτιστοποίησης, μια αύξηση κατά 1 pK_d μπορεί να αντιστοιχηθεί σε αύξηση του μοριακού βάρους κατά 64 μονάδες. Τέτοια ευρήματα θέτουν σαφή όρια αναφορικά με το αποδεκτό μέγεθος και την αποτελεσματικότητα του τελικού φαρμακομορίου που θα προκύψει από ένα μόριο-θραύσμα με γνωστή αποτελεσματικότητα και μοριακό βάρος και επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση στην αξιολόγηση της διαδικασίας της συνθετικής βελτιστοποίησης (Hajduk and Greer, 2007).



Εικόνα 21 Σχέση μεταξύ δραστηριότητας και μοριακού βάρους κατά τη διαδικασία βελτιστοποίησης στα μόρια-θραύσματα. Διαγράμματα των τιμών pK_a σε σχέση με το μοριακό βάρος για τα μόρια που ταυτοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία του FBDD σε 5 διαφορετικούς πρωτεϊνικούς στόχους (Hajduk and Greer, 2007).

Μία τέτοια στρατηγική αποτελεί το SAR-by-NMR όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Λίγα είναι τα επιτυχημένα παραδείγματα, ωστόσο της συγκεκριμένης τακτικής, καθώς είναι δύσκολη η σύνδεση των μικρών μορίων χωρίς τη διαταραχή του τρόπου σύνδεσης καθενός μορίου με την πρωτεΐνη. Μια άλλη μέθοδος που αναπτύχθηκε έτσι ώστε να υπερνικηθεί η δυσκολία με σχετίζεται με τη σύνδεση μορίων που προσδένονται σε διαφορετικά σημεία της πρωτεΐνης είναι η «σύνθεση με βάση το μόριο-στόχο». Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί το στόχο ως πρότυπο για να καθοδηγηθεί η αντίδραση των μορίων με συμπληρωματικές δραστικές ομάδες ώστε να επιλεχθούν οι βέλτιστοι συνδυασμοί. Έτσι επιλέγονται οι βέλτιστοι συνδυασμοί μικρών μορίων για καθορισμένες συνδετικές ομάδες, καθώς και οι ιδανικές συνδετικές ομάδες για κάποιο συγκεκριμένο ζευγάρι μορίων-θραυσμάτων που συνδέονται σε γειτονικά τμήματα της πρωτεϊνικής κοιλότητας. Η στρατηγική αυτή υπάρχει υπό 2 διαφορετικές μορφές, όπου το παράγωγο προκύπτει από διαδικασίες που υπόκεινται είτε σε θερμοδυναμικό, είτε σε κινητικό έλεγχο (Doak et al., 2016).

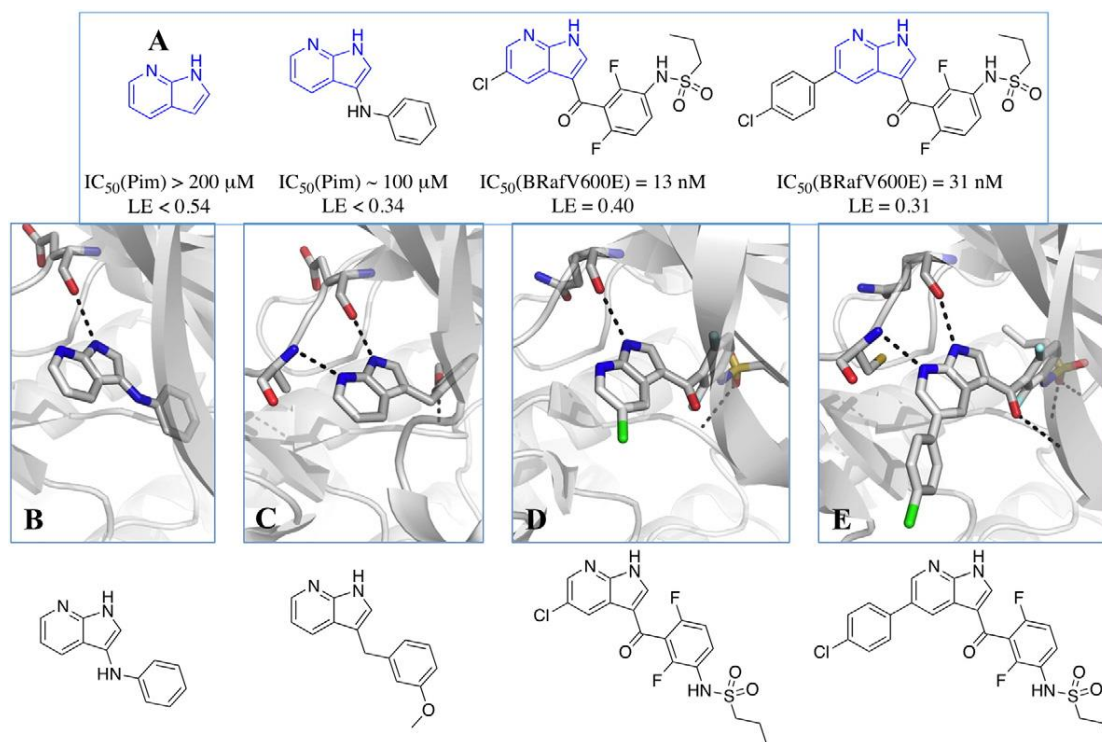


Εικόνα 22 Σχηματική αναπαράσταση της καθοδηγούμενης από το στόχο σύνθεσης που υπόκειται σε (Α) θερμοδυναμικό έλεγχο /της δυναμικής συνδυαστικής χημείας μορίων-θραυσμάτων με χρήση χημείας μινών και (Β)της μεθόδου που υπόκειται σε κινητικό έλεγχο/ *in situ* σύνθεση με τη χρήση της αντίδρασης κυκλοπροσθήκης μεταξύ αζιδίου και αλκινίου. (Doak et al., 2016).

2.4 Παραδείγματα μορίων που βρίσκονται στην κλινική πράξη ή σε κλινικές μελέτες που προέκυψαν από τη διαδικασία του FBDD

Zelboraf

Ο αμερικανικός FDA ενέκρινε το Zelboraf (επίσης γνωστό ως Vemurafenib ή PLX4032) το 2011 για τη θεραπεία του μελανώματος τελικού σταδίου καθιστώντας το, το πρώτο φάρμακο εγκεκριμένο από τον FDA που έχει προέλθει από κάποιο πρόγραμμα FBDD. Το Zelboraf είναι αναστολέας μιας συγκεκριμένης ογκογόνους μορφής της κινάσης BRaf που φέρει τη μετάλλαξη V600E. Η ανάπτυξη του Zelboraf ξεκίνησε ως μία δοκιμασία βιοχημικής σάρωσης, όπου μια βιβλιοθήκη 20000 μορίων με μοριακό βάρος της τάξης των 150-350 Da ελέγχθηκε σχετικά με την ικανότητα αναστολής σε ένα πάνελ κινασών γνωστής δομής. Το 1% των μορίων έδειξαν δραστικότητα αναστολέα, και αυτά τα μόρια προχώρησαν σε κρυσταλλογραφίες, με αποτέλεσμα να προκύψει μια σειρά από κρυσταλλογραφικές δομές, μέσα στις οποίες ήταν και αυτή του 7-αζα-ινδολίου προσδεδεμένο στην κοιλότητα πρόσδεσης του ATP, της κινάσης Pim1. Στις κρυσταλλογραφίες αυτές παρατηρήθηκαν διάφοροι τρόποι πρόσδεσης του μορίου στο ενεργό κέντρο της κινάσης. Ωστόσο, από την ανάλυση μιας σειράς μονοϋποκατεστημένων 7-αζαϊνδολίων, το 3-αμινοφαινυλο ανάλογο έδινε ένα σταθερό τρόπο πρόσδεσης στην Pim1. Ένα διαφορετικά υποκατεστημένο 7-αζαϊνδόλιο παρατηρήθηκε ότι προσδένεται στην κινάση FGFR1, πράγμα που οδήγησε στο συμπέρασμα πως ο συγκεκριμένος σκελετός μπορεί να προσδένεται σε διάφορες κινάσες και επίσης παρουσιάζει τη δυνατότητα χημικής τροποποίησης με πολλούς τρόπους, ώστε να βελτιωθεί η συγγένεια και η εκλεκτικότητα. Έτσι, άρχισαν να δοκιμάζουν ανάλογα του συγκεκριμένου σκελετού και στην B-RafV600E. Ακολούθησε σύνθεση και έλεγχος αναλόγων, μέχρι την ταυτοποίηση μιας σειράς μορίων που έχουν δομή διφθοροφαινυλοσουλφοναμιδο-υποκαταστατών στην θέση 3 του δακτυλίου με αυξημένη συγγένεια και αποτελεσματικότητα για τη συγκεκριμένη κινάση σε σχέση με άλλες, συμπεριλαμβανομένου και της κινάσης χωρίς τη μετάλλαξη. Μέσω φαρμακοχημικής βελτιστοποίησης, προέκυψε το Zelboraf (Doak et al., 2016).

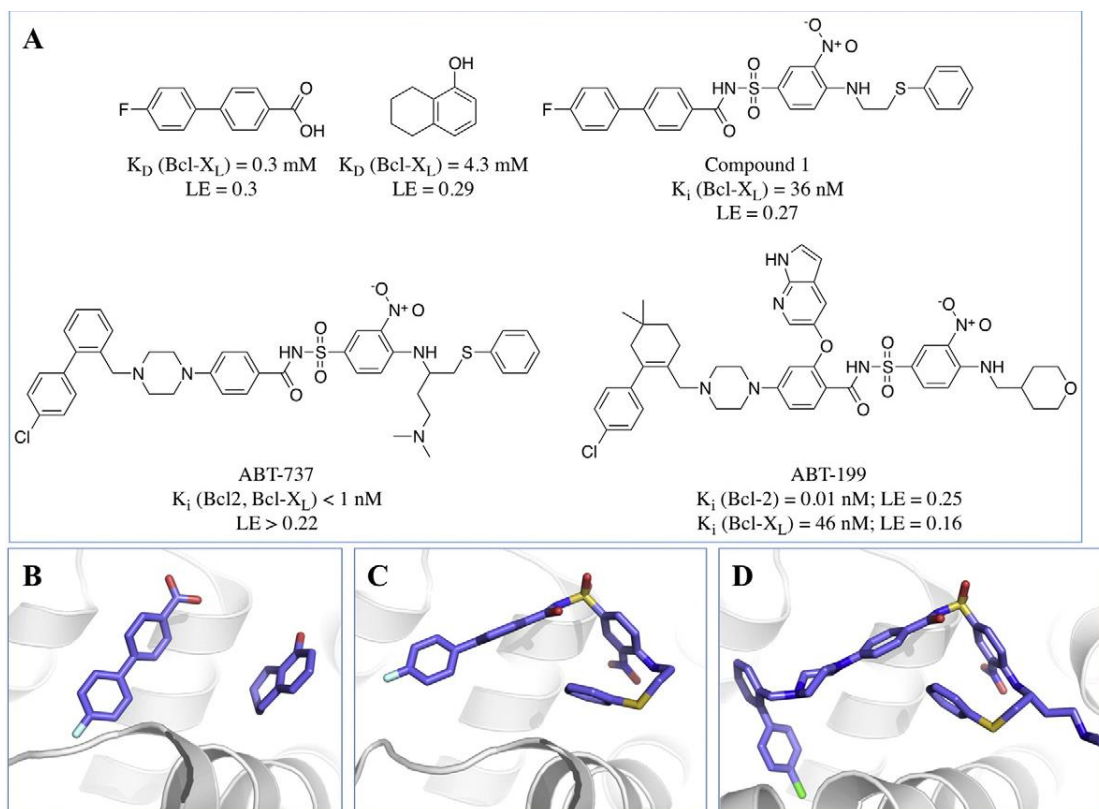


Εικόνα 21 Η ανάπτυξη του Zelboraf. (A) Δομές των μορίων που ελέγχθηκαν για την ανάπτυξη του φαρμάκου. Δίνεται το IC_{50} για κάθε μόριο. (B) Η κρυσταλλογραφία του 3-αμινοφαινυλο-7-αζαϊνδολίου με την Pim1 (PDB code 3C4E). (C) Η κρυσταλλογραφία του 3-(3-μεθοξυβενζυλο)-7-αζαϊνδολίου με την EGFR1 (3C4F). (D) Η κρυσταλλογραφία του PLX4072 με την B-Raf (3C4C). (E) Η κρυσταλλογραφία του Zelboraf με την B-RafV600E (3OG7). Τα μαύρα σημεία αναπαριστούν τις πολικές αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται από τις δομές. (Doak et al, 2016)

ABT-199 (Venetoclax)

Το Venetoclax είναι το δεύτερο φάρμακο εγκεκριμένο από τον FDA, που προέκυψε μέσω FBDD και προσδένεται στην πρωτεΐνη Bcl-2 αναστέλλοντας την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες με τις οποίες αυτή διμερίζεται. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2 εμπλέκονται σε αποπτωτικά μονοπάτια και η υπερέκφραση τους που εμποδίζει την απόπτωση αποτελεί χαρακτηριστικό σε πολλούς καρκίνους. Η δημιουργία αναστολέων αυτών των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών καθιστά πρόκληση για τους φαρμακοχημικούς, καθώς απαιτεί αναστολή μια αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Ερευνητές της Abbott διενέργησαν πειράματα σάρωσης μιας βιβλιοθήκης μικρών μορίων με NMR πρωτεΐνης. Ταυτοποιήθηκαν δύο μόρια τα οποία προσδένονται σε κοντινούς επίτοπους της πρωτεΐνης Bcl-xL. Μια κατάλληλη συνδετική ομάδα ακυλοσουλφοναμιδίου ταυτοποιήθηκε και ακολούθησαν συνθετικές τροποποιήσεις όπου είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του Ανάλογου 1 (Compound 1). Το συγκεκριμένο μόριο ήταν ισχυρός αναστολέας της Bcl-xL $K_i=36\text{nM}$ αλλά

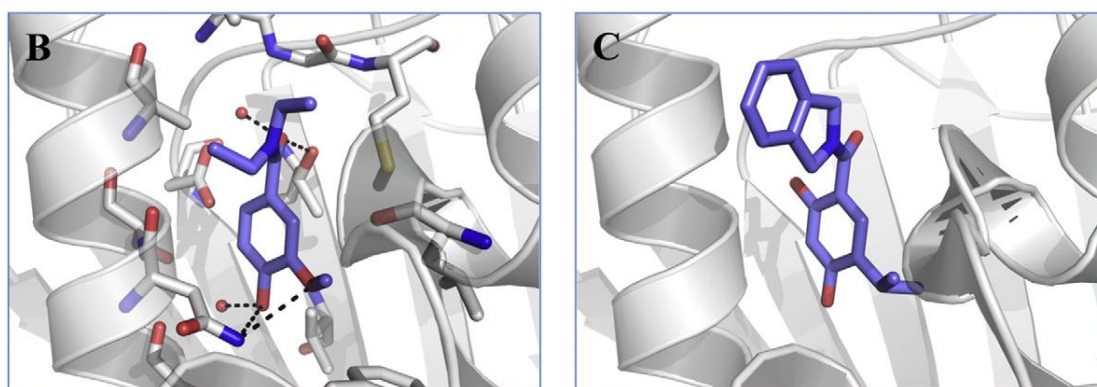
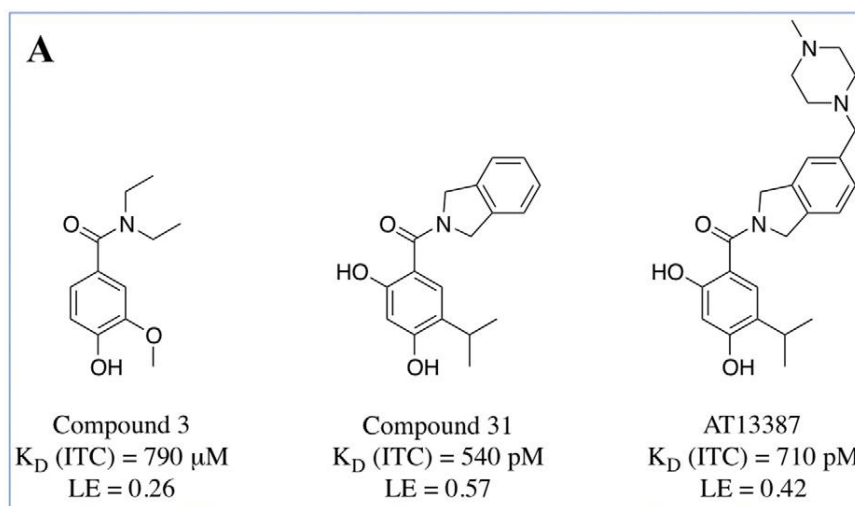
προσδένονταν επίσης ισχυρά και στην αλβουμίνη του ορού. Έγινε η κρυσταλλογραφία του συμπλόκου του μορίου 1 και του 3^{ου} domain της αλβουμίνης, πράγμα που επέτρεψε τον επανασχεδιασμό του φαρμάκου ώστε να μην έχει μεγάλη συγγένεια με την αλβουμίνη. Αναπτύχθηκε έπειτα το ABT-737, που είναι ισχυρός αναστολέας διαφόρων μελών της οικογένειας Bcl-2. Κλινικά δεδομένα έδειξαν πως ένας αναστολέας με προτίμηση για την Bcl-2 έναντι της Bcl-xL, θα είχε ένα καλύτερο προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών. Η ύπαρξη κρυσταλλογραφικών δομών για τις δύο αυτές πρωτεΐνες κατέστησε δυνατό το σχεδιασμό και τη σύνθεση του μορίου ABT-199 (Venetoclax), που έχει το επιθυμητό προφίλ δραστηριότητας και εγκρίθηκε από τον FDA τον Απρίλιο του 2016 για τη θεραπεία συγκεκριμένων ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία.



Εικόνα 22 (Α) Χημικές δομές των μορίων που ελέγχθηκαν για την ανάπτυξη του ABT-199. Οι σταθερές K_d και K_i φαίνονται στην εικόνα. (Β) Η συγκρυσταλλογραφία του 4'-φθοροδιφαινυλο-4-καρβοξυλικό οξύ και το 5,6,7,8-τετρανδρο-ναφθαλέν-1-όλη που προσδένονται στην πρωτεΐνη (κωδικός PDB 1YSG). (C) Η συγκρυσταλλογραφία του 4'-φθόρο-N-((3-νιτρο-4-((2-(φαινυλοθειο)αιθυλο)αμινο)φαινυλο)σουλφονυλο)-[1,1'-διφαινυλο]-4-καρβοξαμίδιο (ανάλογο 1) 1 προσδεδεμένο στο Bcl-XL (1YSI) (D) Η συγκρυσταλλογραφία του ABT-737 προσδεδεμένο στο Bcl-2 (2XYJ) (Doak et al., 2016).

AT13387

Αναστολείς της μοριακής πρωτεΐνης-συνοδού (chaperone) Hsp-90 έχουν δυνητικά εφαρμογές ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Στη δράση αυτής της πρωτεΐνης εμπεριέχεται και η μετατροπή του ATP και ADP και η συγγένεια για το ADP εξαρτάται από την παρουσία Mg^{2+} . Αυτό το γεγονός εκμεταλλεύτηκαν οι ερευνητές της Astex για την ταυτοποίηση μικρών μορίων που συνδέονται στην κοιλότητα της Hsp-90 όπου συνδέεται και η αδενοσίνη. Μια βιβλιοθήκη 1600 μορίων σαρώθηκε με τη μέθοδο WaterLOGSY NMR. Στα αρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκε χαμηλή συγκέντρωση ADP, απουσία Mg^{2+} , έτσι ώστε πολύ μικρό ποσοστό της κοιλότητας να καταλαμβάνεται από το ADP και να μπορούν να ανιχνευτούν τα μόρια που συνδέονται με την Hsp-90. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν παρουσία Mg^{2+} , το οποίο επιτρέπει στο ADP να προσδεθεί ισχυρότερα, με αποτέλεσμα την εκτόπιση όποιου μικρού μορίου προσδένονταν στην κοιλότητα της πρωτεΐνης. Οι πρώτες μελέτες σάρωσης ταυτοποίησαν 125 μόρια (το 8% του συνόλου της βιβλιοθήκης) τα οποία πέρασαν σε μελέτες κρυσταλλογραφίας και από τα πειράματα προέκυψαν 26 κρυσταλλογραφικές δομές. Ένα από τα μόρια που συγκρυσταλλώθηκαν με την πρωτεΐνη, προχώρησε σε περαιτέρω φαρμακοχημική διερεύνηση με αποτέλεσμα τη σύνθεση ενός αναστολέα με συγγένεια σε επίπεδο nanomolar. Παρόλη την υψηλή συγγένεια, αυτό το μόριο είχε χαμηλή φαρμακολογική αποτελεσματικότητα και χρειάστηκαν περαιτέρω τροποποιήσεις ώστε να προκύψει το μόριο AT13387 που προχώρησε σε κλινικές μελέτες.



Εικόνα 23 Ανάπτυξη του AT13387. (Το ανάλογο 3 ταυτοποιήθηκε πως προσδένεται στην ADP κοιλότητα της πρωτεΐνης Hsp-90. (B) Η συγκρυσταλλογραφία του N,N-διαλιθυλο-4-υδρόξυ-3-μεθοξυβενζαμίδιο (ανάλογο 3) προσεδεμένο στην Hsp-90 (κωδικός PDB 2XDL). Οι δεσμοί υδρογόνου στο πρόσδεμα φαίνονται με μαύρες διακεκομμένες γραμμές. Η συγκρυσταλλογραφία επιτρέπει την ταυτοποίηση των κατάλληλων ανυσμάτων για επεξεργασία, η οποία οδηγεί στο ανάλογο 31 (2XAB) το οποίο διατηρεί τον ίδιο τρόπο πρόσδεσης. Μετά από βελτιστοποίηση στο ανάλογο 31, καταλήξαμε στο μόριο AT13387 (Doak et al., 2016).

Συμπερασματικά το FBDD έχει συμβάλλει στις πρακτικές του high-throughput screening μέσω της έμφασης στην προσεκτική διαλογή ενώσεων για τη δημιουργία χημικών βιβλιοθηκών και τον έλεγχο αυτών αλλά και της έμφασης στη χρήση βιοφυσικών μεθόδων σάρωσης για την ανίχνευση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και υποδοχέα. Επιπλέον η συγκεκριμένη στρατηγική έχει καθιερώσει τη συνθετική βελτιστοποίηση των μορίων-οδηγών με βάση τη δομή (structure based drug design), ενώ χημικά χαρακτηριστικά όπως η λιποφιλία και το μοριακό βάρος παίζουν πλέον καθοριστικό ρόλο στην επιλογή μορίων που έχουν προκύψει από βιοχημικές σαρώσεις για συνθετική βελτιστοποίηση. Τέλος, δεν μπορεί να αγνοηθεί η συμβολή της συγκεκριμένης μεθόδου όσον αφορά την ανακάλυψη αναστολέων για στόχους που μέχρι πρότινος θεωρούνταν δύσκολοι από άποψη φαρμακοφορηκότητας, όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

ΣΚΟΠΟΣ

Όπως περιγράψαμε και στην εισαγωγή, η αναστολή των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στις οποίες εμπλέκεται το bromodomain PB1A5 θα μπορούσε να αποτελέσει δυνητική θεραπεία για το καρκίνωμα των νεφρικών σωληναρίων. Μέχρι στιγμής έχουν βρεθεί 3 μόνο μόρια που αναστέλλουν την αλληλεπίδραση αυτή: το PFI-3 σε επίπεδο nanomolar, το ανάλογο του, που αποτελεί επίσης αναστολέα σε επίπεδο nanomolar και τέλος το ανάλογο με τον ισοχρομενικό δακτύλιο που ανακαλύφθηκε από το εργαστήριο μας. Τα μόρια αυτά χρησιμεύουν ως βιολογικά εργαλεία (chemical probes) αλλά δεν αποτελούν φάρμακα. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανακάλυψη νέων αναστολέων με καλύτερα πιθανόν φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και διαφορετικό μοριακό σκελετό με τη μέθοδο του σχεδιασμού φαρμάκων με μόρια-θραύσματα. Σε πρώτο στάδιο συλλέχθηκαν και καταγράφηκαν μόρια χαμηλού μοριακού βάρους και λιποφιλίας τα οποία υπήρχαν διαθέσιμα ως αντιδραστήρια για τα συνθετικά εργαστήρια του τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας στη Φαρμακευτική Αθηνών, αλλά έγινε και επεξεργασία της βιβλιοθήκης PharmaLab που αποτελείται από μόρια τα οποία απομονώθηκαν από φυτικά εκχυλίσματα στα εργαστήρια του Τομέα Φαρμακογνωσίας. Μετά την τελική επιλογή των μορίων, ακολούθησαν πειράματα βιοφυσικών σαρώσεων (DSF, NMR, κρυσταλλογραφία ακτίνων X) καθώς και υπολογιστικά πειράματα πρόσδεσης (docking), αλλά και υπολογισμοί μοριακής δυναμικής με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του υπολογιστικού πειράματος με το βιοφυσικό αλλά και με τη σκέψη πως οι θεωρητικοί υπολογισμοί θα βοηθήσουν στη διαδικασία βελτιστοποίησης του αρχικού μορίου-οδηγού. Επιπλέον έγινε και έλεγχος αναλόγων του βαρβιτουρικού οξέος με βιοφυσικές μεθόδους με σκοπό την εύρεση κάποιου μορίου με ισχυρή σύνδεση στο Bromodomain, ώστε να γίνουν πειράματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων X.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Θεωρητικοί υπολογισμοί

Έγινε η επεξεργασία της βιβλιοθήκης με τη χρήση του αλγορίθμου LigPrep. Ο αλγόριθμος αυτός δημιουργεί ακριβείς 3D μοριακές δομές σε διαμορφώσεις χαμηλής ενέργειας, ενώ παρέχει και τη δυνατότητα δημιουργίας ταυτομερών δομών καταστάσεων ιονισμού, διαμορφώσεων δακτυλίων και στερεοϊσομερών (www.schrodinger.com/ligprep). Επιπλέον ακολούθησε επεξεργασία της βιβλιοθήκης με τον αλγόριθμο Epik, ώστε να προκύψουν τα κατάλληλα ταυτομερή για το pH στο οποίο πραγματοποιούνται οι υπολογισμοί ($\text{pH} = 7.5 \pm 0.3$), υπολογίζοντας το pK_a των δομών (www.schrodinger.com/epik)

Προετοιμασία πρωτεΐνης: Οι έμπειροι μοντελιστές γνωρίζουν ότι οι ακριβείς δομές εκκίνησης αποτελούν προϋπόθεση για τον επιτυχή υπολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων. Δυστυχώς, ακόμα και όταν εργάζονται με μια υψηλής ανάλυσης x-ray κρυσταλλογραφική δομή, οι ερευνητές μπορεί να ξοδέψουν πολύ χρόνο και προσπάθεια για τη διόρθωση κοινών προβλημάτων όπως απόντα άτομα υδρογόνου, ελλειπείς πλευρικές αλυσίδες και βρόγχοι και διαφορούμενες καταστάσεις πρωτονίωσης.

Το Protein Preparation Wizard, μία υπορουτίνα της Schrödinger, συγκεντρώνει, αυτοματοποιεί και ενσωματώνει τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εργαλεία και τεχνικές για την προετοιμασία της δομής, χωρίς να υποχρεώνει τον ερευνητή σε μια ενιαία άκαμπτη διαδικασία, καθώς καθ' όλη τη ροή εργασιών της προετοιμασίας, ο χρήστης μπορεί να επιλέξει εάν πρέπει ή όχι να εφαρμόσει οποιαδήποτε δεδομένη πράξη, μέσω του System preparation protocol.

System preparation protocol: Από την Protein Data Bank (PDB) χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλογραφία της PB1A5 με κωδικό 5HPX και η κρυσταλλογραφία της BRD4 με κωδικό 4FLP. Έγινε επεξεργασία της δομής αυτής με το Protein Preparation Wizard, το οποίο εισάγει άτομα υδρογόνου, τα οποία μπορεί να λείπουν, διορθώνει και εισάγει δεσμούς ανάμεσα στα άτομα, όπου αυτό κρίνεται αναγκαίο, εισάγει φορτία στα

αμινοξέα όπου κρίνεται αναγκαίο και ελαχιστοποιεί την ενέργεια του συστήματος, οδηγώντας το σε μια σταθερή διαμόρφωση. (Protein Preparation Wizard manual)

Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ο αλγόριθμος Induced Fit του πακέτου λογισμικών του Maestro, της εταιρείας Schrödinger. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος, συνδυάζει τους αλγορίθμους Glide και Prime της ίδιας σουίτας με σκοπό τη δημιουργία όλων των πιθανών τρόπων πρόσδεσης εφόσον ο υποδοχέας υφίσταται παράλληλα με την πρωτεΐνη διαμορφωτικές αλλαγές. Το πρωτόκολλο του Induced Fit ξεκινάει με υπολογισμούς πρόσδεσης (docking) χρησιμοποιώντας το Glide. Προκείμενου να δημιουργηθεί ένα σύνολο από «πόζες» για τα μικρά μόρια, η διαδικασία μειώνει τις ακτίνες van der Waals, ενώ αυξάνει το όριο για τη δημιουργία ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων Coulomb και αλληλεπιδράσεων van der Waals. Για κάθε μία πόζα που προκύπτει, χρησιμοποιείται μια δομική πρόβλεψη του Prime ώστε να οριοθετηθεί το μικρό μόριο στον υποδοχέα έπειτα από μετατόπιση των πλευρικών αλυσίδων. Στη συνέχεια εκτελείται ελαχιστοποίηση τόσο στα κατάλοιπα αυτά όσο και στο μικρό μόριο. Τέλος, κάθε ένα μικρό μόριο υφίσταται πάλι docking στη διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας που αντιστοιχεί σε αυτό και τα συμπλέγματα πρωτεΐνης-μικρού μορίου που προκύπτουν, κατατάσσονται με βάση το Glide Score (<https://www.schrodinger.com/induced-fit>).

Η συγκεκριμένη μέθοδος προτιμήθηκε σε σχέση με τις κλασικές μελέτες πρόσδεσης, καθώς αφενός τα μικρά αυτά μόρια μπορεί να συνδέονται σε περισσότερους από έναν επίτοπους, σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα «drug-like» μόρια, αφετέρου γιατί οι συναρτήσεις κατάταξης των απλών αλγορίθμων που εκτελούν μελέτες πρόσδεσης συχνά είναι ανακριβείς ακόμη και για μεγαλύτερα μόρια, πόσο μάλλον για μόρια - θραύσματα (Chen and Shoichet, 2009).

Για τους υπολογισμούς μοριακής δυναμικής που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Desmond v.3 (Desmond Molecular Dynamics System, version 3.4 D.E. Shaw Research, New York, NY, USA, 20080). Η κρυσταλλογραφική δομή που επιλέχθηκε για τις μοριακές δυναμικές στην PB1A5 φέρει τον κωδικό 5HPX και στην Protein Data Bank, ενώ η δομή που επιλέχθηκε για τις μοριακές δυναμικές για την πρωτεΐνη BRD4 φέρει τον κωδικό 4FLP. Οι πρωτεΐνες διαλυτοποιήθηκαν με μόρια νερού τύπου TIP3P, ενώ έγινε προσθήκη 150mM NaCl, ώστε να προσομοιωθεί το πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο NMR. Αρχικά

ακολουθήθηκε πρωτόκολλο εξισορρόπησης του συστήματος όπως αυτό έχει αναπτυχθεί και προταθεί από την εταιρεία Desmond για πρωτεϊνικά συστήματα. Ακολούθησαν 120 ns Μοριακής Δυναμικής με χρήση του πρωτοκόλλου NPT, η θερμοκρασία και η πίεση προσαρμόστηκαν με τον αλγόριθμο Langevin.

2.Υπερέκφραση και καθαρισμός της PB1A(5)

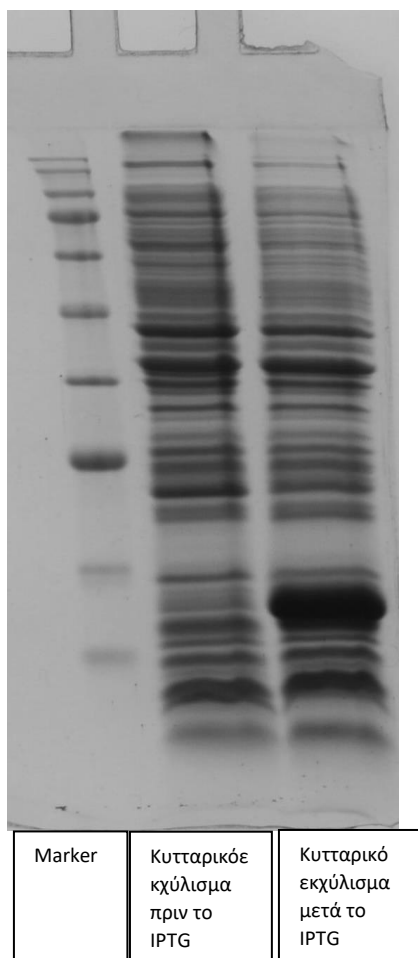
Η υπερέκφραση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης PB1A5 πραγματοποιήθηκε τόσο στο εργαστήριο του καθηγητή Κ. Βοργιά στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, όσο και στο εργαστήριο του καθηγητή Stefan Knapp, στη Φαρμακευτική Σχολή του Πανεπιστημίου της Φρανκφούρτης.

Πρώτο βήμα αποτελεί η παραλαβή του c-DNA (συμπληρωματικό DNA) η οποία πραγματοποιείται είτε με ενίσχυση γενωμικού DNA (σε περίπτωση προακρυωτικών γονιδίων ή ευκαρυωτικών γονιδίων χωρίς ιντρόνια), είτε παίρνοντας c-DNA με επαληθευμένη αλληλουχία είτε τέλος κάνοντας ολική σύνθεση του γονιδίου. Ακολουθεί η χρήση της μεθόδου κλωνοποίησης ανεξαρτήτως πρόσδεσης (Ligation Independent Cloning) για την κλωνοποίηση του ολικού c-DNA (ή του τμήματος που μας αφορά) σε ένα βακτήριο E.Coli που είναι φορέας έκφρασης. Για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Escherichia coli BL21(DE3). Το στέλεχος είναι ειδικό για την υπερέκφραση πρωτεϊνών. Διαθέτει γονίδιο για την παραγωγή της T7 RNA-πολυμεράσης υπό τον έλεγχο του υποκινητή lacUV5, ενώ έχουν αδρανοποιηθεί τα γονίδια που εκφράζουν τις περιπλασμικές πρωτεάσες OmpT και Lon (SGC et al, 2008).

Αναφορικά με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστήμιο Αθηνών η έκφραση και ο καθαρισμός την πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Από τριβλίο με κύτταρα BL21(DE3)-R3-RARE παραλαμβάνω μια μικρή ποσότητα κυττάρων και κάνω δύο καλλιέργειες των 5 mL χρησιμοποιώντας ως θρεπτικό υλικό LB (Luria Bertani medium), οι οποίες στη συνέχεια αραιώνονται στα 100 mL και αφήνονται overnight στους 37 βαθμούς Κελσίου παρουσία των αντιβιοτικών καναμυκίνη και χλωραμφενικόλη. Την επόμενη μέρα γίνεται η επαγωγή με προσθήκη

IPTG ($c=1\text{mM}$) σε $OD=0.4$. Η καλλιέργεια με όγκο 2 λίτρα αφήνεται στους 18 βαθμούς Κελσίου για ένα βράδυ. Η εικόνα που παρατηρούμε την επόμενη ημέρα μετά από ηλεκτροφόρηση με τζελ ακρυλαμίδης (SDS-PAGE) είναι η εξής:



Με φυγοκέντρηση στις 15000 στροφές παίρνω 4 pellets των 1.85g ,1.95g, 79mg και 2g. (Επιτυχής καθαρισμός των pellet των 2 και 1.95g). Κατά την επιτυχή προσπάθεια καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε ως Lysis-Elution-Wash Buffer (LEW), διάλυμα με την ακόλουθη σύσταση:

- 50mM HEPES
- 500mM NaCl
- 5mM ιμιδαζόλιο
- 5% γλυκερόλη
- 0.1mM TCEP
- 1mM PMSF (κατά τη χρήση του διαλύματος)

Ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση των pellets σε 50ml από το LEW Buffer, και σπάσιμο των κυττάρων με χρήση υπερήχων για 30 λεπτά αφού πρώτα προσθέσαμε στο

διάλυμα μισό χάπι αναστολέα πρωτεασών (Protease Inhibitor Coctail, Sigma). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 40 λεπτά στις 15.000 στροφές.

Κάναμε μια βελτιστοποίηση στο πρωτόκολλο καθαρισμού που ακολουθούσε το SGC ώστε να παραλάβουμε μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Πήραμε 25 ml από το μίγμα των σπασμένων κυττάρων και κάναμε καθίζηση με θειικό αμμώνιο σε κλάσματα με ποσοστό κορεσμού στο αλάτι από 0-60 (9.025 g θειικού αμμωνίου σε όγκο 25 ml) και 60-80 (προσθήκη 3,68g σε τελικό όγκο 28,5 ml) και στην συνέχεια κατεργασία με TCA (τριχλωρο-οξικό οξύ) για καθίζηση των πρωτεϊνών στο υπερκείμενο των διαλυμάτων με ποσοστό κορεσμού σε θειικό αμμώνιο πάνω από 80, 60-80 και κάτω από 60.

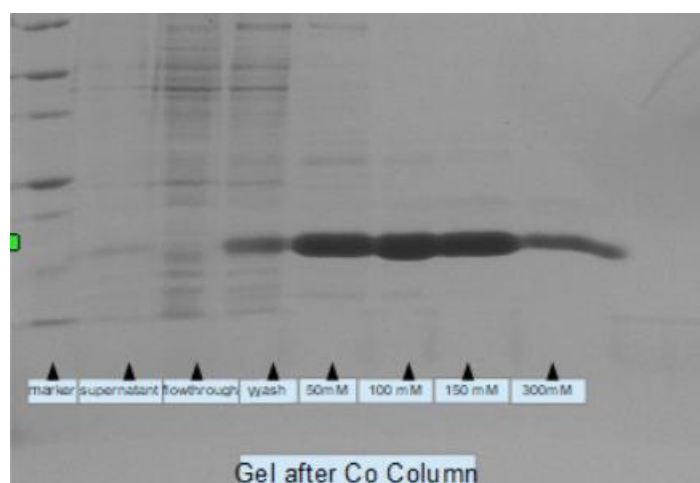
Από το gel των κλασμάτων του θειικού αμμωνίου μετά το TCA, παρατηρήσαμε πως η μεγαλύτερη ποσότητα της πρωτεΐνης είναι στο pellet του κλάσματος 0-60.

Αντίθετα το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης είναι το παρακάτω:

Ένα δείγμα από κύτταρα E.coli BL21DE3-pRARE2 τα οποία φέρουν το πλασμίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PB1A5 με το His-tag, καλλιεργείται σε 1 L θρεπτικό μέσο LB (Luria Bertani medium, Amresco) παρουσία χλωραμφενικόλης (50mg/mL, 30μL) και καναμυκίνης (50mg/mL, 30μL). Μετά από επώαση overnight στους 37°C το κυτταρικό εναιώρημα διαιρείται σε 2 μπουκάλια και αραιώνεται σε θρεπτικό μέσο TB (10mL αρχικής καλλιέργειας σε 1L TB: Trypton (12g), εκχύλισμα ζύμης (24g), Γλυκερόλη (4mL), διάλυμα αλάτων TB (50 mL)) με καναμυκίνη (50mg/mL, 1mL). Οι καλλιέργειες επωάζονται στους 37° C (στα 180 rpm) μέχρι η OD (optical density) που θα μετρηθεί από το φασματοφωτόμετρο να φτάσει το 1,5. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση στους 18° C (στα 170 rpm) η οποία συνεχίζεται μέχρι η OD να φτάσει το 3,4. Η έκφραση της πρωτεΐνης επάγεται από την προσθήκη του IPTG (1M, 0.5mL) και οι καλλιέργειες επωάζονται overnight στους 18° C (στα 180 rpm). Τα εναιωρήματα φυγοκεντρούνται (στα 8700G, 4° C ,10 λεπτά ανά 1L).

Τα κύτταρα που εκφράζουν την επισημασμένη με His-tag πρωτεΐνη, επαναιωρούνται με τη χρήση του Lysis Buffer (500mM NaCl, 50mM HEPES pH=7.5 στους 4° C, 20 mM ιμιδαζόλιο pH=7 σε θερμοκρασία δωματίου, 1mM TCEP, 5% v/v Γλυκερόλη) και πραγματοποιήθηκε λύση αυτών 2 φορές μέσα σε παγόλουτρο (παλμός 5 δευτερολέπτων, παύση 10 δευτερολέπτων, συνολικός χρόνος 9 λεπτά) με τη χρήση της

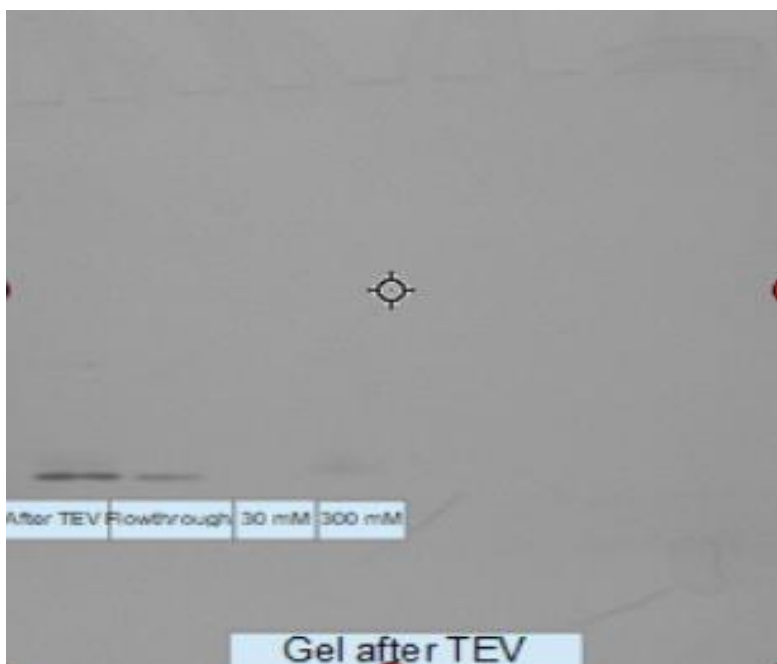
συσκευής υπερήχων κυττάρων SONICS Vibra. Προστίθεται πολυαιθυλενιμίνη (0,15% v/v τελική συγκέντρωση) και έπειτα από ανάδευση το εναιώρημα φυγοκεντρείται (23000rpm, 4° C, 30min, T29-8x50 rotor, Thermo Scientific SORVAL LYNX 6000 centrifuge). Το υπερκείμενο καθαρίζεται με IMAC (Immobilised Metal Affinity Chromatography- Χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου Μετάλλου) με κόκκους κοβαλτίου. Η κολώνα πληρώθηκε με 5 mL διαλύματος και εξισορροπήστηκε με 10 όγκους από το Lysis Buffer, έπειτα από πλύση με το wash buffer (100mL, 500mM HEPES pH=7,5 στους 4° C 20mM ιμιδαζόλιο pH=7 σε θερμοκρασία δωματίου, 1mM TCEP, 5% v/v Γλυκερόλη), και πραγματοποιείται στο Lysis Buffer (12mL για κάθε έκλουση, 50,100,150,2x300 mM ιμιδαζόλιο σε pH=7 σε θερμοκρασία δωματίου). Πραγματοποιήθηκε ανάλυση από τα κλάσματα με SDS-PAGE (15% ακρυλαμίδα/bis 37:5:1 (VWR)). Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες έτρεξε το τζελ ήταν οι εξής: 200V, 300W για 45 λεπτά σε SDS-PAGE running buffer.



Εικόνα 24 Το SDS-PAGE gel μετά την IMAC Co⁺²

Τα δύο καθαρότερα κλάσματα (αυτό που περιέχει 150mM και 300mM ιμιδαζόλιο) προστίθενται σε μία μεμβράνη για dialysis (SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.500MWCO), στην οποία προστίθεται η TEV πρωτεάση (1:20, πρωτεΐνη:TEV) και η μεμβράνη αφήνεται στους 4 overnight υπό ανάδευση (100rpm). Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης από το His-tag πραγματοποιείται με τη βοήθεια στήλης Ni-NTA αгарόζης (2.5 mL, τα οποία εξισορροπήστηκαν με 10 όγκους φιλτραρισμένο buffer). Προκειμένου να μειωθεί η μη ειδική πρόσδεση, πραγματοποιείται βαθμιαία έκλουση με ροή βαρύτητας με διαφορετικές συγκεντρώσεις ιμιδαζολίου (30 και 300 mM ιμιδαζολίου pH=7 σε

θερμοκρασία δωματίου σε φιλτραρισμένο buffer. Το flowthrough που περιέχει την καθαρισμένη πρωτεΐνη (ελέγχθηκε με SDS-PAGE) συμπυκνώθηκε στα 5mL (χρήση συμπυκνωτή των 15 mL με 10 kDa cut-off, Merck Millipore).



Εικόνα 25 Το gel SDS-PAGE μετά την επώαση με την TEV πρωτεάση

Ακολούθησε περαιτέρω καθαρισμός με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (SEC) (gel filtration buffer: 20mM HEPES pH=7.5, 150mM NaCl, 0.5mM TCEP, 5% v/v γλυκερόλη) με χρήση κολώνας HighLoad™ 16/600 Superdex™ 75pg (G/E Amersham Biosciences) σε σύστημα AktaPrime™ plus (GE/Amersham Biosciences).

3.Η φθορισμομετρία διαφορικής σάρωσης

Στα πειράματα ως χρωστική χρησιμοποιήθηκε το SYPRO orange το οποίο διεγείρεται στα 492 nm και φθορίζει σε μήκος κύματος 610 nm, ενώ το πρόγραμμα που επιλέχθηκε στο μηχάνημα ήταν το SYBR Green. Τα πειράματα που έλαβαν χώρα στο Πανεπιστήμιο Αθηνών πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα cobas 4800, ενώ τα πειράματα που έλαβαν χώρα στη Γερμανία πραγματοποιήθηκαν στο μηχάνημα Stratagene Mx3005p. Η ανάλυση των δεδομένων και το fitting σε καμπύλη τύπου Boltzmann προκειμένου να υπολογιστεί το σημείο καμπής της καμπύλης που αντιστοιχίζεται στην T_m έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad και του

Microsoft Excel. Οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και μικρού μορίου που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα που έλαβαν χώρα στην Αθήνα ήταν 2μM για την πρωτεΐνη και 100μM για τα μικρά μόρια σε reaction mix που περιείχε 10mM HEPES pH=7.5 και 150mM NaCl, ενώ οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις στα πειράματα που έλαβαν χώρα στη Γερμανία ήταν 2μM για την πρωτεΐνη και 10μM για τα μικρά μόρια.

4.STD-NMR

Οι έλεγχοι της αλληλεπίδρασης μορίων μικρού μοριακού βάρους με την πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.5, 300 mM NaCl και 60 μM NaN₃ ως αντιμικροβιακό παράγοντα. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα αλληλεπίδρασης ήταν 50 μM, ενώ η συγκέντρωση των πιθανών προσδετών ήταν της τάξεως του 1mM. Τα μόρια τα βρίσκονταν σε διαλύματα DMSO συγκέντρωσης 10mM, από όπου παραλήφθηκε ποσότητα τέτοια ώστε στο σωληνάκι του NMR να έχουν την απαιτούμενη συγκέντρωση. Πραγματοποιήθηκε εξάτμιση του διαλύτη στο GENEVAC και επαναδιάλυση των μορίων σε d₆-DMSO.

Σε σωληνάρια NMR διαμέτρου 5 mm, μεταφέρθηκαν 550 μL διαλύματος και τα φάσματα ελήφθησαν στους 25 °C σε μαγνητικό πεδίο 600 MHz (AVANCE III, Bruker), με ανιχνευτή τύπου PABBI, με βαθμωτά πεδία στον άξονα z. Η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με το λογισμικό TopSpin v. 3.1 (Bruker BioSpin GmbH). Τα φάσματα ¹H 1D ελήφθησαν σε εύρος 20.00 ppm, με 64 ή 128 σαρώσεις και ανάλυση 24k σημείων χρησιμοποιώντας την παλμική αλληλουχία zgesgp (Hwang and Shaka, 1995) της βιβλιοθήκης Bruker για την καταστολή του ισχυρού σήματος του H₂O (90% στο διάλυμα μελέτης). Ο παλμός 90° (9-10 μs), καθώς και η ρύθμιση του δέκτη προσδιορίστηκαν αυτόματα, ο χρόνος αποκατάστασης ήταν 5 s και ο σχηματισμένος παλμός ήταν τύπου “Sinc1.1000” με την εκτροπή κατά 180° να επιτυγχάνεται σε 2.4 ms.

Τα φάσματα STD ελήφθησαν με την παλμική αλληλουχία stddiffesgp.2 (βιβλιοθήκη Bruker, (Mayer and Meyer, 1999)), με χρόνο αποκατάστασης 3 s, ανάλυση 32k σημεία, 280 σαρώσεις, χρόνο λήψης 1.7 s, ρυθμιζόμενο παλμό (trim pulse, p17) 2.5 ms, με σχηματισμένους παλμούς τύπου Gaus1.1000 των 50 ms (p13), ισχύος 45 dB και χρόνο κορεσμού (d20) 2 s. Οι off resonance και on resonance τιμές που χρησιμοποιήθηκαν στα φάσματα STD ήταν 60.0 και -0.8 ppm, αντίστοιχα.

5. Συγκρυστάλλωση μορίων με την πρωτεΐνη PB1A5

Η κρυσταλλογραφία μακρομορίων, η οποία περιλαμβάνει την κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και μεγαλύτερων μακρομοριακών συμπλεγμάτων όπως είναι οι ιοί και τα ριβοσώματα, βασίζεται σε ένα πολυπαραγοντικό σύνολο αρχών, προηγούμενων προσπαθειών και ιδεών. Δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη θεωρία ή ακόμη μια καλή βάση δεδομένων για καθοδήγηση, αν και με τον καιρό, αποκτάται μια εμπειρία, η οποία θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμη. Επομένως η απόκτηση κρυστάλλου εναποτίθεται στην εμπειρία του ερευνητή κατά κύριο λόγο και απαιτεί υπομονή και διαίσθηση.

Στην πραγματικότητα υπάρχουν δύο φάσεις στη διαδικασία ανάκτησης ενός κρυστάλλου κατάλληλου να υποστεί τη διαδικασία της περίθλασης ακτίνων X και αυτές είναι (α) η ταυτοποίηση του χημικού, βιοχημικού και φυσικού περιβάλλοντος-συνθηκών όπου προκύπτει κρύσταλλος, ανεξάρτητα του αν αυτός είναι κατάλληλος για το πείραμα ή όχι και (β) η συστηματική διαφοροποίηση των αρχικών αυτών συνθηκών σε σταδιακά βήματα ώστε να ληφθούν τα βέλτιστα δείγματα για την περίθλαση των ακτίνων X. Το πρώτο βήμα συνοδεύεται με μεγαλύτερο ρίσκο καθώς κάποιες πρωτεΐνες δε σχηματίζουν εύκολα κρυστάλλους και τα αίτια είναι είτε απόντα είτε παραπλανητικά. Το δεύτερο ωστόσο, συχνά αποδεικνύεται πως είναι το πιο απαιτητικό χρονοβόρο και αγχωτικό. Δύο είναι επίσης και οι προσεγγίσεις στη σάρωση κρυσταλλογραφικών συνθηκών. Η πρώτη είναι μια συστηματική αλλαγή των παραμέτρων που θεωρούνται πιο σημαντικές για την κρυστάλλωση π.χ. το είδος του παράγοντα κατακρήμνισης, η συγκέντρωση, το pH, η θερμοκρασία κτλ. Η δεύτερη είναι αυτή που θα χαρακτηρίζαμε προσέγγιση «τουφέκι», αλλά στη περίπτωση αυτή ο στόχος σημαδεύεται έχοντας εμπειρία και συσσωρευμένη γνώση. Εφόσον παρατηρηθούν κρύσταλλοι πρωτεϊνικής προέλευσης, αρχίζει το στάδιο της βελτιστοποίησης. Κάθε συστατικό του διαλύματος στο οποίο προέκυψαν κρύσταλλοι, θα πρέπει να καταγραφεί (buffer, αλάτια, ιόντα κτλ.) μαζί με το pH, τη θερμοκρασία αλλά και άλλους παράγοντες. Κάθε ένας παράγοντας έπειτα μεταβάλλεται προσεκτικά και σταδιακά σε επιπρόσθετες δοκιμές, οι οποίες περιλαμβάνουν μια διεύρυνση των συνθηκών που έδωσαν τον αρχικό κρύσταλλο. Καθώς το πρόβλημα δεν είναι γραμμικό, αλλά μπορεί μια παράμετρος να συνδέεται με κάποια άλλη η διαδικασία είναι περισσότερο πολύπλοκη από αυτό που θα περίμενε κανείς.

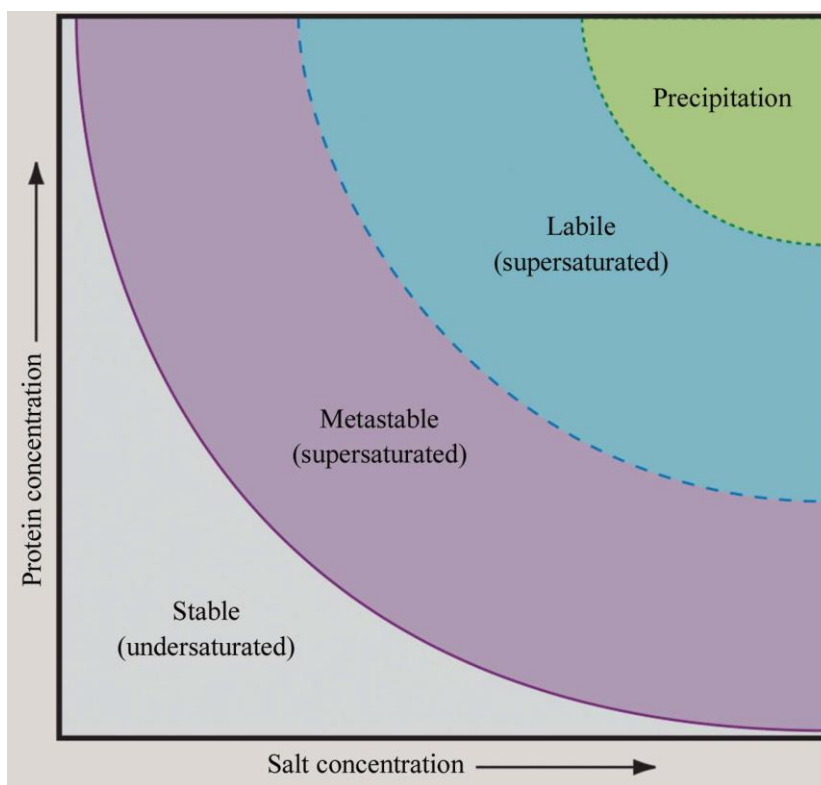
IYCr crystallization series

Table 4
Factors affecting crystallization.

Physical	Chemical	Biochemical
1. Temperature/temperature variation 2. Surfaces/heterogeneous nucleants 3. Methodology/approach to equilibrium 4. Mother-liquor volume 5. Geometry of chamber or capillary 6. Gravity 7. Pressure 8. Time 9. Vibrations/sound/mechanical perturbations 10. Electrostatic/magnetic fields 11. Dielectric properties of the medium 12. Viscosity of the medium 13. Rate of equilibration	1. pH 2. Precipitant type 3. Final precipitant concentration 4. Ionic strength 5. Cation type and concentration 6. Anion type and concentration 7. Degree of supersaturation 8. Reductive/oxidative environment 9. Concentration of the macromolecule 10. Metal ions 11. Initial precipitant concentration 12. Cross-linkers/polyions 13. Detergents/surfactants/amphophiles 14. Non-macromolecular impurities 15. Chaotropes	1. Purity of the macromolecule/nature of impurities 2. Ligands, inhibitors, effectors 3. Aggregation state of the macromolecule 4. Post-translational modifications 5. Source of macromolecule 6. Proteolysis/hydrolysis 7. Chemical modifications 8. Genetic modifications 9. Inherent symmetry of the macromolecule 10. Degree of denaturation 11. Isoelectric point 12. Unstructured regions 13. His tags, purification tags 14. α-Helix content 15. Conformational states 16. Thermal stability 17. Allowable pH range 18. History of the sample

Εικόνα 26 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία της κρυστάλλωσης των πρωτεϊνών (McPherson, 2004)

Η κρυστάλλωση ενός μορίου προχωράει σε δύο ξεχωριστά αλλά αδιαχώριστα στάδια: τη δημιουργία του αρχικού πυρήνα (nucleation) και την επέκταση (growth). Η δημιουργία του αρχικού πυρήνα είναι θεωρητικά το δυσκολότερο στάδιο, καθώς αντιπροσωπεύει μία μεταβολή φάσης 1^{ης} βαθμίδας στην οποία τα μόρια περνούν από την πλήρη αταξία που βρίσκονται στο διάλυμα, στην τάξη. Τα πρώτα αυστηρά διατεταγμένα συγκροτήματα πρωτεϊνών, καλούνται κρίσιμοι πυρήνες και αυτοί πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν με βάση τις μοριακές του διαστάσεις και τον υπερκορεσμό. Αυτός είναι απαραίτητος για την κρυστάλλωση. Πρόκειται για μία μη σταθερή κατάσταση, κατά την οποία κάποια ποσότητα του μακρομορίου ξεπερνά το όριο διάλυσης κάτω από συγκεκριμένες χημικές και φυσικές συνθήκες, αλλά είναι παρούσα και στο διάλυμα. Η σταθεροποίηση επιτυγχάνεται μέσω της επίτευξης της στερεής κατάστασης που γίνεται με τους κρυστάλλους, καθώς το όριο κορεσμού κατορθώνεται. Στην πράξη ξεκινάει κανείς με ένα διάλυμα, στο οποίο η πρωτεΐνη βρίσκεται σε συγκέντρωση κάτω από το όριο διαλυτότητας ή στο μέγιστο αυτού. Ο σκοπός είναι η επίτευξη της μείωσης της διαλυτότητας ώστε να επέλθει υπερκορεσμός στο διάλυμα.



Εικόνα 27 Το διάγραμμα φάσεων για την κρυστάλλωση μακρομορίων. Το διάγραμμα της διαλυτότητας διαιρείται στην περιοχή του υπο-κορεσμού και στην περιοχή του υπερκορεσμού και η γραμμή δηλώνει μέγιστη διαλυτότητα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις παράγοντα κατακρήμνισης ο οποίος μπορεί να είναι είτε ένα πολυμερές είτε ένα άλας. Η γραμμή υποδηλώνει την ισορροπία μεταξύ της στερεάς φάσης και του διαλύματος. Η περιοχή του υπερκορεσμού διαχωρίζεται περαιτέρω με πιο ασαφή βέβαια τρόπο στη μετασταθή και στην ασταθή φάση. Στη μετασταθή κατάσταση οι πυρήνες θα αναπτυχθούν σε κρυστάλλους αλλά δεν θα συμβεί δημιουργία αρχικού πυρήνα. Στην ασταθή φάση μπορεί να συμβούν και οι 2 διαδικασίες. Τέλος σε υψηλό βαθμό υπερκορεσμού βρίσκεται η περιοχή κατακρήμνισης, όπου αυτό το αποτέλεσμα είναι και το πλέον επιθυμητό. Οι κρύσταλλοι μπορούν να προκύψουν μόνο από ένα διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού και η δημιουργία ενός τέτοιου διαλύματος για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει αποτελεί και τον άμεσο στόχο στη διαδικασία της παραγωγής κρυστάλλων (McPherson, 2004)

Οι προσεγγίσεις που υπάρχουν για αυτό είναι διάφορες και μπορεί να αφορούν (α) τη μεταβολή της πρωτεΐνης (π.χ. με αλλαγή του pH, πράγμα που μεταβάλλει τον ιονισμό των αμινοξέων στο εξωτερικό της πρωτεΐνης), (β) τη μεταβολή της χημικής δραστηριότητας του νερού (π.χ. με προσθήκη άλατος), (γ) τη μεταβολή του βαθμού που αλληλεπιδρούν τα μόρια της πρωτεΐνης μεταξύ τους (π.χ. με αλλαγή του pH, με προσθήκη αντισταθμιστικών ιόντων) ή και (δ) με αλλαγή της φύσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων της πρωτεΐνης και του διαλύτη (π.χ. με προσθήκη πολυμερών ή ιόντων) (McPherson, 2004).

Τα μόρια που προκύπτουν από τις διάφορες μεθόδους σάρωσης, περνούν τελικά στη διαδικασία της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X με σκοπό τον καθορισμό της τρισδιάστατης δομής υπό την οποία πραγματοποιείται η πρόσδεση.

Αυτό θεωρείται ιδιαίτερα κρίσιμο στάδιο, καθότι το επόμενο βήμα είναι η συνθετική βελτιστοποίηση με βάση την τρισδιάστατη δομή. Υπολογιστικά εργαλεία εικονικής σάρωσης μπορούν να βοηθήσουν στην επιλογή συγκεκριμένων μορίων. Με τη χρήση ligand-based μεθόδων σαρώνονται βιβλιοθήκες εκατομμυρίων μορίων, χρησιμοποιώντας ως μόριο-οδηγό ένα μόριο-θραύσμα που είναι γνωστό πως προσδένεται στην πρωτεΐνη. Στα hits που βρίσκονται υψηλότερα στην κατάταξη μπορούν να γίνουν και υπολογιστικές μελέτες πρόσδεσης, και τελικά επιλέγονται τα τελικά μόρια για την πειραματική διαδικασία.

Τα aliquotes της καθαρής PB1A(5) πάρθηκαν για κρυσταλλογραφία χρησιμοποιώντας το ρομπότ κρυσταλλογραφίας “mosquito” (TTP Labtech, Royston UK). Η σάρωση των συνθηκών έγινε σε Greiner plates των 3 πηγαδιών χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικές αναλογίες παράγοντα κατακρήμνισης και πρωτεΐνης για κάθε κρυσταλλογραφική συνθήκη (200+100 nL, 150+150nL και 100+200nL). Τα πειράματα έγιναν με τη μέθοδο διάχυσης ατμών της «καθιστής σταγόνας» στους 277 K και στους 293K. Ως κρυοπροστατευτικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα που αντιστοιχούσε σε κάθε πηγάδι μαζί με 20% επιπλέον αιθυλένογλυκόλη και ο κρύσταλλος ψύχθηκε άμεσα με τη χρήση υγρού άζωτου. Κρυστάλλους παρατηρήσαμε μέσα στις επόμενες δύο μέρες. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

6. ITC

Τα πειράματα που έγιναν στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης πραγματοποιήθηκαν σε ένα VP-ITC θερμιδόμετρο στους 25°C. Το buffer που χρησιμοποιήθηκε είχε την παρακάτω σύσταση: 20mM HEPES pH=7.5, 150mM NaCl και 0.5mM TCEP. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 200μM και του μικρού μορίου 30μM. Η ανάλυση δεδομένων έγινε με το λογισμικό TA Nanoanalyze. Τα διορθωμένα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε μοντέλο ενός σημείου πρόσδεσης, χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο ελαχιστοποίησης μη γραμμικών ελαχίστων τετραγώνων και υπολογιστήκαν οι παράμετροι πρόσδεσης συμπεριλαμβανομένων της μεταβολής της ενθαλπίας αντίδρασης (ΔH), της μεταβολής της εντροπίας της αντίδρασης (ΔS), της σταθεράς διάστασης (K_d) και η στοιχειομετρία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

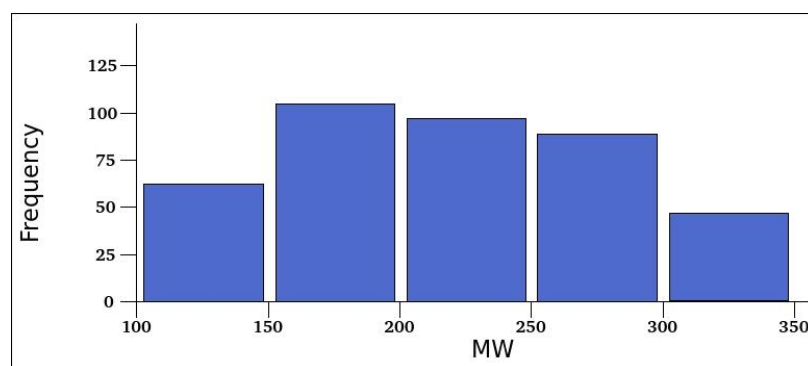
1. Η βιβλιοθήκη μορίων-θραυσμάτων

Έγινε καταγραφή των μορίων που ήταν διαθέσιμα ως αντιδραστήρια στα εργαστήρια σύνθεσης του τομέα. Τα μόρια μετατράπηκαν σε αρχεία .sdf τα οποία περιέχουν δομική πληροφορία ώστε να είναι δυνατή η δημιουργία μιας ψηφιακής βιβλιοθήκης. Το αρχείο αυτό, συνενώθηκε με ένα αρχείο ίδιου τύπου το οποίο περιείχε τις δομές της βιβλιοθήκης PharmaLab, που ανήκει στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. Έπειτα από την καταγραφή των μορίων που βρίσκονταν στη διάθεση μας, ακολούθησε η επιλογή των μορίων από τα οποία τελικά θα αποτελείται από μόρια-θραύσματα που θελήσαμε να δημιουργήσουμε. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Χημειοπληροφορικής της Schrödinger, Canvas. Το software Canvas, παρέχει τη δυνατότητα υπολογισμού φυσικοχημικών περιγραφικών μεταβλητών (Μοριακό Βάρος, Λιποφιλία, αριθμός δακτυλίων, αριθμός ατόμων που λειτουργούν ως δέκτες δεσμού υδρογόνου και αριθμός ατόμων που λειτουργούν ως δότες δεσμού υδρογόνου κ.α.), καθώς και 2D αλλά και 3D descriptors. Οι 2D μεταβλητές που μπορεί να εξετάζονται μπορεί να αφορούν συνδυασμούς ατόμων/δεσμών ή και δείκτες ομοιότητας, ενώ οι 3D μεταβλητές μπορεί να αφορούν φαρμακοφορικά χαρακτηριστικά (Pharmacophore fingerprint) όπως είναι οι υδρόφοβες ομάδες, οι ομάδες που συμμετέχουν σε δεσμό υδρογόνου και οι ομάδες που σχηματίζουν γέφυρες άλατος και η πιθανή χωροθέτηση αυτών. Ενώ με τον υπολογισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών φιλτράρονται τα υποψήφια μόρια και εντέλει αποφασίζεται ποια μόρια μπορούν να συμπεριληφθούν στη βιβλιοθήκη με τα μόρια-θραύσματα, ο υπολογισμός δισδιάστατων και τρισδιάστατων χαρακτηριστικών θα μας βοηθήσει να αξιολογήσουμε την ποικιλομορφία των δομών που θα διαθέτει η βιβλιοθήκη. Κατά αυτόν τρόπο λοιπόν πραγματοποιήθηκε το αρχικό φιλτράρισμα και επιλέχθηκαν μόρια με τα παρακάτω φυσικοχημικά χαρακτηριστικά :

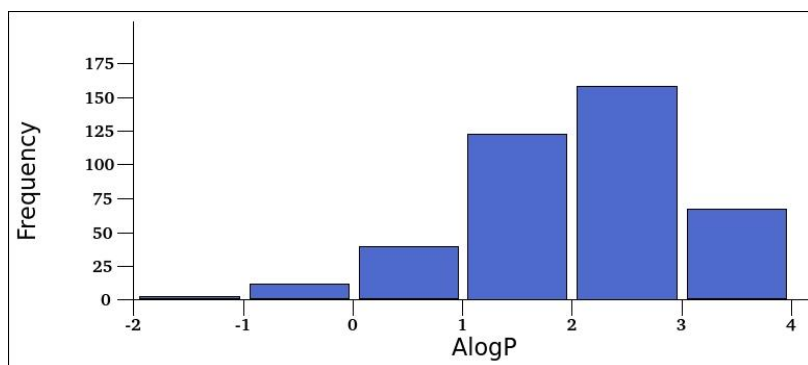
- $MW \leq 350Da$
- $LogP \leq 3.5$
- $HBA \leq 6$
- $HBD \leq 3$

Παρατηρείται πως τα κριτήρια με τα οποία επιλέχθηκαν τα τελικά μόρια της βιβλιοθήκης αποκλίνουν από τον κανόνα του 3. Η βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε εντέλει περιείχε 399 μόρια. Ωστόσο σύμφωνα με τους Köster et al. (Köster et al., 2011), ο σχεδιασμός μιας βιβλιοθήκης που δεν υπακούει πιστά στον παραπάνω κανόνα, επιτρέπει μεγαλύτερη εποπτεία του χημικού σύμπαντος, ενώ αποδείχθηκε πως το μεγαλύτερο μέρος των μορίων που κατάφεραν να αναστείλουν την πρωτεΐνη που μελετήθηκε (7 στα 11 μόρια) θα έπρεπε να αποκλειστεί από την βιβλιοθήκη που σχεδιάστηκε από το γκρουπ, σύμφωνα με τον κανόνα του 3. Αναλυτική περιγραφή των μορίων της βιβλιοθήκης παρουσιάζεται στο Παράρτημα 1. Στη συνέχεια τα μόρια της βιβλιοθήκης αποθηκεύτηκαν σε μορφή stock διαλυμάτων συγκέντρωσης 10mM σε DMSO και φυλάχτηκαν στους 4 °C.

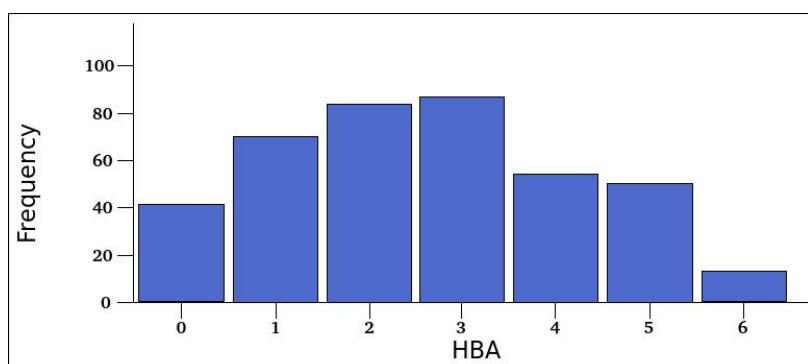
Ακολουθούν διαγράμματα στα οποία παρουσιάζεται η κατανομή του μοριακού βάρους, της λιποφιλίας, του αριθμού των δεκτών και των δοτών δεσμού υδρογόνου των περιστρεφόμενων δεσμών, των βαρέων ατόμων, της πολικής επιφάνειας αλλά και των χειρόμορφων κέντρων στα μόρια της βιβλιοθήκης.



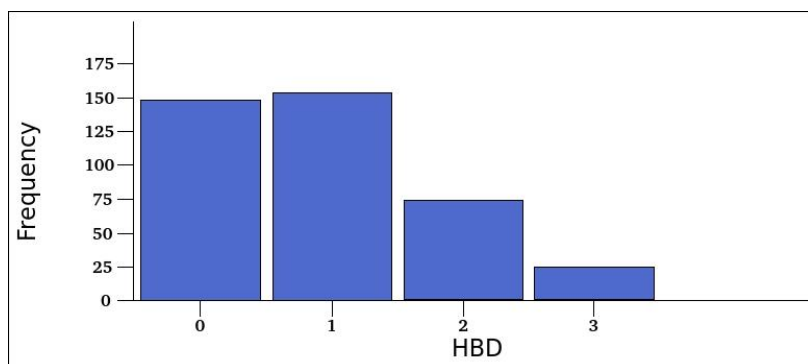
Εικόνα 28 Η κατανομή του μοριακού βάρους στα μόρια της βιβλιοθήκης



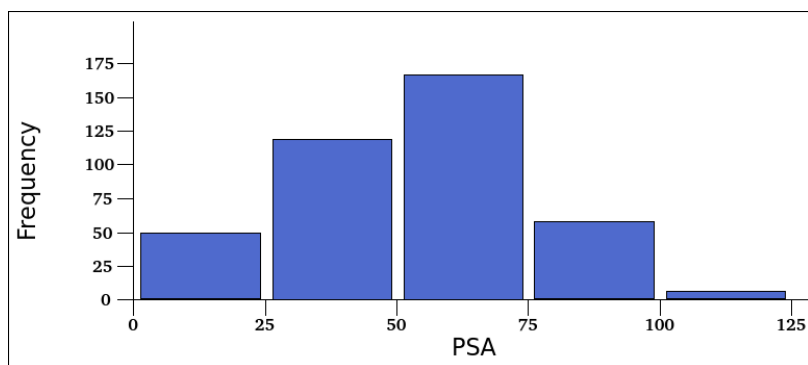
Εικόνα 29 Η κατανομή του $\log P$ στα μόρια της βιβλιοθήκης



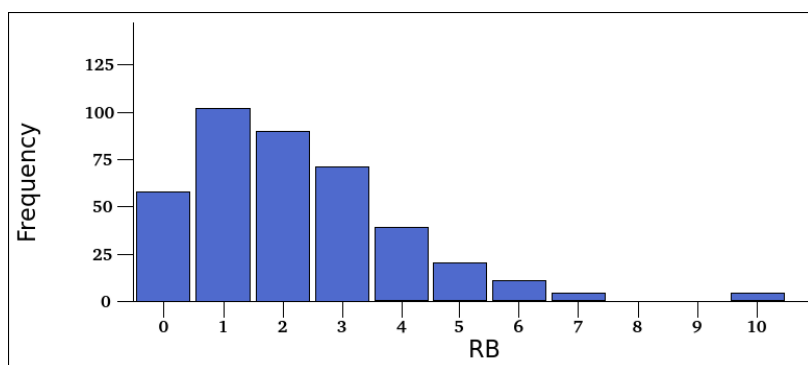
Εικόνα 30 Η κατανομή του αριθμού των ατόμων που είναι δέκτες δεσμού υδρογόνου στα μόρια της βιβλιοθήκης



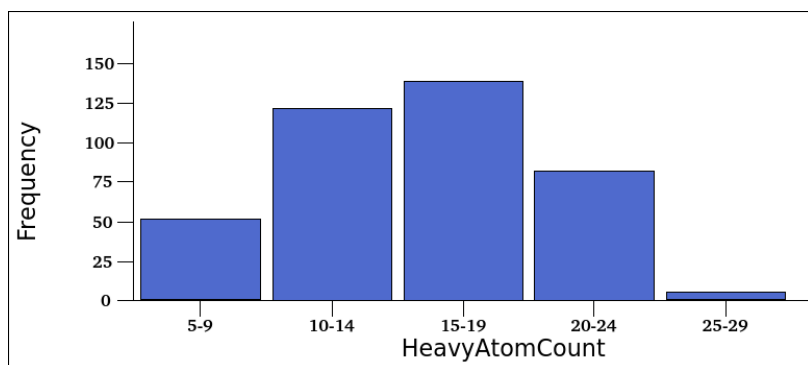
Εικόνα 31 Η κατανομή των ατόμων που είναι δότες δεσμού υδρογόνου στα μόρια της βιβλιοθήκης



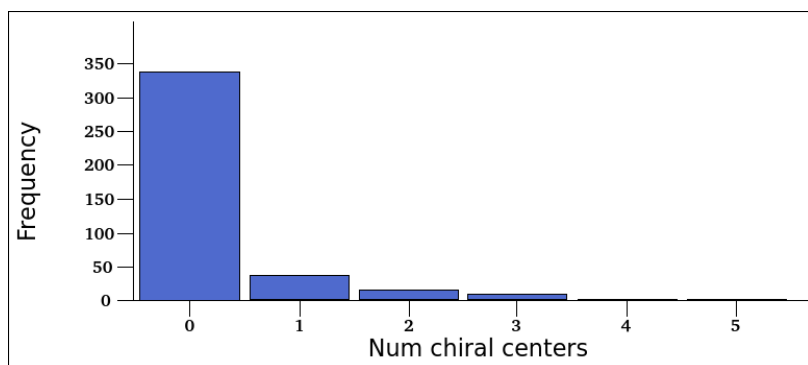
Εικόνα 32 Η κατανομή της πολικής επιφάνειας στα μόρια της βιβλιοθήκης



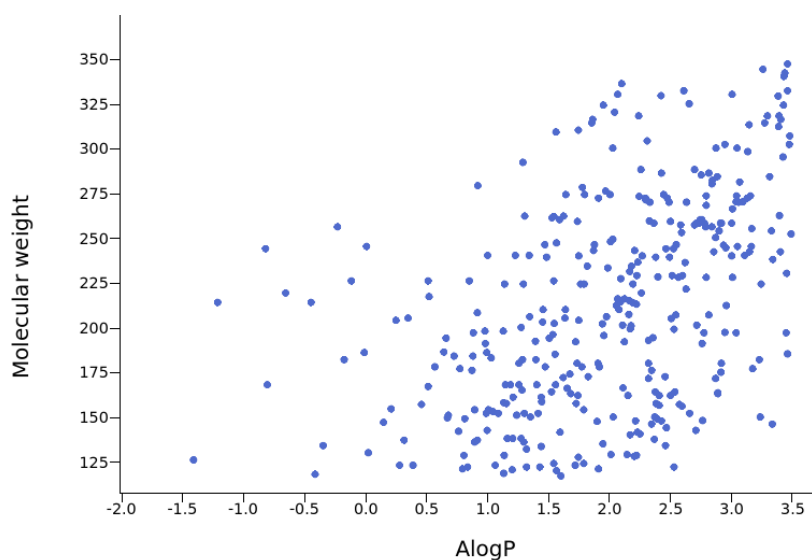
Εικόνα 33 Η κατανομή των περιστρεφόμενων δεσμών στα μόρια της βιβλιοθήκης



Εικόνα 34 Η κατανομή των βαρέων ατόμων στα μόρια της βιβλιοθήκης



Εικόνα 35 Η κατανομή του αριθμού των χειρόμορφων κέντρων στα μόρια της βιβλιοθήκης



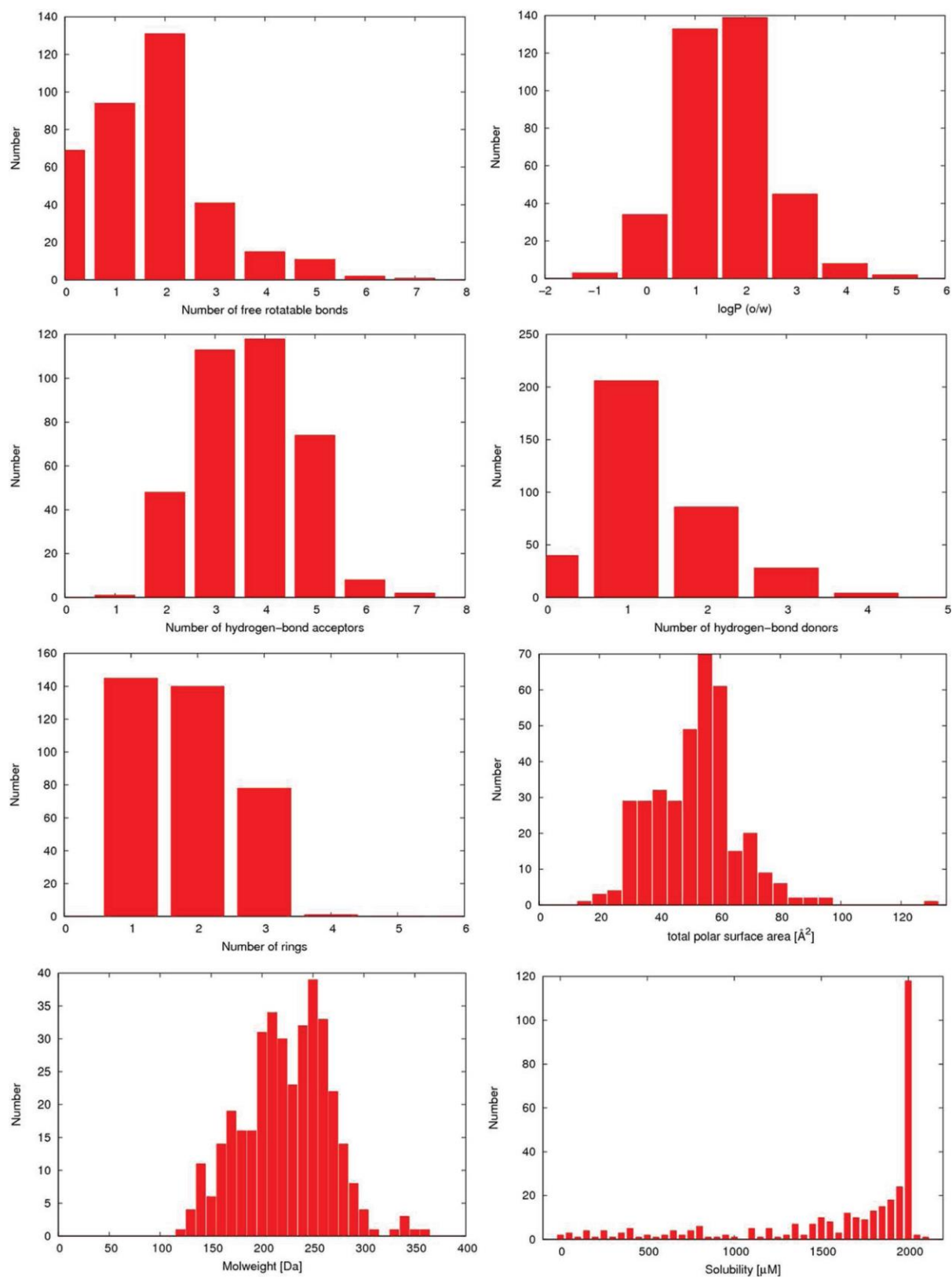
Εικόνα 36 Συσχέτιση μεταξύ μοριακού βάρους και λιποφιλίας στα μόρια της βιβλιοθήκης

Ακολουθούν στοιχεία από βιβλιοθήκες μορίων θραυσμάτων οι οποίες έχουν αναπτυχθεί από διάφορες εταιρείες αλλά και από άλλες εργασίες FBDD εντός πανεπιστημιακών ιδρυμάτων και ερευνητικών κέντρων.

Company	Screening method	Library size	MW (Da)	Solubility check	Special features	Synthetic feasibility
Abbott [78]	X-ray/NMR	10,000	MW _{mean} : 210	–	–	–
Astex [10]	X-ray	327	100–250	–	Drug ring systems and preferred sidechains used	–
AstraZeneca [79]	HCS ^a /NMR	150–40,000 (library size adjusted to screening method and target)	HA ^b < 20	$-2 \leq c \log P \leq 3$ if $c \log P \geq 2.2$ for neutral compounds, solubility is measured	–	Availability of analogues
deCode [37]	X-ray	1329	<350	$-2 \leq c \log P \leq 4$	3 parts: -natural small molecule metabolites -metabolite-like + bioisosteres -protein architecture mimetics	–
IOTA Pharmaceuticals (http://www.iotapharma.com)	HCS/SPR	1500	HA < 22	$\log P \leq 3$	SCA ^c diversified	Fragments from med. chem. projects, many analogues available
Novartis [14]	NMR	2826	<300	$\log P \leq 3$	816 unique scaffolds	Masked linker group present, N + O atoms > 2
Plexxikon [80]	HCS/X-ray	20,000	125–350	–	–	–
Roche [81]	SPR	2000	–	–	–	–
Schering-Plough [82]	NMR	10,000	50% of lib is rule-of-three compliant	–	–	–
SGX [67,83]	X-ray	800	100–220	–	50% contains Br	2 or more subst. to facilitate analogue synthesis
Vernalis [76]	NMR	1063	100–250	Calc. solubility [84]	Diversity check using Ph4 triangles	Tractability check
Vertex [85]	NMR	5000 (+focused libs)	100–300	$c \log P \leq 3$, solubility predictor	Diversity by cluster and pick	Combichem accessible linkers ≥3 N + O atoms ≥10 near neighbour analogues
ZoBio/Pyxis [6]	NMR	2000	MW _{mean} : 217.5	–	4 parts: -SCA diverse set -amino acid derivatives -drugs/natural products -shape diversity approach	–

^a High-concentration screening.
^b Heavy atoms.
^c Scaffold complexity analysis.

Εικόνα 37 Χαρακτηριστικά βιβλιοθηκών μορίων-θραυσμάτων που έχουν αναπτυχθεί σε εταιρείες (Boyd and de Kloe, 2010)



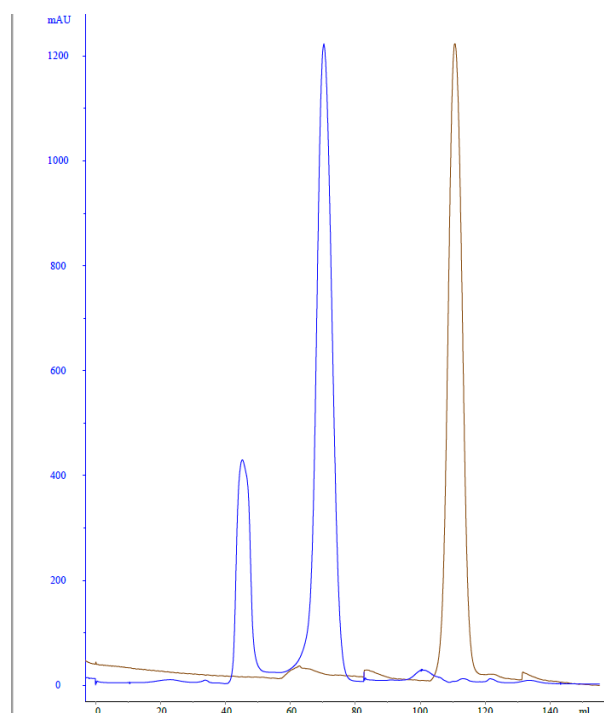
Εικόνα 38 Στοιχεία της βιβλιοθήκης μορίων-θρανσμάτων που κατασκευάστηκε από τους Köster et al. η οποία δεν υπακούει στον κανόνα του 3 (Köster et al., 2011)

Στοιχεία από την εργασία των Over et al. δείχνουν πως η βιβλιοθήκη με θραύσματα τα οποία προέρχονται από φυσικά προϊόντα διαθέτει $AlogP \leq 3.5$, μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 120-350 Da, $HBD \leq 3$ και $HBA \leq 6$ (Over et al., 2013).

Συγκρίνοντας τα παραπάνω στοιχεία με τα δικά μας αποτελέσματα, παρατηρήθηκε πως η βιβλιοθήκη μας έχει αρκετές διαφορές από εκείνες των εταιρειών, οι οποίες είναι στην πλειοψηφία τους πιστές στον κανόνα του 3, αλλά και πιο μεγάλες σε μέγεθος. Παρατηρήθηκε επίσης πως ορισμένες εταιρείες επέλεξαν να μην έχουν το μοριακό βάρος ως κριτήριο αλλά τον αριθμό βαρέων ατόμων. Ωστόσο σε σύγκριση με τις δύο εργασίες από ερευνητικά-πανεπιστημιακά ιδρύματα, παρατηρείται πως η βιβλιοθήκη που δημιουργήθηκε έχει παρόμοια χαρακτηριστικά και σε σύγκριση με τη βιβλιοθήκη των Köster et al μάλιστα διαθέτει και μεγαλύτερο ποσοστό μορίων μικρότερου μεγέθους.

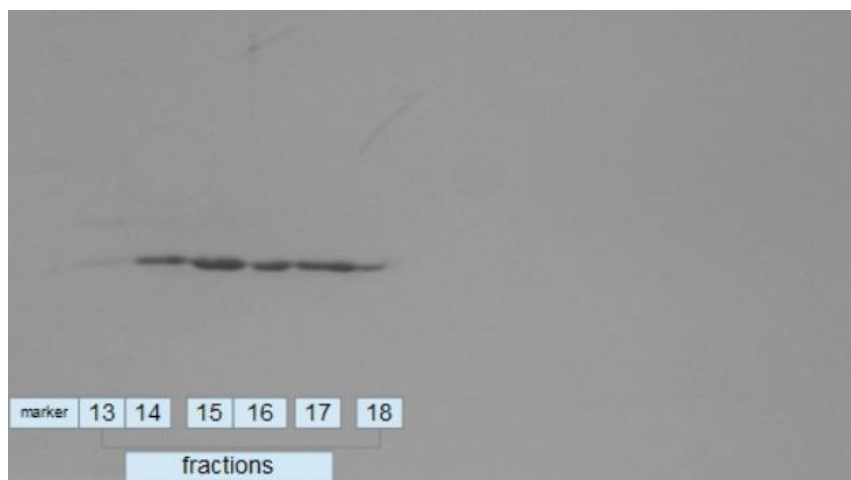
2.Καθαρισμός της πρωτεΐνης PB1A5

Παρατίθεται η εικόνα από το χρωματογράφημα μετά την αποκοπή του His-tag. Παρατηρείται μια μικρότερη κορυφή η οποία οφείλεται στη δημιουργία διμερών.



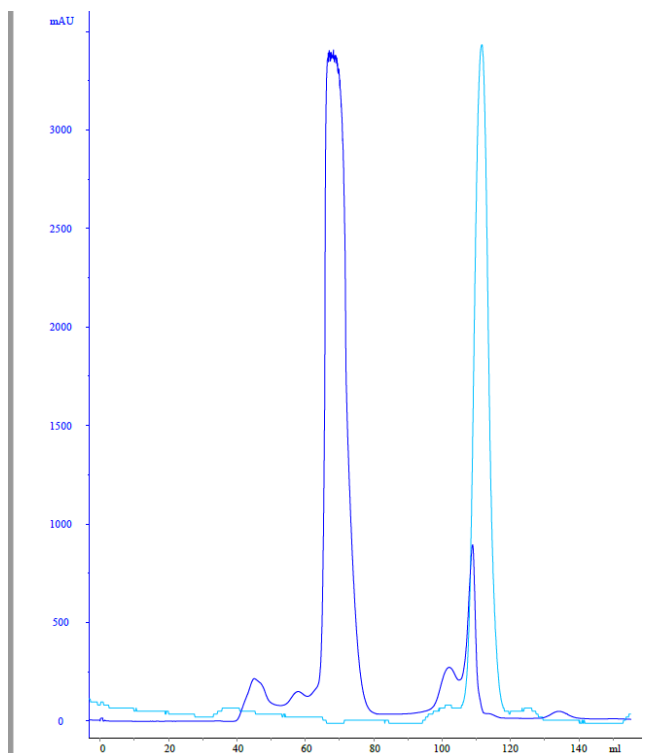
Εικόνα 39 Το χρωματογράφημα μετά την κατεργασία με την TEV πρωτεάση.

Ακολουθεί η φωτογραφία από το gel SDS-PAGE των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από τη SEC με την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.



Η συνολική ποσότητα της καθαρής πρωτεΐνης χωρίς το His-tag μετά την SEC είναι 6,25mg σε συγκέντρωση 12,5mg/mL. Η μικρή απόδοση οφείλεται στο γεγονός ότι κατά το τελικό στάδιο της συμπύκνωσης παρατηρήθηκε καθίζηση της πρωτεΐνης λόγω χαμηλής συγκέντρωσης άλατος και για αυτό το λόγο αυξήσαμε τη συγκέντρωση του άλατος στα 300mM κατά το τελικό στάδιο της συμπύκνωσης. Η πρωτεΐνη καταψύχθηκε με υγρό άζωτο και φυλάχθηκε στους -80.

Για την κρυστάλλωση έγινε rebuffering της πρωτεΐνης χωρίς το His-tag και παρακάτω παρατίθεται το χρωματογράφημα από την SEC. Το buffer που χρησιμοποιήθηκε για το gel filtration έχει την παρακάτω σύσταση: 10mM HEPES pH=7.5, 500mM NaCl, 5% Γλυκερόλη και 0.2 mM TCEP. Ακολούθησε συγκέντρωση της πρωτεΐνης στα 13 mg/mL.



Εικόνα 40 Το χρωματογράφημα της SEC μετά το rebuffering

Συγκρίνοντας τις 2 διαφορετικές διαδικασίες καθαρισμού τις πρωτεΐνης που ακολουθήθηκαν στα 2 εργαστήρια, παρατηρούμε πως η διαδικασία στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης με το gel filtration είναι πολύ πιο αποδοτική, καθώς οδηγεί στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης.

3.Αποτελέσματα από DSF

Η συλλογή των 399 μορίων-θραυσμάτων που προέκυψε από τα αντιδραστήρια του Τομέα φαρμακευτικής Χημείας και της PharmaLab, μεταφέρθηκε σε πλάκες 96 φρεατίων, διαλυμένα σε DMSO, ώστε να γίνουν πειράματα σάρωσης υψηλής αποτελεσματικότητας. Πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την ομάδα του καθηγητή Κ. Βοργιά στο Τμήμα Βιολογίας τα πειράματα φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης (DSF). Στα πειράματα αυτά συγκρίναμε ποιοτικά τις καμπύλες φθορισμού για το PB1A5. Ακολουθούν τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε hit-map (με κόκκινο χρώμα τα μόρια που έδωσαν $\Delta T_m > 1$ και με πράσινο όσα έχουν είτε αρνητικό ΔT_m , είτε $\Delta T_m < 1$).

17A2	17E6	20C2	14B11	19F10	19A9
17A5	19D3	20C3	14C4	19F11	19A10
17A6	19D4	15B6	14C5	19G2	19A11
17A9	19D5	15B11	14C6	19G3	19B2
17A10	19D6	15E5	14C7	20A2	19B3
17B2	19D7	15E8	14B6	20A3	19B4
17B3	19D8	15F2	14A3	20A9	19B5
17B6	19D9	15F5	14D2	20A10	19B6
17B7	19D10	15H10	14B7	20A11	19B7
17B11	11E6	11C9	14H11	20B6	19B8
17C2	19D11	11B3	19A2	20B9	19B9
17C3	19E2	17E7	19A3	20C4	19B10
17C4	19E3	17E8	19E8	20C5	19B11
17C7	19E4	17E11	19E9	15D4	19C2
17C8	19E5	17F4	19E10	15D8	19C3
17C11	19E6	17F6	19E11	15E6	19C4
17D2	19E7	17F7	19F2	15E9	19C5
17D5	19H10	17H5	19F3	15F3	19C7
17D9	19H11	14D9	19F4	15F7	19C8
17D10	20A6	14D8	19F5	15H11	19C9
17E2	20A7	14B8	19F6	11C10	19C10
17E3	20A8	14D7	19F7	11E4	19C11
17E4	20B5	14B10	19F8	19A7	19D2
17E5	20B8	14C3	19F9	19A8	19G4
15H2	19G5	19G9	19H3	19H7	20A5
11B11	19G6	19G10	19H4	19H8	20B2
11B2	19G7	19G11	19H5	19H9	20B3
11E5	19G8	19H2	19H6	20A4	20B4
19C1	20B7	20B10	20C6	20C10	15E2
15E2	15E7	15E3	15E11	15F4	

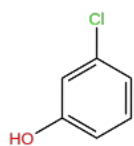
Το πείραμα DSF εκτελέστηκε πάλι στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης σε πάνελ με τα υπόλοιπα bromodomain του Polybromo 1 (PB1) με σκοπό τον προσδιορισμό της

εκλεκτικότητας. Τα πειράματα επιβεβαίωσαν τα συμπεράσματα που προέκυψαν από το Πανεπιστήμιο της Αθήνας.

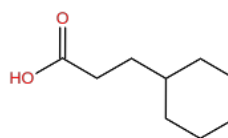
	PB1A5	PB1A4_Co88	PB1A2_Co14	PB1A3_Co23
11E6	0,83	0,65	0,11	-0,31
19B5	1,25	-0,14	0,03	-0,57
19D10	1,24	-1,18	-0,18	0,31
19C7	1,45	-0,21	0,04	-0,34
19C2	1,45	-0,07	-0,18	-0,14
19F10	0,61	0,13	-1,09	0,35
19E5	1,32	-0,09	-0,3	-0,05

Στο μόριο με κωδικό 19E5 έγινε και έλεγχος με την πρωτεΐνη BRD4, όπου βρέθηκε $\Delta T_m=0.3$.

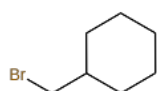
Ακολουθεί πίνακας με τις δομές των μορίων για τις οποίες πήραμε θετικά αποτελέσματα από το DSF.



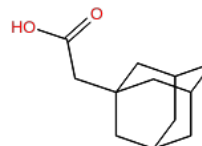
Εικόνα 1 Το μόριο με κωδικό 19C2



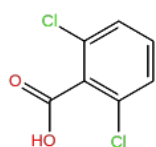
Εικόνα 2 Το μόριο με κωδικό 19C7



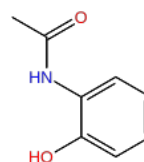
Εικόνα 3 Το μόριο με κωδικό 19D10



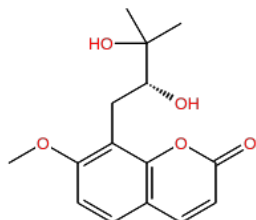
Εικόνα 2 Το μόριο με κωδικό 19E5



Εικόνα 4 Το μόριο με κωδικό 19F10



Εικόνα 5 Το μόριο με κωδικό 19B5

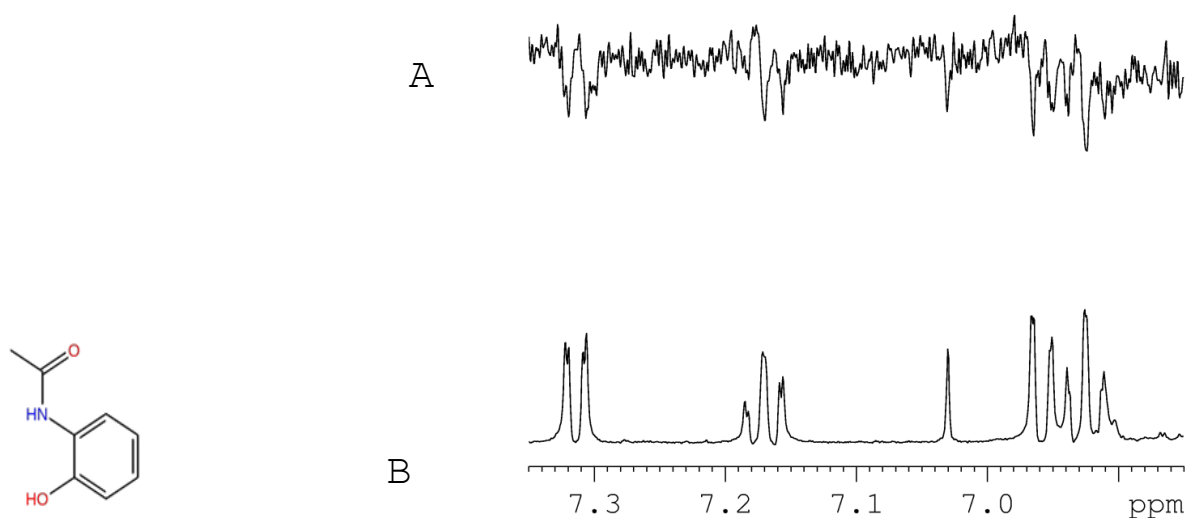


Εικόνα 6 Το μόριο με κωδικό 11E6

4.Αποτελέσματα από το πείραμα STD-NMR

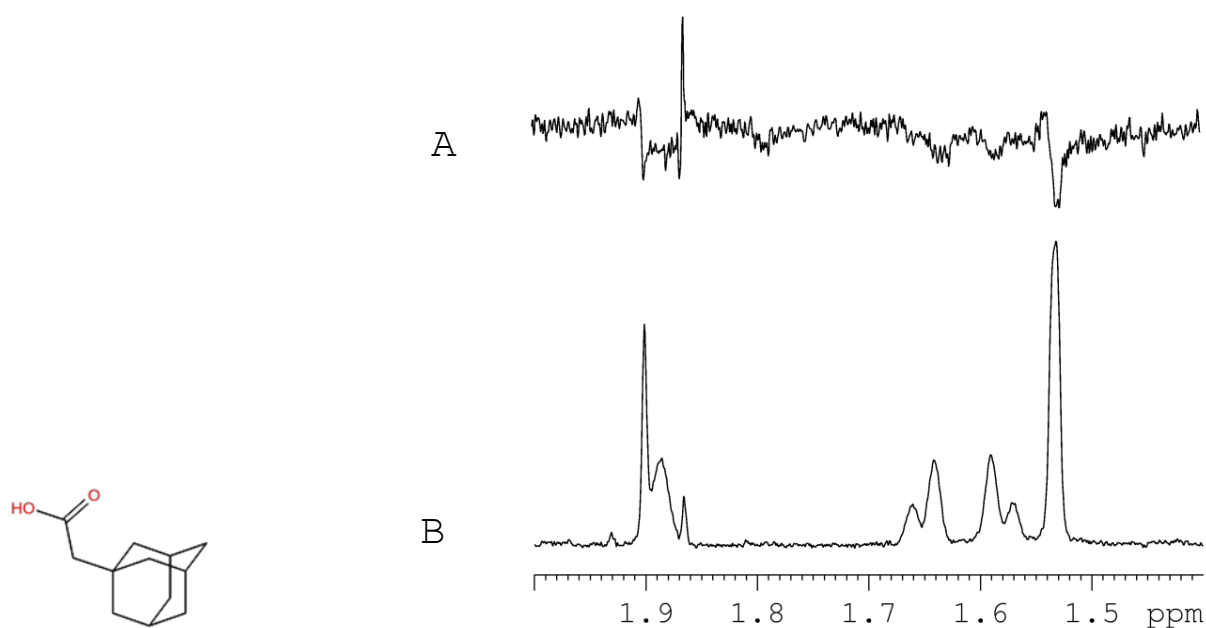
Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων από το πείραμα της φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης αποφασίστηκε να γίνει και πείραμα STD-NMR. Εξετάστηκαν 4 από τα παραπάνω μόρια λόγω μικρής ποσότητας της διαθέσιμης πρωτεΐνης, αλλά και της διαθεσιμότητας του οργάνου NMR.

Στην εικόνα 40 βλέπουμε τα φάσματα των πειραμάτων on και off resonance για το μόριο 19B5, το οποίο έχει ortho-υποκατάσταση και παρατηρούμε την μεταβολή της έντασης των τεσσάρων πρωτονίων στην αρωματική περιοχή του φάσματος.



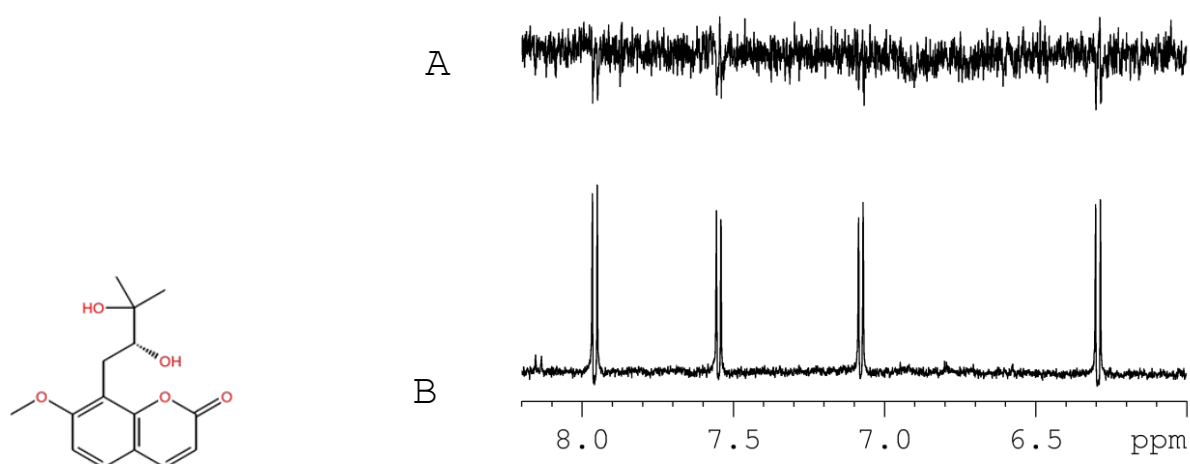
Εικόνα 41 (A) Το φάσμα STD-NMR του μορίου με κωδικό 19B5. Παρατηρούνται οι κορυφές των αρωματικών πρωτονίων του μορίου οι οποίες παρουσία της πρωτεΐνης εμφανίζουν αρνητικό NOE. (B) Το 1-D φάσμα του μορίου.

Στην εικόνα 41 βλέπουμε τα φάσματα on και off resonance για το μόριο 19E5 όπου παρατηρείται αλλαγή στη ένταση των αλειφατικών πρωτονίων του αδαμαντανίου.



Εικόνα 42 (Α) Το φάσμα STD για το μόριο με κωδικό 19E5. Παρατηρούνται οι κορυφές των πρωτονίων του αδαμαντανίου, που παρουσία της πρωτεΐνης εμφανίζουν αρνητικό NOE. (Β) Το 1-D φάσμα του μορίου.

Στην εικόνα 42 που ακολουθεί, παρατηρούμε τα φάσματα on και off resonance για το πείραμα STD-NMR που πραγματοποιήθηκε στο μόριο 11E6. Παρατηρούμε πάλι αλλαγή στις εντάσεις των τεσσάρων πρωτονίων του μορίου στην αρωματική περιοχή του φάσματος.



Εικόνα 43 (Α) Το φάσμα STD του μορίου με κωδικό 11E6. Παρατηρούνται οι κορυφές των αρωματικών πρωτονίων του μορίου να εμφανίζουν αρνητικό NOE λόγω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη. (Β) Το φάσμα 1-D του μορίου.

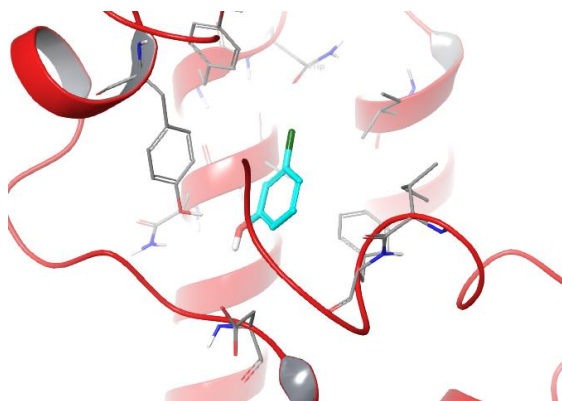
Επομένως με το πείραμα STD-NMR καταφέραμε να επιβεβαιώσουμε πως τρία από τα μόρια που βρέθηκαν με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης είναι όντως δραστικά καθώς παρατηρήθηκαν αλλαγές στις εντάσεις των κορυφών τους λόγω μεταφοράς του κορεσμού που είχαν υποστεί τα πρωτόνια της πρωτεΐνης. Επόμενο βήμα στη διαδικασία είναι ο προσδιορισμός του τρόπου πρόσδεσης του μορίου στην πρωτεΐνη ώστε να προχωρήσουμε στο σχεδιασμό μιας ένωσης-οδηγού με μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης.

5. Induced Fit Docking

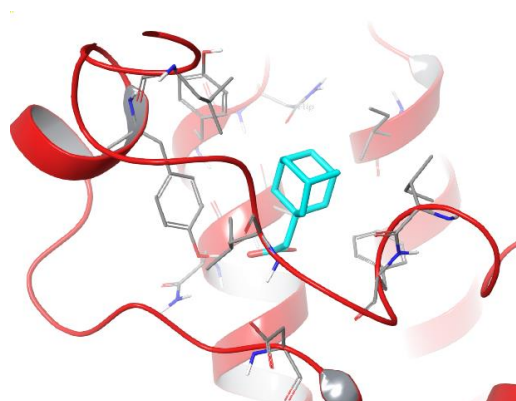
Σε συνέχεια των πειραμάτων σάρωσης υψηλής αποτελεσματικότητας και του STD-NMR, εκτελέστηκαν και δοκιμασίες εικονικής σάρωσης της βιβλιοθήκης των μορίων-θραυσμάτων που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο.

Εξαιτίας του ότι οι συναρτήσεις κατάταξης των αλγορίθμων που εκτελούν docking είναι προσαρμοσμένες συνήθως σε μόρια με φυσικοχημικές ιδιότητες φαρμάκου (drug-like), επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η ρουτίνα του Induced Fit Docking στο πακέτο λογισμικών του Maestro για να επιτευχθεί όσο μεγαλύτερη ακρίβεια είναι δυνατόν.

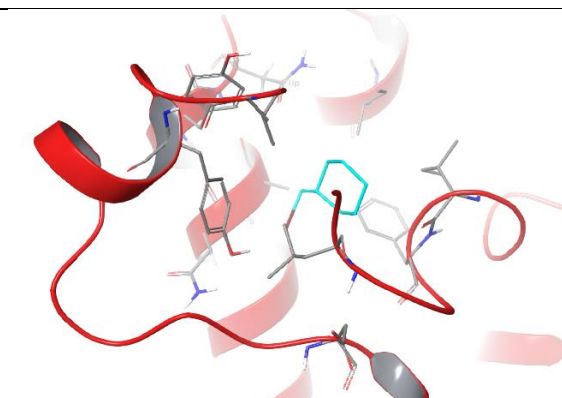
Παρατίθενται οι πόζες που πάρθηκαν από το Induced Fit Docking για τα συγκεκριμένα μόρια.



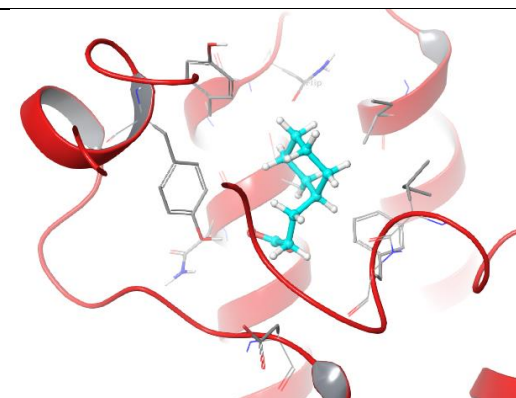
Εικόνα 1 Το μόριο 19C2 στην κοιλότητα της PB1A5



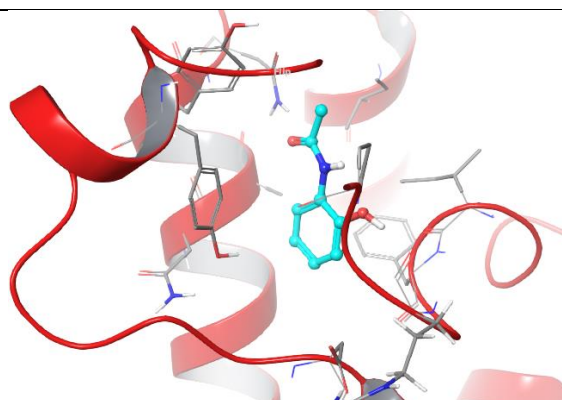
Εικόνα 2 Το μόριο 19E5 στην κοιλότητα της PB1A5



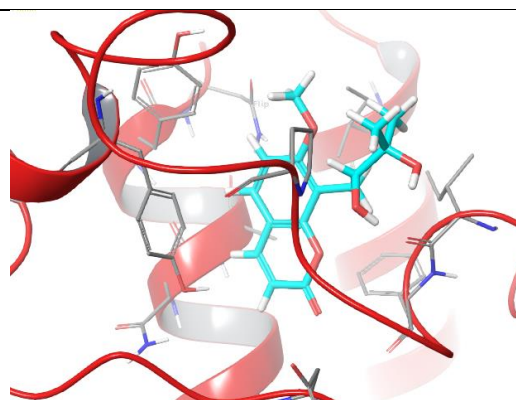
Εικόνα 3 Το μόριο 19D10 στην κοιλότητα της PB1A5



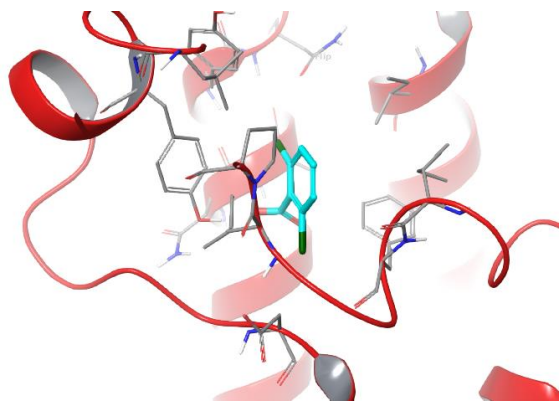
Εικόνα 4 Το μόριο 19C7 στην κοιλότητα της PB1A5



Εικόνα 5 Το μόριο 19B5 στην κοιλότητα της PB1A5



Εικόνα 6 Το μόριο 11E6 στην κοιλότητα της PB1A5



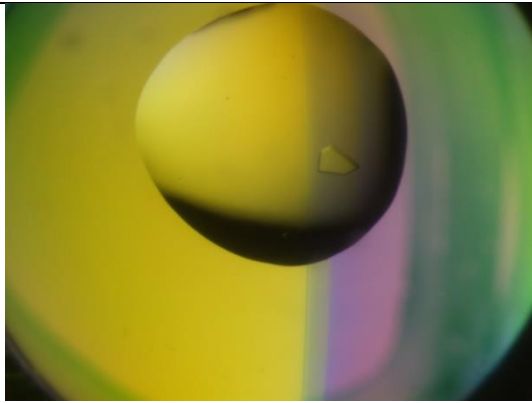
Εικόνα 23 Το μόριο 19F10 στην κοιλότητα της PB1A5

Με εξαίρεση το μόριο 19B5, κανένα από τα υπόλοιπα δε φαίνεται να αλληλεπιδρά με την Asn 707, που είναι το αμινοξύ που κάνει την βασική αλληλεπίδραση με το φυσικό υπόστρωμα (την ακετυλιωμένη λυσίνη δηλαδή). Τα υπόλοιπα μόρια είτε κάνουν δεσμούς υδρογόνου με το backbone του ZA loop (11E6), είτε κάνουν δεσμούς υδρογόνου με την Tyr664 που βρίσκεται στην πρωτεϊνική κοιλότητα, ενώ δεν αποκλείονται και οι δεσμοί υδρογόνου με τα μόρια νερού που είναι σταθερά στην πρωτεϊνική κοιλότητα (19C2, 19C7, 19F10, 19E5). Τέλος σε όλα τα μόρια που αναφέρθηκαν καθώς και το 19D10 συμμετέχουν εντροπικά φαινόμενα που σχετίζονται με την απομάκρυνση μορίων νερού υψηλής ενέργειας από την πρωτεϊνική κοιλότητα.

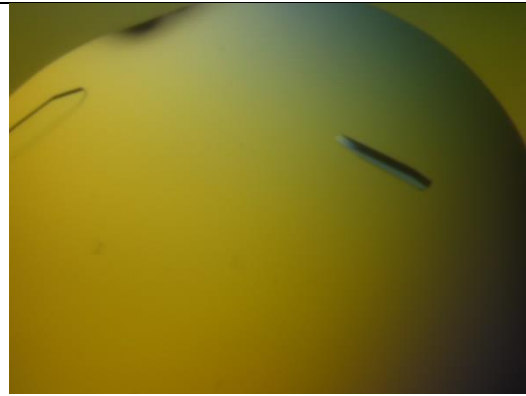
Παρόλα αυτά, αναφορικά με τις εικονικές σαρώσεις υπάρχουν και άλλες απόψεις που συγκλίνουν στο ότι οι μελέτες αυτές για τα μόρια-θραύσματα φαίνεται αν υστερούν σε ακρίβεια και πως τα *in silico* εργαλεία σίγουρα μπορούν να βρουν μεγαλύτερη εφαρμογή στο στάδιο της βελτιστοποίησης (Scott et al., 2012).

6.Κρυστάλλωση των μορίων 19E5 και 11E6

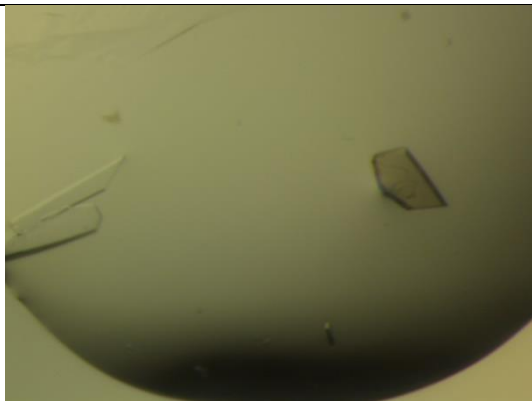
Έπειτα από την επιβεβαίωση των πειραμάτων της φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης για ορισμένα από τα μόρια από το STD-NMR, θεωρήθηκε λογική συνέχεια η εκτέλεση κρυσταλλογραφίας ακτίνων X, ώστε να διερευνηθεί ο πιθανός τρόπος πρόσδεσης του μικρού μορίου στην πρωτεϊνική κοιλότητα και να καθοριστούν πιθανές συνθετικές τροποποιήσεις που μπορούν αν γίνουν πάνω στο μικρό μόριο για αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης στο εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας- Βιολογίας του καθηγητή Stefan Knapp. Σε συνεννόηση με την ομάδα του καθηγητή Knapp, επιλέχθηκαν 2 μόρια, αυτά τα οποία διαθέτουν τις 2 πιο ενδιαφέρουσες δομές (11E6 και 19E5) , προκειμένου να γίνει σε αυτά κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Καταφέραμε να πάρουμε κρυστάλλους τόσο στους 20, όσο και στους 4. Ακολουθούν φωτογραφίες από τους κρυστάλλους που πήραμε στους 20 βαθμούς



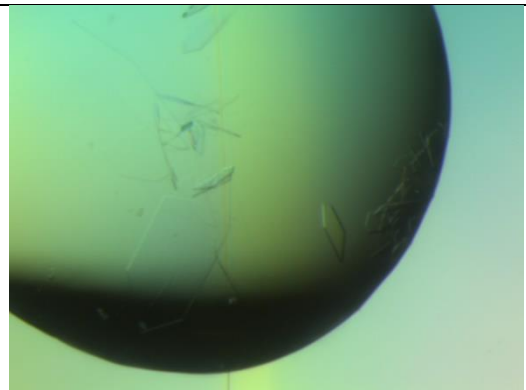
Εικόνα 1 Συνθήκη A7



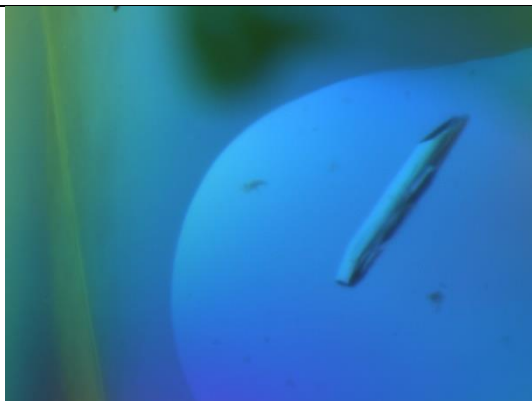
Εικόνα 2 Συνθήκη B6



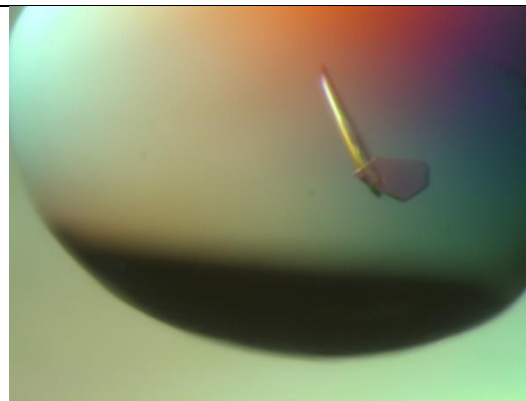
Εικόνα 3 Συνθήκη C11



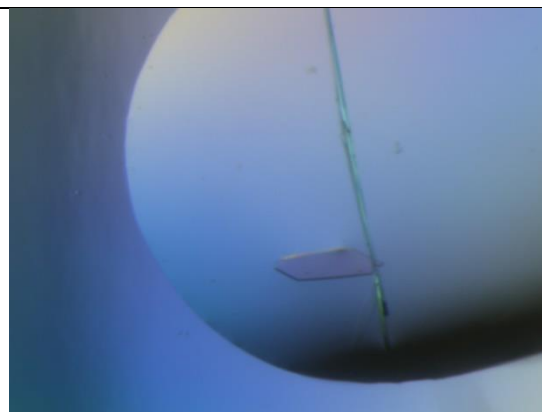
Εικόνα 4 Συνθήκη D8



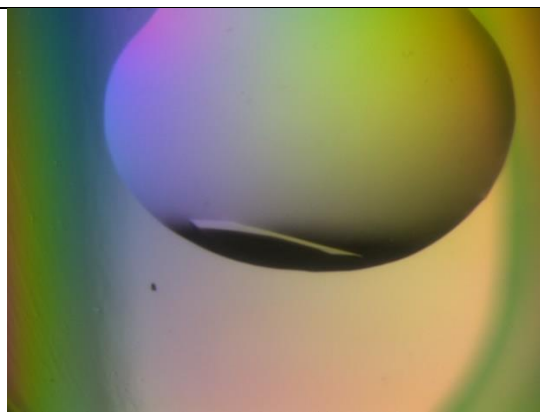
Εικόνα 5 Συνθήκη D12



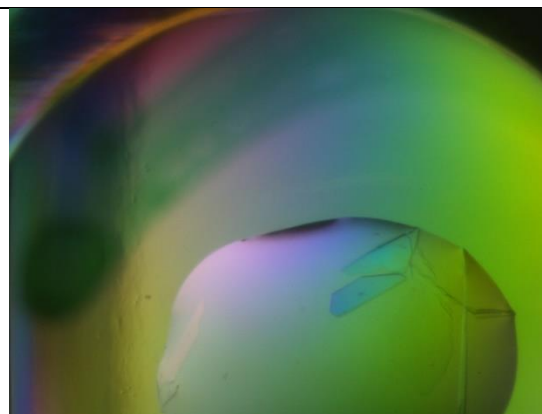
Εικόνα 6 Συνθήκη E11



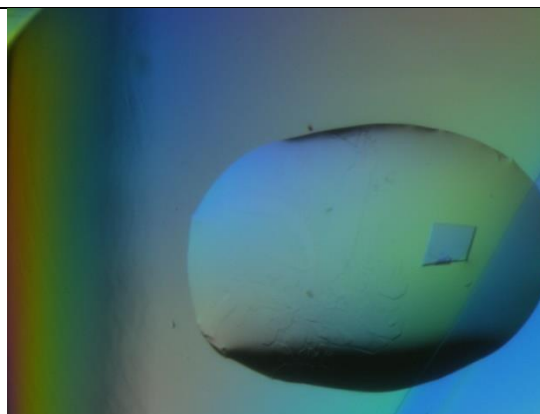
Εικόνα 7 Συνθήκη G9



Εικόνα 8 Συνθήκη A9

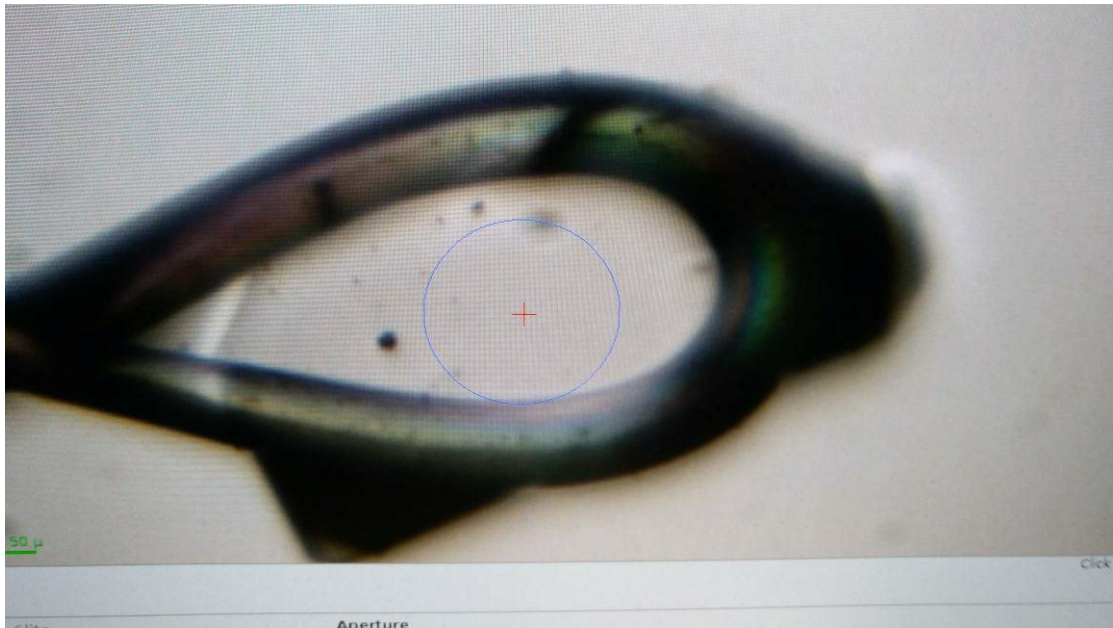


Εικόνα 9 Συνθήκη G7



Εικόνα 10 Συνθήκη C12

Από τους παραπάνω κρυστάλλους, έγινε «ψάρεμα» ενός κρυστάλλου στον οποίο είχε γίνει απόπειρα συγκρυστάλλωσης με το μόριο με κωδικό 19E5 και ο κρύσταλλος μεταφέρθηκε στο σύγχροτρον για ανάλυση. Δυστυχώς ο κρύσταλλος περιείχε μόνο την άπο-πρωτεΐνη, πράγμα που οδηγεί στο να συμπεράσμε πως οι αλληλεπιδράσεις του μικρού μορίου με την πρωτεΐνη ήταν πολύ ασθενείς.

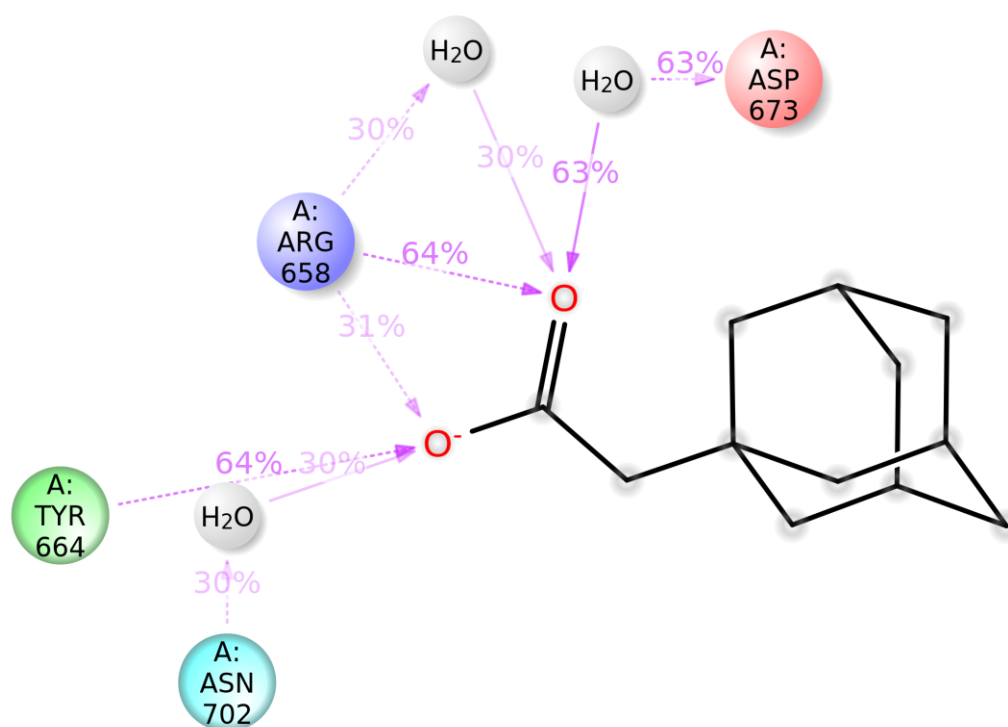


Εικόνα 44 Το loop με τον κρύσταλλο που οδηγήθηκε στο σύγχροτρον

7. Μελέτες μοριακής Δυναμικής

Ακολούθησαν μελέτες μοριακής δυναμικής με το συγκεκριμένο μόριο, ώστε να γίνουν αντιληπτές η αλληλεπιδράσεις του με την πρωτεΐνη και να δοθεί μια τεκμηριωμένη απάντηση σε σχέση με την αποτυχία συγκρυστάλλωσής του με την PB1A5. Για τη Μοριακή Δυναμική της PB1A5 επιλέχθηκε το αποτέλεσμα από τον υπολογισμό του Induced Fit Docking για το μόριο 19E5 και τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη, ως input αρχείο για τα 120ns της μοριακής δυναμικής που τρέξαμε. Τα αποτελέσματα της δυναμικής αυτής ερμηνεύτηκαν πάντα σε σύγκριση με τα αποτελέσματα από τη μοριακή δυναμική που έγινε για το ίδιο μόριο και το bromodomain BRD4, όπου σύμφωνα με το Thermal Shift Assay δεν προσδένεται το μικρό μόριο. Πάνω στο σύμπλεγμα έγιναν υπολογισμοί Μοριακής

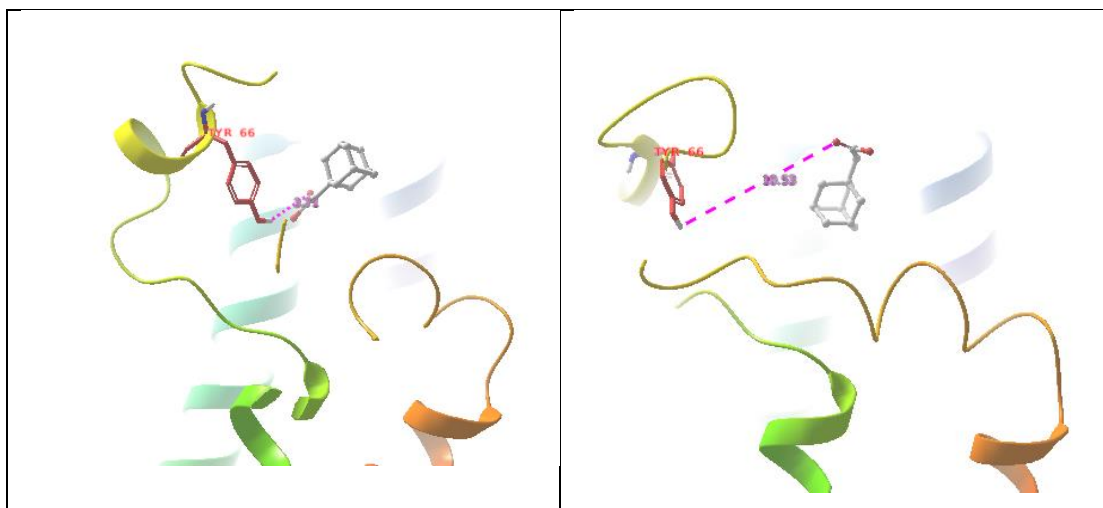
Δυναμικής χωρίς να προηγηθεί κάποια άλλη υπολογιστική μελέτη πρόσδεσης.



Εικόνα 45 Αλληλεπιδράσεις του μορίου 19E5 με την πρωτεΐνη PB1A5. Με τα συνεχόμενα βέλη εικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου που κάνει το μικρό μόριο με το σκελετό τις πρωτεΐνης, ενώ με διακεκομμένα βέλη φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου που επιτελούνται με τις πλευρικές αλυσίδες του μορίου.

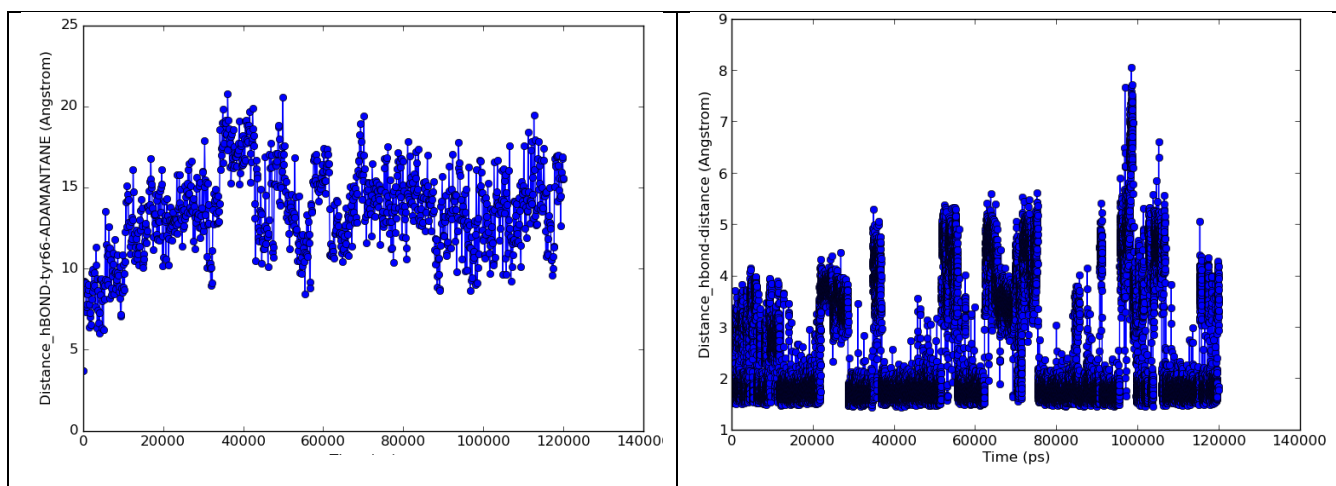
Από τους υπολογισμούς αποστάσεων ορισμένων θέσεων από το καρβονύλιο αλλά και από το αδαμαντάνιο καταλαβαίνουμε πως στην περίπτωση του PB1A5 το μόριο δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου αρκετά σταθερούς στο χρόνο και δεν κινείται πολύ μέσα στο χρόνο, ενώ στην περίπτωση του BRD4, το μόριο κάνει μεγάλες κινήσεις και στην ουσία καταλήγει να κάνει ηλεκτροστατικούς δεσμούς με αμινοξέα στο ευκίνητο loop του BRD4, όντας στην ουσία εκτός της κοιλότητας της πρωτεΐνης.

Στις παρακάτω πόζες βλέπουμε στα αριστερά την μέτρηση της απόστασης του καρβονυλίου του αδαμαντανίου από το υδροξύλιο της πλευρικής αλυσίδας της TYR66 στο BRD4 στο πρώτο frame της δυναμικής και δεξιά στο frame 974, το οποίο είναι στο τέλος αυτής.



Εικόνα 46: Η απόσταση του μόριου 19E5 από την TYR66 στην κοιλότητα του BRD4 (frame0), Εικόνα 47: Η ίδια απόσταση στο frame974, στο τέλος της Μοριακής Δυναμικής

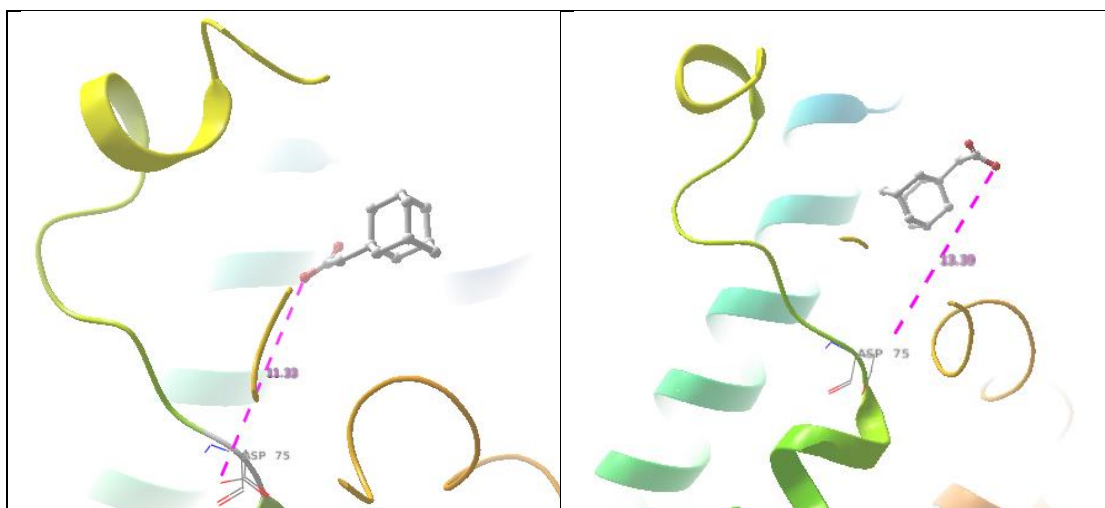
Ακολουθεί το διάγραμμα της συγκεκριμένης απόστασης στα 120 ns της μοριακής δυναμικής στα αριστερά για το BRD4 και στα δεξιά για το PB1A5, για την ομόλογη τυροσίνη (TYR664), που υπολογίστηκε από το Protein Alignment. Παρατηρείται πως στο PB1A5 ο δεσμός αυτός διατηρείται.



Εικόνες 48,49: Το διάγραμμα της μέτρησης της απόστασης κατά τη διάρκεια της Δυναμικής του αδαμαντανικού αναλόγου από την TYR66 του BRD4 (αριστερά) και το διάγραμμα μέτρησης της απόστασης από την ομόλογη TYR664 του PB1A5 (δεξιά)

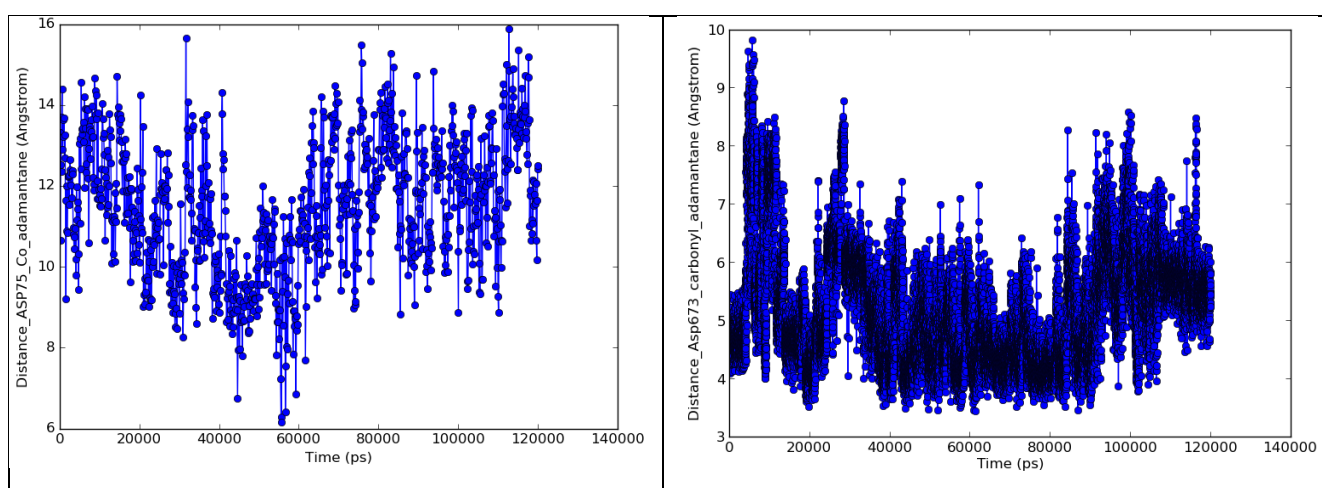
Στις παρακάτω πόζες βλέπουμε τη μέτρηση της απόστασης πάλι του καρβονυλίου του μορίου στο BRD4 από το αμινοξύ του ασπαρτικού οξέος που βρίσκεται στην πρωτεϊνική κοιλότητα. Στην αριστερή φωτογραφία βλέπουμε την απόσταση αυτή στο

πρώτο frame ενώ στη δεξιά πάλι στο frame 974, προς το τέλος της δυναμικής. Δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στην απόσταση στην αρχή και στο τέλος της δυναμικής όμως γίνεται αντιληπτή η μεγάλη κίνηση του μικρού μορίου κατά τη διάρκεια της δυναμικής.



Εικόνες 50,51: Η μέτρηση της απόστασης του αδαμαντανίου από το Asp75 στο frame 0 (αριστερά) της Μοριακής Δυναμικής και στο frame 974 (δεξιά)

Ακολουθεί το διάγραμμα της συγκεκριμένης απόστασης στα 120 ns αριστερά στο BRD4 και δεξιά για το PB1A5, για το όμοιο αμινοξύ που μας έδειξε το alignment (ASP 673). Φαίνεται πως στο μεγαλύτερο μέρος της δυναμικής η απόσταση αυτή δε διαφοροποιείται σημαντικά για το PB1A5, πράγμα που δε συμβαίνει στο BRD4.



Εικόνες 52,53: Η απόσταση μεταξύ του Asp75 του BRD4 από το αδαμαντανικό ανάλογο σε όλη τη διάρκεια της Δυναμικής και η απόσταση του αναλόγου από το ομόλογο αμινοξύ του PB1A5

8.Μελέτες φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης αδαμαντανικών αναλόγων

Από τις μελέτες μοριακής δυναμικής γίνεται αντιληπτό πως ο σκελετός του αδαμαντανίου φαίνεται να έχει μια συγγένεια για την κοιλότητα της PB1A5, ωστόσο το μόριο 19E5, δε διαθέτει χαρακτηριστικές ομάδες που να αλληλεπιδρούν με την Asn707, με αποτέλεσμα η συγγένεια πρόσδεσης του μορίου να είναι χαμηλή. Επομένως, έπρεπε να βρεθούν αδαμαντανικά ανάλογα τα οποία να είναι πολυπλοκότερα σε δομή, ώστε να υπάρχουν ομάδες τέτοιες ώστε να μπορέσουν να αλληλεπιδράσουν με το συγκεκριμένο αμινοξύ. Τα εργαστήρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας έχουν μεγάλη παράδοση στη σύνθεση αδαμαντανικών αναλόγων. Έγινε συλλογή μορίων τα οποία διαθέτουν το σκελετό του αδαμαντανίου από τα εργαστήρια του κύριου Ζωΐδη και του κύριου Παπαναστασίου. Τα μόρια ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό, διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO και τοποθετήθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων. Στα μόρια αυτά πραγματοποιήθηκε πείραμα DSF σε συνεργασία με το εργαστήριο της καθηγήτριας κ. Λιανίδου από το Τμήμα Χημείας. Οι δομές των μορίων παρουσιάζονται στο Παράρτημα 2. Παρατίθενται τα αποτελέσματα του πειράματος με τις τιμές ΔT_m στον παρακάτω πίνακα :

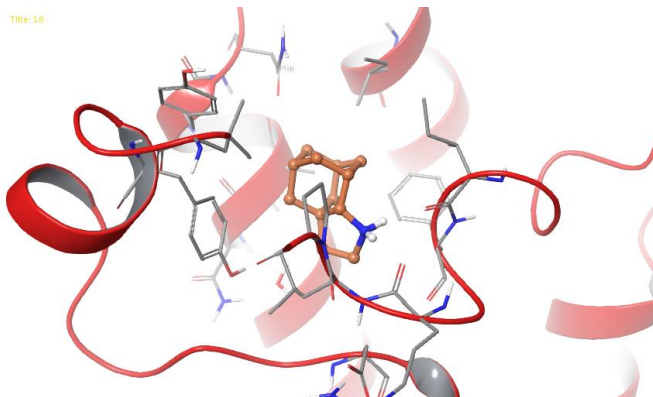
Κωδικός Μορίου	ΔT_m
Z81	Ambiguous-multi-phasing unfolding
Z39	Ambiguous-small transition amplitude
Z68	Ambiguous-small transition amplitude
Z2	1,72
Z17	0.52
Z4	-0.28
Z9	1,73
Z38	1,47
Z46	-0.14
Z61	0.58
Z94	1,2
Z62	0,27
Z14	0,89
Z70	0,51

Z35	2,3
Z49	-1,21
Z88	-3,35
Z93	1,64
Z91	1,56
Z87	0,19
Z92	1,7
Z12	-0,09
Z11	0,3
Z7	1,05
Z48	-0,93
Z45	Non-two state transition
Z41	-0,98
Z57	Ambiguous-small transition amplitude
Z59	-0,03
Z56	No transition
Z55	-5,65
Z85	0,19
Z15	-0,68
Z79	0,3
Z69	1,57
Z19	0,98
Z51	0,86
Z83	0,15
Z24	3,99
Z47	0,51
Z44	-1,69
Z40	-0,68
Z8	1,24
Z77	1,77
Z52	0,01
Z75	1,34

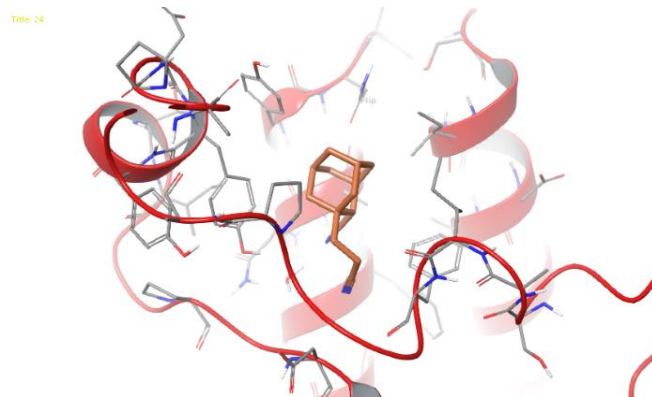
Z28	1,02
Z84	0,85
Z72	0,85
Z10	1,72
Z73	-0,01
Z42	0,67
Z54	-1,65
Z67	0,92
Z53	-1,25
Z36	0,57
Z63	0,28
Z71	0,74
Z80	0,16
Z86	0,1
Z29	0,84
Z6	1,26
Z90	1,7
Z89	0,79
Z31	1,23
Z34	0,32
Z78	1,02
Z5	1,31
Z13	0,7
Z25	Ambiguous-small transition amplitude
Z58	0,75
Z33	1,61
Z32	Ambiguous-small transition amplitude
Z16	1,3
Z30	1,49
Z20	1,23
Z18	2,34
Z3	1,98

Z27	0,63
Z1	0,49
IP-14	-1,2
IP-2	No transition
IP-7	Non two-state transition
IP-5	Ambiguous-small transition amplitude
IP-16	-0,99
IP-18	-1,3
IP-17	Ambiguous-small transition amplitude
IP-15	No transition
1P-4	-2,04
IP-20	-3,83
IP-19	No transition
Z82	-1,35
PFI-3	7,7

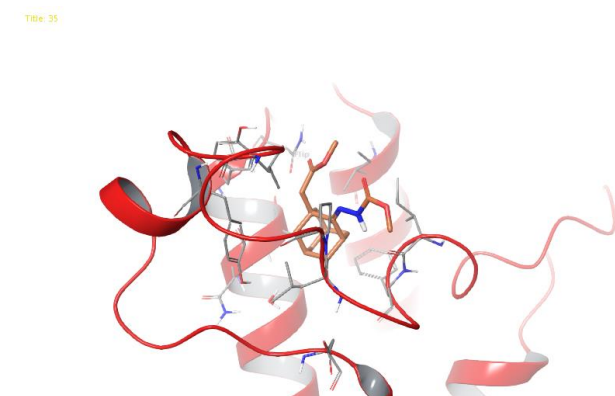
Τα μόρια αυτά έγιναν αρχεία τύπου .sdf και δημιουργήθηκε κατά αυτόν τον τρόπο μια ψηφιακή βιβλιοθήκη πάνω στην οποία έγιναν μελέτες πρόσδεσης με τον αλγόριθμο Glide. Παρατίθενται οι πόζες από τις *in silico* μελέτες πρόσδεσης για τα μόρια με $\Delta T_m \geq 2$.



Εικόνα 54 Το μόριο Z18 στην κοιλότητα της PB1A5



Εικόνα 55 Το μόριο Z24 στην κοιλότητα της PB1A5



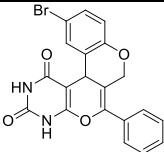
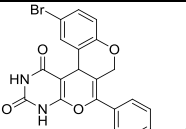
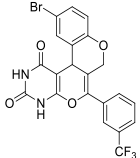
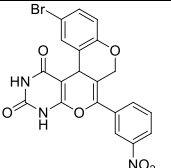
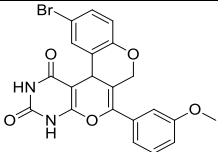
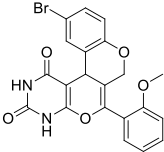
Εικόνα 56 Το μόριο Z35 στην κοιλότητα της PB1A5

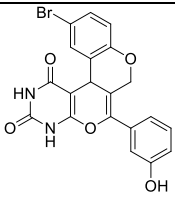
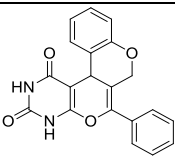
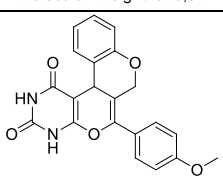
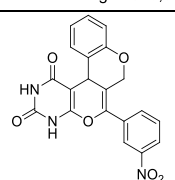
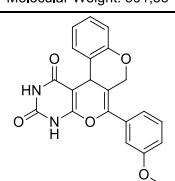
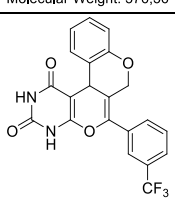
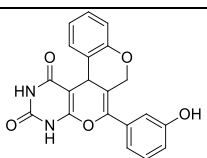
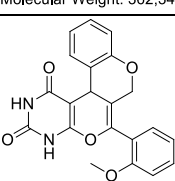
Όπως βλέπουμε και στις εικόνες, στο μόριο Z18 η αμινομάδα της πυρρολιδίνης που είναι συμπτυκνωμένη με τον αδαμαντανικό δακτύλιο κάνει δεσμούς υδρογόνου με το σκελετό της πρωτεΐνης. Η μία από τις 2 κυανομάδες του μορίου Z24 αλληλεπιδρά με το συντηρημένο μόριο νερού της κοιλότητας της πρωτεΐνης, ενώ το μόριο Z35 διαθέτει ένα καρβονύλιο που αλληλεπιδρά με την Asn707 ενώ παράλληλα η αμινομάδα του αμιδίου κάνει και δεσμούς υδρογόνου με το σκελετό στο βρόγχο της πρωτεΐνης.

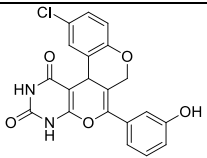
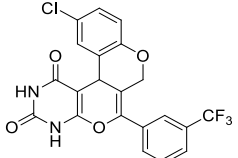
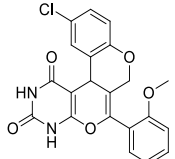
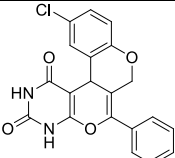
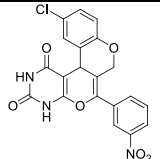
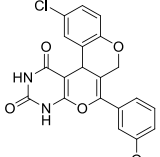
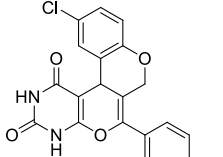
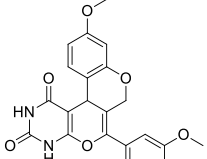
Τα πειράματα για την εύρεση πιθανών προσδετών κρίνεται πως πρέπει να συνεχιστούν περαιτέρω για την εξακρίβωση των μορίων με ικανοποιητική συγγένεια πρόσδεσης τα οποία να μπορέσουν να προχωρήσουν σε κρυσταλλογραφικές μελέτες.

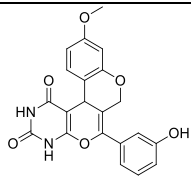
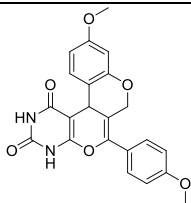
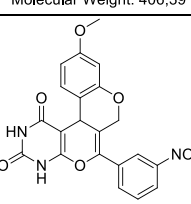
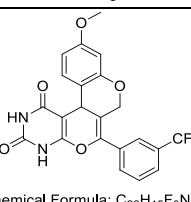
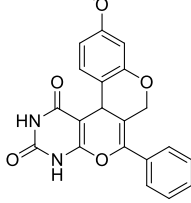
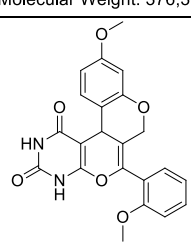
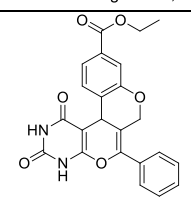
9.Βιοφυσικές μελέτες σε lead-like μόρια

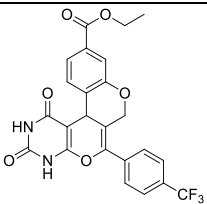
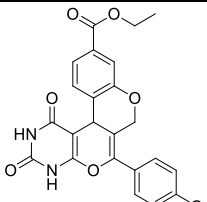
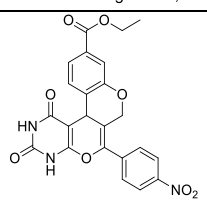
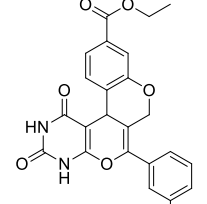
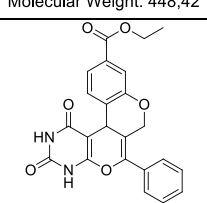
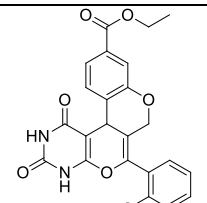
Κατά τη διάρκεια των μελετών στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης, δόθηκαν 35 ανάλογα τα οποία προέρχονται από ένα πρόγραμμα σχεδιασμού φαρμάκων από μόρια-θραύσματα με βάση το βαρβιτουρικό οξύ για το SMARCA4, που είναι ένα ακόμη bromodomain που ανήκει στην ίδια οικογένεια με το PB1A5. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι δομές και τα μοριακά τους βάρη.

Νούμερο	Κωδικός	Δομή	Μοριακός Τύπος/PM	Ποσότητα (mg)
1	EP-D-1	 Chemical Formula: $C_{20}H_{13}BrN_2O_4$ Molecular Weight: 425,23	$C_{20}H_{13}BrN_2O_4$ 425.23	3.7
2	EP-D-2	 Chemical Formula: $C_{21}H_{15}BrN_2O_5$ Molecular Weight: 455,26	$C_{21}H_{15}BrN_2O_5$ 455.26	3.6
3	EP-D-3	 Chemical Formula: $C_{21}H_{12}BrF_3N_2O_4$ Molecular Weight: 493,23	$C_{21}H_{12}BrN_2O_4F_3$ 493.23	5.0
4	EP-D-4	 Chemical Formula: $C_{20}H_{12}BrN_3O_6$ Molecular Weight: 470,23	$C_{20}H_{12}BrN_3O_6$ 470.23	5.0
5	EP-D-5	 Chemical Formula: $C_{21}H_{15}BrN_2O_5$ Molecular Weight: 455,26	$C_{21}H_{15}BrN_2O_5$ 455.26	3.8
6	EP-D-21	 Chemical Formula: $C_{21}H_{15}BrN_2O_5$ Molecular Weight: 455,26	$C_{21}H_{15}BrN_2O_5$ 455.26	4.6

7	EP-D-35	 Chemical Formula: $C_{20}H_{13}BrN_2O_5$ Molecular Weight: 441,23	$C_{20}H_{13}BrN_2O_5$ 441.23	4.0
8	EP-D-6	 Chemical Formula: $C_{20}H_{14}N_2O_4$ Molecular Weight: 346,34	$C_{20}H_{14}N_2O_4$ 346.34	4.1
9	EP-D-7	 Chemical Formula: $C_{21}H_{16}N_2O_5$ Molecular Weight: 376,36	$C_{21}H_{16}N_2O_5$ 376.36	4.2
10	EP-D-8	 Chemical Formula: $C_{20}H_{13}N_3O_6$ Molecular Weight: 391,33	$C_{20}H_{13}N_3O_6$ 391.33	4.5
11	EP-D-9	 Chemical Formula: $C_{21}H_{16}N_2O_5$ Molecular Weight: 376,36	$C_{21}H_{16}N_2O_5$ 376.36	4.6
12	EP-D-10	 Chemical Formula: $C_{21}H_{13}F_3N_2O_4$ Molecular Weight: 414,33	$C_{21}H_{13}F_3N_2O_4$ 414.33	4.0
13	EP-D-27	 Chemical Formula: $C_{20}H_{14}N_2O_5$ Molecular Weight: 362,34	$C_{20}H_{14}N_2O_5$ 362.34	6.0
14	EP-D-32	 Chemical Formula: $C_{21}H_{16}N_2O_5$ Molecular Weight: 376,36	$C_{21}H_{16}N_2O_5$ 376.36	4.0

15	EP-D-26	 Chemical Formula: $C_{20}H_{13}ClN_2O_5$ Molecular Weight: 396,78	$C_{20}H_{13}ClN_2O_5$ 396.78	5.0
16	EP-D-23	 Chemical Formula: $C_{21}H_{12}ClF_3N_2O_4$ Molecular Weight: 448,78	$C_{21}H_{12}ClF_3N_2O_4$ 448.78	6.2
17	EP-D-14	 Chemical Formula: $C_{21}H_{15}ClN_2O_5$ Molecular Weight: 410,81	$C_{21}H_{15}ClN_2O_5$ 410.81	3.6
18	EP-D-13	 Chemical Formula: $C_{20}H_{13}ClN_2O_4$ Molecular Weight: 380,78	$C_{20}H_{13}ClN_2O_4$ 380.78	5.4
19	EP-D-12	 Chemical Formula: $C_{20}H_{12}ClN_3O_6$ Molecular Weight: 425,78	$C_{20}H_{12}ClN_3O_6$ 425.78	4.6
20	EP-D-11	 Chemical Formula: $C_{21}H_{15}ClN_2O_5$ Molecular Weight: 410,81	$C_{21}H_{15}ClN_2O_5$ 410.81	3.5
21	-	 Chemical Formula: $C_{21}H_{15}ClN_2O_5$ Molecular Weight: 410,81	$C_{21}H_{15}ClN_2O_5$ 410.81	3.2
22	EP-D-16	 Chemical Formula: $C_{22}H_{18}N_2O_6$ Molecular Weight: 406,39	$C_{22}H_{18}N_2O_6$ 406.39	6.0

23	EP-D-18	 Chemical Formula: C₂₁H₁₆N₂O₆ Molecular Weight: 392,36	C₂₁H₁₆N₂O₆ 392.36	4.1
24	EP-D-19	 Chemical Formula: C₂₂H₁₈N₂O₆ Molecular Weight: 406,39	C₂₂H₁₈N₂O₆ 406.39	3.9
25	EP-D-28	 Chemical Formula: C₂₁H₁₅N₃O₇ Molecular Weight: 421,36	C₂₁H₁₅N₃O₇ 421.36	4.8
26	EP-D-15	 Chemical Formula: C₂₂H₁₅F₃N₂O₅ Molecular Weight: 444,36	C₂₂H₁₅N₂O₅F₃ 444.36	3.7
27	EP-D-37	 Chemical Formula: C₂₁H₁₆N₂O₅ Molecular Weight: 376,36	C₂₁H₁₆N₂O₅ 376.36	6.0
28	EP-D-31	 Chemical Formula: C₂₂H₁₈N₂O₆ Molecular Weight: 406,39	C₂₂H₁₈N₂O₆ 406.39	3.9
29	EP-D-25	 Chemical Formula: C₂₃H₁₈N₂O₆ Molecular Weight: 418,40	C₂₃H₁₈N₂O₆ 418.40	5.4

30	EP-D-24	 Chemical Formula: $C_{24}H_{17}F_3N_2O_6$ Molecular Weight: 486,40	$C_{24}H_{17}N_2O_6F_3$ 486.40	4.0
31	EP-D-22	 Chemical Formula: $C_{24}H_{20}N_2O_7$ Molecular Weight: 448,42	$C_{24}H_{20}N_2O_7$ 448.42	3.7
32	EP-D-20	 Chemical Formula: $C_{23}H_{17}N_3O_8$ Molecular Weight: 463,40	$C_{23}H_{17}N_3O_8$ 463.40	2.4
33	EP-D-34	 Chemical Formula: $C_{24}H_{20}N_2O_7$ Molecular Weight: 448,42	$C_{24}H_{20}N_2O_7$ 448.42	4.4
34	EP-D-36	 Chemical Formula: $C_{23}H_{18}N_2O_7$ Molecular Weight: 434,40	$C_{23}H_{18}N_2O_7$ 436.40	4.2
35	EP-D-33	 Chemical Formula: $C_{24}H_{20}N_2O_7$ Molecular Weight: 448,42	$C_{24}H_{20}N_2O_7$ 448.42	4.3

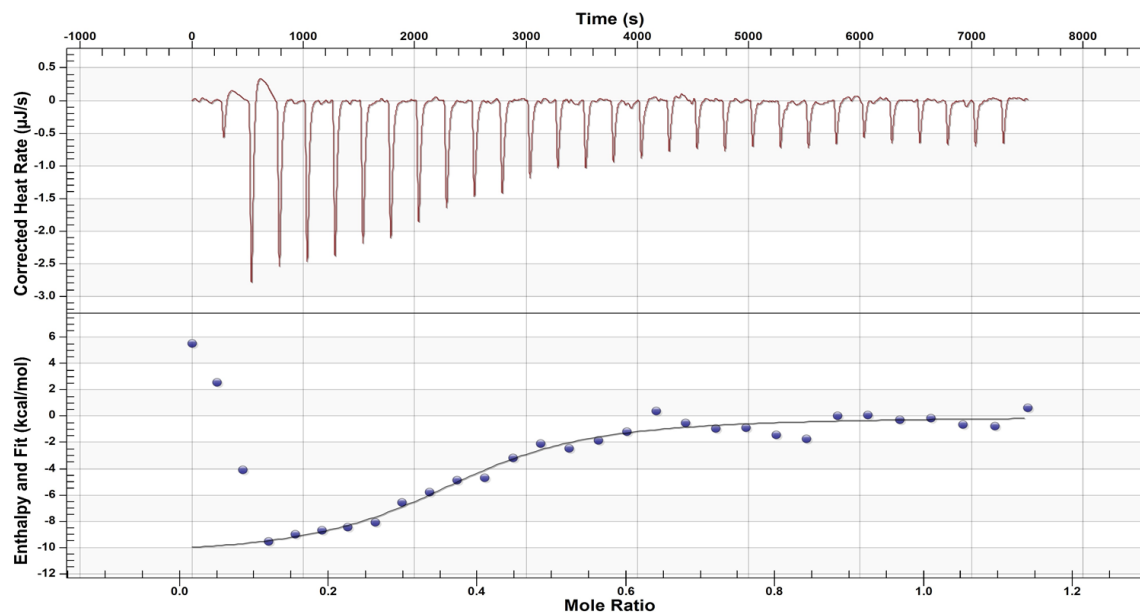
Στα παραπάνω μόρια έγιναν μελέτες με τη χρήση του DSF τόσο στο SMARCA4, όσο και σε πάνελ που περιείχε διάφορα Bromodomain και τα αποτελέσματα φαίνονται στους

παρακάτω πίνακες. Όπου δεν ήταν δυνατός ο υπολογισμός είτε λόγω αλληλεπίδρασης των μορίων αυτών με τη χρωστική, είτε λόγω φθορισμού του μορίου από μόνο του, είτε ίσως και λόγω κακού πιπεταρίσματος φαίνεται το σύμβολο #Δ/Υ.

compounds	proteins (ΔT_m °C values)						
	BRD4	SMARCA2	SMARCA4	PB1A5	PB1A4_Co88	PB1A2_Co14	PB1A3_Co23
EP-D-1	-1,92	#Δ/Υ	-0,04	-0,04	#Δ/Υ	-0,28	0,63
EP-D-2	-1,89	-8,01		0,39	#Δ/Υ	-0,56	#Δ/Υ
EP-D-3	-1,16			0,87	#Δ/Υ	0,71	#Δ/Υ
EP-D-4	-0,28	2,44	1,25	0,95	0,21	0,85	0,42
EP-D-5	-1,28	-0,76	0,59	0,19	#Δ/Υ	-0,01	#Δ/Υ
EP-D-21	-2,89	-1,39	-0,66	-1,32	-0,36	0,25	-0,64
EP-D-35	-1,27	-0,25	0,74	1,27	1,44	0,58	-0,55
EP-D-6	-1,31	0,5	-0,54	0,12	0,64	-0,11	-0,11
EP-D-7	-0,92	0,53	0,25	-0,21	-0,35	-0,18	-0,18
EP-D-8	2,17	0,68	0,08	1,02	0,45	-0,07	0,49
EP-D-9	-0,17	0,69	0,19	-0,31	-0,35	-0,36	-0,08
EP-D-27	-0,98	-0,08	0,02	0,91	-0,32	0,06	0,11
EP-D-32	-2,97	-0,71	-0,71	-0,73	-1,94	-0,11	-1,43
EP-D-26	-0,28	0,47	0,34	1,49	-0,98	0,34	0,47
EP-D-23	-1,21	-8,83	0,81	2,52	-0,41	0,7	
EP-D-14	-1,03	-0,13	-0,34	0,39	-1,29	0,13	0,02
EP-D-13	-0,21	0,69	-0,05	0,84	-0,46	0,01	#Δ/Υ
EP-D-12	0,2	1,02	1,24	1,73	-0,01	0,83	1,05
EP-D-11	-0,99	0,59	-0,5	0,22	-0,99	-0,58	0,18
EP-D	-1,52	-0,03	0,06	-0,22	-1,56	0,13	-0,7
EP-D-16	-1,01	-0,06	-0,7	0,12	-1,18	-0,03	-0,28
EP-D-18	-0,14	0,03	0,53	0,7	-0,57	0,14	0,19
EP-D-19	0,02	0,11	0,2	0,78	-0,66	-0,16	0,01
EP-D-28	-0,32	0,01	0,66	0,6	0,84	0,44	0,55
EP-D-15	-0,68	-8,78	0,98	1,06	-0,16	0,11	1,12
EP-D-37	-0,87	-0,32	-0,24	0,61	-0,87	-0,34	-0,49
EP-D-31	-1,15	-0,3	-0,28	0,06	-1,14	-0,39	-0,81
EP-D-25	-0,47	0,24	0,43	0,39	-0,58	-0,45	0,02
EP-D-24	-0,35	-8,31	2,13	2,24	0,33	0,27	#Δ/Υ
EP-D-22	-0,6	1,14	0,65	0,7	-0,46	-0,13	0,57
EP-D-20	-0,07	0,85	0,65	1,17	-0,5	0,34	0,74
EP-D-34	-1,55	0,66	0,25	0,37	-1,25	-0,22	-0,58
EP-D-36	-1,13	0,97	0,17	0,62	-0,96	-0,05	-0,06
EP-D-33	-1,46	0,38	-0,11	-0,09	-1,63	-0,01	-0,96
EP-D-10	1,14	-7,89	2,55	2,11		0,51	#Δ/Υ

Στα μόρια με $\Delta T_m > 2$, έγιναν πειράματα ITC, προκειμένου αφενός να επικυρωθούν τα αποτελέσματα του DSF και αφετέρου να μελετηθούν τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με την πρωτεΐνη (εάν τελικά αυτή πραγματοποιείται). Θετικό αποτέλεσμα τελικά είχαμε για το μόριο με EP-D-8 το οποίου εξετάσαμε την πρόσδεση στην πρωτεΐνη BRD-4. Ακολουθούν τα αποτελέσματα από το ITC.

$K_d(M)$	1.285E-6
n	0.374
ΔH (kcal/mol)	-10,69
ΔS (cal/mol K)	-8.886

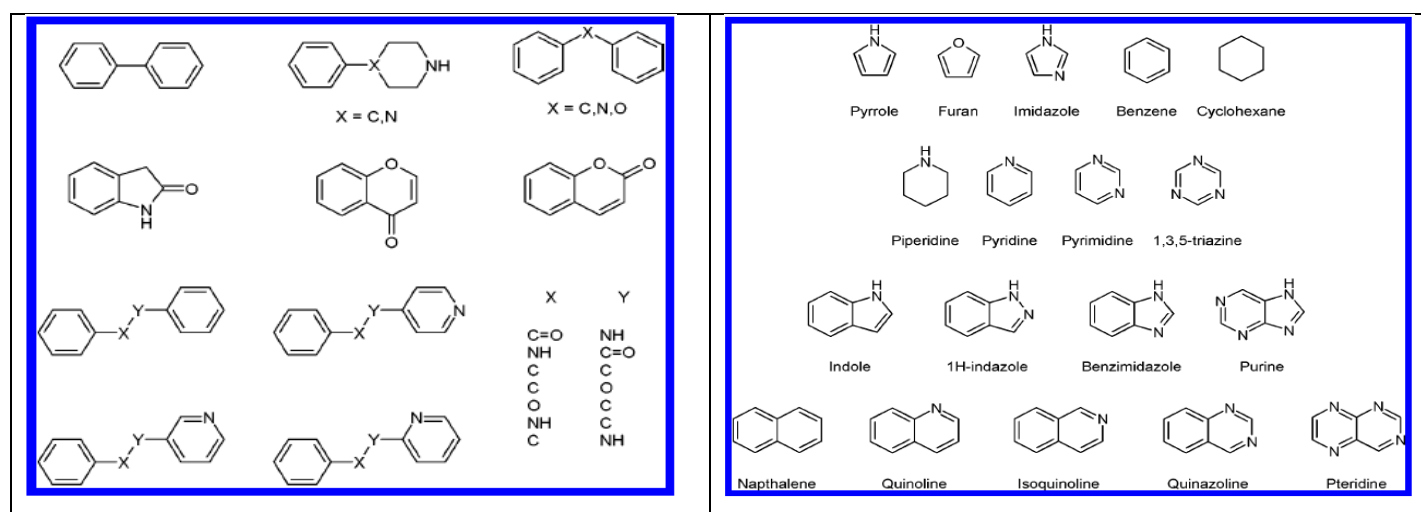


Εικόνα 57 Το γράφημα του ITC για το πείραμα πρόσδεσης του μορίου EP-D-8 με το BRD4 και τα θερμοδυναμικά χαρακτηριστικά που υπολογίστηκαν.

Το μόριο έδωσε K_d της τάξης του 1,3μM, ωστόσο η στοιχειομετρία του ήταν εξαιρετικά χαμηλή, πράγμα που σημαίνει πως το μεγαλύτερο μέρος του μορίου παρέμεινε στο διάλυμα. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός πως στη βιβλιογραφία συναντώνται αρκετοί αναστολείς με χαμηλότερες σταθερές πρόσδεσης, οδήγησε στην παύση των μελετών σχετικά με το συγκεκριμένο μόριο και στη μη συνέχιση τους προς την κρυσταλλογραφία.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παραπάνω εργασία παρουσιάστηκε η εύρεση μορίων θραυσμάτων τα οποία προσδένονται στον επιγενετικό στόχο PB1A5. Το ποσοστό επιτυχίας της αρχικής σάρωσης με το πείραμα του DSF ήταν 3.9%, ποσοστό παρόμοιο και με άλλες παρόμοιες εργασίες, το οποίο αναφέρεται τόσο και ψευδώς όσο και σε αληθώς θετικά αποτελέσματα (Silvestre et al., 2013). Ορισμένα από τα αποτελέσματα του DSF επιβεβαιώθηκαν και από το STD-NMR και μάλιστα ένα από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το συγκεκριμένο πείραμα ήταν και ένα μόριο με σκελετό αδαμαντανίου, που αποτελεί έναν σκελετό που δεν είχε εξεταστεί για τη συγκεκριμένη κατηγορία πρωτεϊνών. Ωστόσο η συγκρυστάλλωση με την πρωτεΐνη, απέτυχε. Σύμφωνα με τους Hubbard και Murray, όταν το DSF χρησιμοποιείται ως 1^ο πείραμα σάρωσης, καλύτερα είναι να επιλέγονται μόρια με $\Delta T_m \geq 2$, που είναι το διπλάσιο από το περιθώριο σφάλματος της μεθόδου, ώστε οι πιθανότητες συγκρυστάλλωσης να είναι μεγαλύτερες (Hubbard and Murray, 2011). Παρόμοια τακτική ακολουθεί και η ομάδα του καθηγητή Knapp στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης. Επιπλέον οι οικονομικοί περιορισμοί αποτέλεσαν εμπόδιο στην κατασκευή μια καλύτερης βιβλιοθήκης μορίων-θραυσμάτων. Σύμφωνα με τους Hartshorn et al. μια καλή τακτική για τη δημιουργία τέτοιων βιβλιοθηκών είναι η εύρεση αναλόγων χαρακτηριστικών σκελετών που απαντώνται σε φαρμακομόρια (τέτοιοι σκελετοί φαίνονται στον παρακάτω πίνακα) ή αναλόγων σκελετών που βρίσκονται σε ήδη γνωστούς προσδέτες της πρωτεΐνης που εξετάζεται (Hartshorn et al., 2005).



Εικόνα 58: Χαρακτηριστικοί σκελετοί και ομάδες που απαντώνται σε φαρμακομόρια (Hartshorn et al., 2005)

Τέλος, ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που είναι η υδατοδιαλυτότητα, δε λήφθηκε υπόψιν κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης. Συγκεκριμένα η Astra Zeneca ορίζει πως για κάθε μικρό μόριο η διαλυτότητα στο νερό θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 500μM (Fuller et al., 2016).

Παρόλα αυτά βρέθηκε ένας καινούριος σκελετός, ο οποίος αλληλεπιδρά με το συγκεκριμένο bromodomain, ο οποίος μάλιστα είναι και ένας σκελετός που έχει δουλευτεί από τους φαρμακοχημικούς για διάφορους στόχους και μάλιστα υπάρχουν ήδη φάρμακα με τη δομή αυτή όπως είναι η ριμανταδίνη και η αμανταδίνη που δρουν ως αποκλειστές της M2 πρωτεΐνης της Influenza A και η μεμαντινίνη που δρα ως αποκλειστής του NMDA υποδοχέα και χρησιμοποιείται στο Parkinson. Πρόσφατα ανάλογα του αδαμαντανίου βρέθηκε πως δρουν στους κανναβινοειδείς υποδοχείς (Banister et al., 2013).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά ταυτοποιήθηκαν 7 προσδέτες με τη μέθοδο της φθορισμομετρίας διαφορικής σάρωσης (DSF) και 3 από αυτούς τους επιβεβαιώσαμε και με το πείραμα του NMR διαφορικής μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference-STD). Οι προσδέτες αυτοί διαθέτουν εκλεκτικότητα για το PB1A5 συγκριτικά με τα άλλα bromodomains του PB1, όπως προσδιορίστηκε από πείραμα DSF και μάλιστα σε ένα εξ αυτών προσδιορίστηκε εκλεκτικότητα και έναντι του BRD4. Προχωρήσαμε στη συγκρυστάλλωση σε δύο από τα μόρια αυτά με την πρωτεΐνη η οποία τελικά απέτυχε και εκτελέσαμε μελέτες μοριακής δυναμικής ώστε να προσδιορίσουμε την αιτία της αποτυχίας. Οι μελέτες αυτές έδειξαν πως το μόριο αλληλεπιδρά με αμινοξέα της κοιλότητας της πρωτεΐνης, χωρίς ωστόσο να αλληλεπιδρά με την ASN 707 που είναι το καθοριστικό αμινοξύ για την αλληλεπίδραση με τα bromodomains. Συνεχίστηκαν απόπειρες σάρωσης αναλόγων του συγκεκριμένου σκελετού, τα οποία είχαν συντεθεί από φαρμακοχημικούς του τομέα. Τα πειράματα είναι σε εξέλιξη για τον προσδιορισμό ενός προσδέτη μεγαλύτερης χημικής συγγένειας. Στο Πανεπιστήμιο της Φρανκφούρτης δόθηκε μια σειρά αναλόγων του βαρβιτουρικού οξέος, η οποία αποτελούνταν από lead-like μόρια. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες με την τεχνική του DSF και σε όσα είχαν μεγάλα ΔT_m έγιναν και μελέτες θερμιδομετρίας διαφορικής σάρωσης. Ένα παράγωγο βρέθηκε να έχει $K_d=1,28\mu\text{M}$, ωστόσο περαιτέρω μελέτες δεν έγιναν.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

C ₉ H ₁₃ N ₁ O ₃	19A2	C ₇ H ₇ N ₁ O ₂	19A3
C ₅ H ₄ Cl ₂ N ₂	19A4	C ₆ H ₉ N ₃	19A5
C ₉ H ₇ N ₁	19A6	C ₈ H ₆ F ₁ N ₁	19A7
C ₅ H ₃ Cl ₂ N ₁	19A8	C ₇ H ₈ Cl ₁ N ₁	19A9
C ₆ H ₆ Cl ₁ N ₁	19A11	C ₈ H ₁₁ N ₁ O ₁	19A10
C ₁₆ H ₁₉ N ₅	17E4	C ₆ H ₅ Cl ₂ N ₁	19B2
C ₁₃ H ₂₀ N ₆	17F6	C ₆ H ₅ Br ₁	19B3
C ₁₄ H ₁₅ N ₁	19B4	C ₈ H ₉ Cl ₁ O ₁	20C6
C ₁₀ H ₁₅ N ₅	17F7	C ₈ H ₉ N ₁ O ₂	19B5
C ₁₀ H ₈ O ₁	19B6	C ₈ H ₁₀ O ₁	19B7
C ₈ H ₁₀ O ₁	19B8	C ₁₁ H ₁₈ O ₁	19B9
C ₁₀ H ₁₂ O ₄	19B10	C ₆ H ₄ Cl ₂ O ₁	19B11
C ₆ H ₅ Cl ₁ O ₁	19C2	C ₁₃ H ₁₉ N ₅ O ₁	17E5
C ₇ H ₆ O ₂	19C5	C ₈ H ₈ O ₃	19C6
C ₉ H ₁₆ O ₂	19C7	C ₆ H ₄ Cl ₁ N ₁ O ₂	19C8
C ₇ H ₅ Cl ₁ O ₁	19C9	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	19C10
C ₆ H ₆ O ₃ S ₁	19D2	C ₇ H ₆ Cl ₁ N ₁ O ₂	19D3
C ₆ H ₇ O ₂	19D4	C ₁₄ H ₂₂ N ₆	17E6
C ₁₄ H ₂₂ N ₆	17E3	C ₇ H ₆ Cl ₁ N ₁ O ₂	19D5
C ₇ H ₅ F ₃ O ₁	19D6	C ₁₃ H ₂₂ N ₆	17E8
C ₇ H ₅ Br ₁ O ₂	19D7	C ₉ H ₁₂ O ₃	19D8
C ₇ H ₈ O ₁ S ₁	19D9	C ₇ H ₁₃ Br ₁	19D10
C ₈ H ₉ Cl ₁ O ₂	19D11	C ₇ H ₁₀ N ₂	19E2
C ₁₁ H ₁₆ O ₂	19E3	C ₉ H ₁₂ O ₂	19E4
C ₁₂ H ₁₈ O ₂	19E5	C ₆ H ₆ O ₂ S ₁	19E6
C ₈ H ₆ S ₁	19E7	C ₈ H ₁₆ O ₁	19E8
C ₅ H ₃ Cl ₂ N ₁	19E9	C ₁₆ H ₁₉ N ₅	17E7
C ₁₀ H ₁₀ O ₁	19E11	C ₇ H ₈ O ₃ S ₁	19F2
C ₇ H ₈ O ₂	19F4	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	19F5
C ₅ H ₃ Cl ₁ N ₂ O ₂	19F6	C ₇ H ₅ Br ₁ O ₂	19F7

C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O ₂	17H5	C ₈ H ₁₁ N ₁ O ₂	19F8
C ₅ H ₅ Cl ₁ N ₂	19F9	C ₇ H ₄ Cl ₂ O ₂	19F10
C ₅ H ₉ Br ₁	19F11	C ₇ H ₆ O ₂ S ₁	19G2
C ₇ H ₅ I ₁ O ₂	19G3	C ₆ H ₅ N ₁ O ₂	19G4
C ₇ H ₄ Cl ₂ O ₂	19G5	C ₉ H ₁₀ O ₂	19G6
C ₇ H ₉ N ₁ O ₁	19G7	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	19G8
C ₈ H ₈ O ₃	19G9	C ₇ H ₅ Cl ₁ O ₃	19G10
C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₁	19G11	C ₆ H ₁₂ Cl ₁ N ₁ O ₁	19H2
C ₇ H ₇ Cl ₁ O ₁	19H3	C ₇ H ₁₄ Cl ₁ N ₁	19H4
C ₁₀ H ₁₀ O ₁	19H5	C ₈ H ₇ Br ₁ O ₂	19H6
C ₆ H ₁₂ Cl ₁ N ₁	19H7	C ₁₃ H ₁₀ O ₁	19H8
C ₁₄ H ₁₂ O ₂	19H9	C ₁₃ H ₁₂ N ₄	17D10
C ₁₀ H ₁₅ N ₁ O ₃	19H10	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	19H11
C ₈ H ₁₅ N ₁ O ₂	20A2	C ₁₇ H ₂₁ N ₅	17E11
C ₉ H ₆ Cl ₁ N ₁	20A3	C ₅ H ₃ Cl ₁ N ₄	20A4
C ₈ H ₈ O ₃	20A5	C ₉ H ₁₀ O ₂	20A6
C ₁₃ H ₈ O ₁	20A7	C ₆ H ₅ Cl ₁ O ₁	20A8
C ₁₂ H ₁₁ N ₃	20A9	C ₁₇ H ₂₁ N ₅	17F4
C ₇ H ₄ F ₁ N ₁	20A10	C ₇ H ₄ Cl ₂ O ₁	20A11
C ₇ H ₈ Cl ₁ N ₁	20B2	C ₈ H ₇ N ₁	20B3
C ₆ H ₅ Cl ₂ N ₁	20B4	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₁	17D9
C ₉ H ₇ N ₁ O ₂	20B5	C ₁₀ H ₁₂ O ₁	20B6
C ₈ H ₆ O ₃	20B7	C ₇ H ₈ O ₂	20B8
C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₁	20B9	C ₁₃ H ₁₉ N ₅ O ₁	17E2
C ₆ H ₇ Cl ₁ N ₂	20B10	C ₅ H ₇ Cl ₁ O ₁	20B11
C ₉ H ₈ O ₁	20C2	C ₇ H ₆ N ₄ S ₁	20C3
C ₉ H ₉ Br ₁ O ₂	20C4	C ₉ H ₉ Br ₁ O ₂	20C5
C ₈ H ₈ O ₄	1	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	3
C ₁₄ H ₁₂ O ₃	6	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	7
C ₁₃ H ₁₁ N ₁ O ₃	9	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	10
C ₁₅ H ₁₀ O ₄	13	C ₁₂ H ₁₆ O ₆	14
C ₁₄ H ₁₃ N ₁ O ₄	14D8	C ₁₄ H ₁₃ N ₁ O ₄	14D10

C ₁₅ H ₁₀ O ₅	19	C ₁₆ O ₁₂ O ₅	23
C ₁₆ H ₁₄ O ₅	25	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	29
C ₁₇ H ₂₀ O ₅	5E11	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	5F2
C ₁₈ H ₁₉ N ₁ O ₅	14D9	C ₁₀ H ₉ N ₁ O ₃	103
C ₁₄ H ₈ O ₄	110	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	136
C ₉ H ₁₂ O ₃	137	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	11B11
C ₈ H ₁₀ O ₂	5A2	C ₈ H ₁₀ O ₃	140
C ₉ H ₁₂ O ₄	11C2	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	3H5
C ₈ H ₈ O ₅	149	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	176
C ₉ H ₈ O ₄	177	C ₇ H ₆ O ₄	178
C ₁₅ H ₁₀ O ₅	3H7	C ₉ H ₈ O ₃	182
C ₉ H ₁₀ O ₅	11C9	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	11C10
C ₁₅ H ₁₀ O ₅	3B6	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	3B8
C ₈ H ₈ O ₄	1F2	C ₁₇ H ₂₀ O ₅	224
C ₁₇ H ₂₀ O ₆	225	C ₁₂ H ₁₆ O ₆	231
C ₁₃ H ₁₃ N ₁ O ₃	268	C ₁₃ H ₁₇ N ₁ O ₂	11B2
C ₁₃ H ₁₅ N ₁ O ₃	11B3	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	274
C ₈ H ₈ O ₄	275	C ₇ H ₇ N ₁ O ₁	283
C ₁₃ H ₁₁ N ₁ O ₃	286	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	10C11
C ₁₀ H ₈ O ₄	10D2	C ₉ H ₁₀ O ₄	303
C ₁₆ H ₁₄ O ₅	314	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	336
C ₁₁ H ₁₄ O ₅	337	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	1F10
C ₁₄ H ₁₂ O ₄	1G3	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	349
C ₁₅ H ₁₂ O ₄	359	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	362
C ₁₁ H ₈ O ₄	368	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	377
C ₁₅ H ₁₄ O ₅	379	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	381
C ₁₅ H ₁₆ O ₄	385	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	387
C ₁₅ H ₁₄ O ₄	391	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	392
C ₁₅ H ₁₄ O ₄	394	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	398
C ₁₅ H ₁₈ O ₅	400	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	418
C ₁₄ H ₁₂ O ₃	424	C ₄ H ₆ O ₄	430
C ₆ H ₅ N ₁ O ₂	432	C ₇ H ₆ O ₃	433

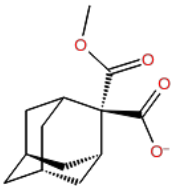
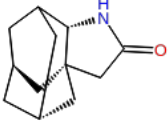
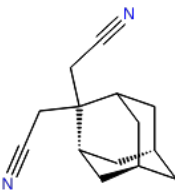
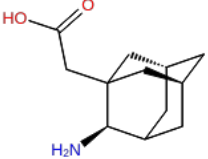
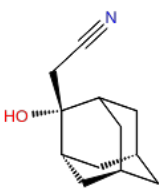
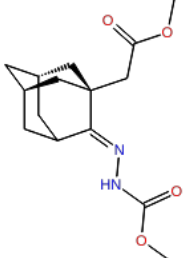
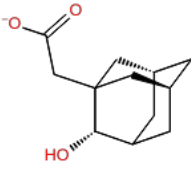
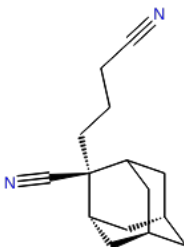
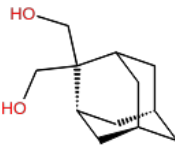
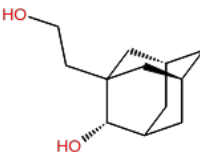
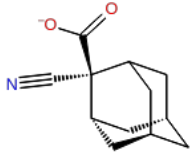
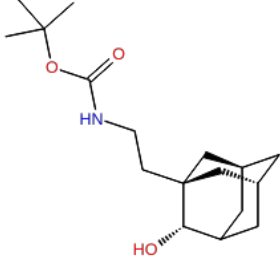
C ₉ H ₂ N ₁ O ₁	436	C ₁₃ H ₁₅ N ₁	437
C ₁₃ H ₁₅ N ₁ O ₁	438	C ₁₃ H ₁₅ N ₁ O ₁	439
C ₁₂ H ₁₁ N ₁ O ₁	440	C ₁₃ H ₁₅ N ₁	441
C ₁₃ H ₁₃ N ₁ O ₁	442	C ₁₃ H ₁₁ N ₁ O ₂	443
C ₁₃ H ₁₁ N ₁ O ₁	444	C ₁₄ H ₁₃ N ₁ O ₂	445
C ₁₇ H ₂₈ O ₃	453	C ₉ H ₁₀ O ₄	468
C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	470	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	481
C ₁₄ H ₁₂ O ₄	4A5	C ₁₄ H ₁₁ Br ₁ O ₃	4A6
C ₁₅ H ₁₄ O ₄	4A7	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	497
C ₁₄ H ₁₁ Cl ₁ O ₃	4B4	C ₁₄ H ₁₁ F ₁ O ₃	7H9
C ₁₄ H ₁₁ Cl ₁ O ₃	4B6	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	7H10
C ₁₅ H ₁₄ O ₅	502	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	503
C ₁₄ H ₁₄ O ₃	505	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	507
C ₈ H ₈ O ₂	516	C ₁₆ H ₁₄ O ₅ S ₁	1B3
C ₁₆ H ₁₄ O ₅ S ₁	1B2	C ₉ H ₇ N ₁ O ₂	535
C ₁₇ H ₁₄ O ₅	544	C ₁₃ H ₂₀ O ₃	550
C ₁₅ H ₁₂ O ₂	552	C ₁₉ H ₁₆ O ₅	556
C ₁₅ H ₁₀ O ₃	560	C ₁₆ H ₁₄ O ₄ S ₁	562
C ₁₇ H ₁₆ O ₅ S ₁	567	C ₁₉ H ₁₆ O ₆	1D6
C ₁₅ H ₁₀ O ₅	574	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₁	577
C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₁	578	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	582
C ₉ H ₁₃ N ₁ O ₂	586	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	588
C ₁₀ H ₁₆ O ₁	646	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	647
C ₁₀ H ₁₄ O ₁	648	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	651
C ₁₀ H ₁₈ O ₃	652	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	8A6
C ₁₅ H ₁₄ O ₄	4A9	C ₁₆ H ₁₁ Br ₁ O ₃	4B5
C ₈ H ₄ Br ₁ N ₁ O ₂	782	C ₉ H ₆ Br ₁ N ₁ O ₂	783
C ₈ H ₄ Br ₁ N ₁ O ₂	784	C ₈ H ₃ Cl ₂ N ₁ O ₂	785
C ₁₂ H ₉ N ₁ O ₂	816	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	818
C ₁₄ H ₁₈ O ₄	819	C ₉ H ₆ O ₄	14B8
C ₁₇ H ₁₈ O ₆	14D7	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	14B10
C ₉ H ₆ O ₄	1G4	C ₁₂ H ₆ O ₄	14C3

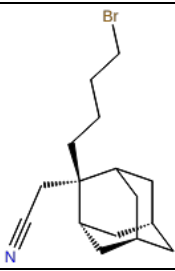
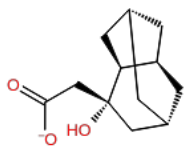
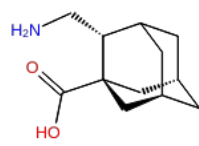
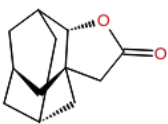
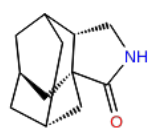
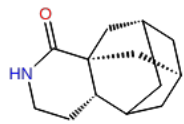
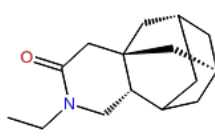
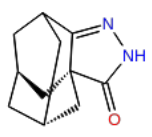
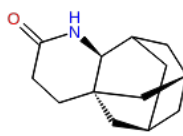
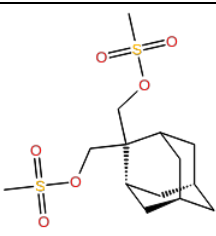
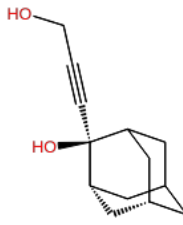
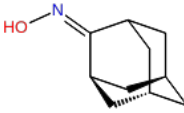
$C_{14}H_{13}Br_1O_4$	14B11	$C_{16}H_{16}O_5$	1F11
$C_{13}H_{10}O_6$	14C4	$C_{14}H_{14}O_4$	1F7
$C_{16}H_{16}O_5$	14C5	$C_{14}H_{13}Br_1O_4$	14C6
$C_{14}H_{14}O_5$	14C7	$C_{11}H_{13}N_1O_3$	1G6
$C_{12}H_{17}N_1O_2$	14B6	$C_{14}H_{19}N_1O_3$	14A3
$C_{11}H_{11}N_1O_3$	932	$C_{11}H_{12}O_2$	14D2
$C_{16}H_{18}O_2$	14B7	$C_{15}H_{13}N_1O_3$	993
$C_{14}H_{12}N_4S_1$	4D10	$C_{18}H_{20}N_6O_1$	4D11
$C_{16}H_{18}N_6O_1$	4F10	$C_{17}H_{20}N_6O_1$	4G6
$C_{16}H_{24}N_6O_1$	7A2	$C_{17}H_{26}N_6O_1$	7A6
$C_{12}H_9Cl_1N_4$	4H3	$C_{12}H_{10}N_4$	4H5
$C_{15}H_{16}N_4O_3$	4H9	$C_{15}H_{16}N_4$	7B6
$C_{18}H_{22}N_4O_3$	7C3	$C_{11}H_{13}Cl_1N_4$	7F10
$C_7H_5Cl_2N_3$	7F11	$C_{11}H_{15}N_4O_1$	7G2
$C_{13}H_8F_1N_5$	7G3	$C_{10}H_6N_2O_2$	10D5
$C_{11}H_8N_2O_2$	10D6	$C_{13}H_{16}O_4$	10E11
$C_{18}H_{20}O_4$	10F4	$C_{13}H_{14}O_4$	10F5
$C_{13}H_{14}O_4$	10F7	$C_{13}H_{14}O_4$	10F8
$C_{16}H_{14}O_4$	3C10	$C_{15}H_{10}O_4$	3C11
$C_{15}H_{14}O_4$	10G8	$C_{11}H_{12}O_3$	10G9
$C_{10}H_6O_5$	11A2	$C_9H_{11}N_1O_1$	10F9
$C_{15}H_{10}O_5$	10G3	$C_{10}H_{12}O_3$	10G11
$C_9H_6O_3$	10H2	$C_6H_{10}O_3$	10H3
$C_{14}H_{14}O_4$	10H5	$C_9H_{10}O_4$	10H7
$C_7H_6O_2$	10H8	$C_9H_{10}O_3$	10H9
$C_{16}H_{11}F_3N_4O_1$	8G9	$C_{15}H_{11}N_5O_3$	12A7
$C_{15}H_{11}N_5O_3$	8G11	$C_{12}H_{15}N_5O_1$	8H3
$C_{16}H_{12}F_3N_5O_1$	8H6	$C_{15}H_{14}N_4O_2S_1$	8H8
$C_{17}H_{20}N_6O_1$	8H10	$C_{17}H_{26}N_6O_1$	12A5
$C_{17}H_{19}N_1O_3$	1441	$C_{16}H_{17}N_1O_3$	1443
$C_{18}H_{18}O_6$	12C4	$C_{18}H_{18}O_5$	12C5
$C_{18}H_{20}O_5$	12C7	$C_{19}H_{20}O_6$	12C9

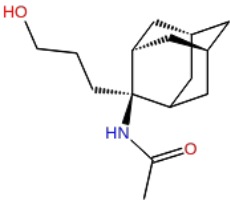
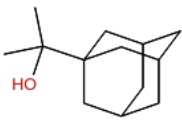
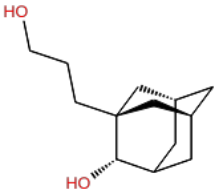
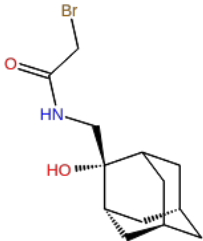
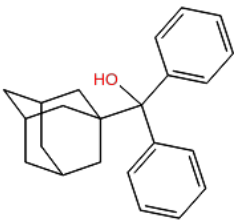
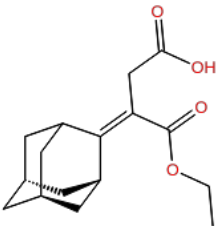
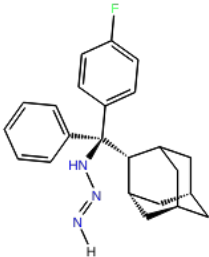
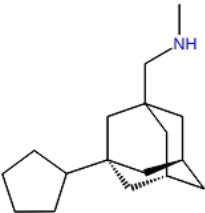
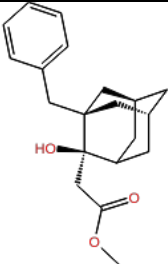
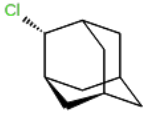
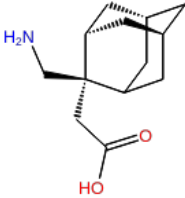
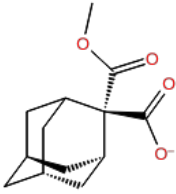
C ₁₈ H ₁₈ O ₅	12D2	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	12D3
C ₁₈ H ₂₂ O ₅	12D10	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	12E6
C ₁₅ H ₁₂ O ₃	12E7	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	12E8
C ₁₆ H ₁₆ O ₄	12E10	C ₁₅ H ₁₄ O ₃	12E11
C ₁₂ H ₈ O ₄	11E4	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	11E5
C ₁₅ H ₁₈ O ₅	11E6	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃	12F6
C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃	12F7	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₁	12F10
C ₁₃ H ₁₈ N ₄ O ₁	12F11	C ₁₁ H ₁₅ N ₅	12G4
C ₁₄ H ₂₁ N ₅	12G5	C ₁₀ H ₁₅ N ₅	12G8
C ₁₃ H ₂₁ N ₅	12G9	C ₁₅ H ₂₃ N ₅	12G10
C ₉ H ₁₀ Cl ₁ N ₃	12G11	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₁ N ₃	12H2
C ₁₁ H ₁₂ Cl ₁ N ₃	12H3	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₁ N ₃ O ₁	12H4
C ₁₄ H ₁₂ Cl ₁ N ₃ O ₁	12H5	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₂	14H11
C ₁₆ H ₁₈ N ₆ O ₁	15B6	C ₁₆ H ₂₄ N ₆ O ₁	15B11
C ₁₄ H ₁₃ F ₁ N ₄	15D4	C ₁₃ H ₁₃ N ₅	15D8
C ₁₃ H ₁₂ N ₄	15E2	C ₁₆ H ₁₈ N ₄	15E3
C ₉ H ₁₂ N ₄	15E5	C ₆ H ₆ N ₄	15E6
C ₁₁ H ₁₄ N ₄	15E7	C ₁₃ H ₁₂ N ₄	15E8
C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₁	15E9	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₁	15E11
C ₁₆ H ₁₂ O ₆	13C10	C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₂	15F2
C ₁₅ H ₁₂ Cl ₁ N ₅ O ₂	15F3	C ₁₃ H ₉ N ₃	15F4
C ₁₁ H ₈ N ₄ O ₃	15F5	C ₁₂ H ₈ N ₄ O ₂	15F7
C ₁₃ H ₁₂ N ₄	15H2	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₁	15H10
C ₁₄ H ₁₂ Cl ₁ N ₃ O ₁	15H11	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₁ N ₃ O ₁	17A2
C ₁₄ H ₁₂ F ₁ N ₃ O ₁	17A5	C ₁₄ H ₁₂ F ₁ N ₃ O ₁	17A6
C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₁	17A9	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₁	17A10
C ₁₃ H ₁₀ Cl ₁ N ₃ O ₁	17B2	C ₁₃ H ₁₀ Cl ₁ N ₃ O ₁	17B3
C ₁₃ H ₁₀ F ₁ N ₃ O ₁	17B6	C ₁₃ H ₁₀ F ₁ N ₃ O ₁	17B7
C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₁	17B11	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₁	17C2
C ₁₄ H ₁₂ Cl ₁ N ₃ O ₁	17C3	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₁ N ₃ O ₁	17C4
C ₁₄ H ₁₂ F ₁ N ₃ O ₁	17C7	C ₁₄ H ₁₂ F ₁ N ₃ O ₁	17C8
C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₁	17C11	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₁	17D2

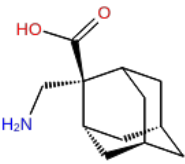
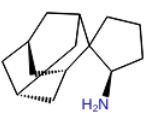
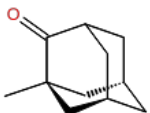
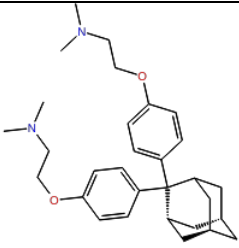
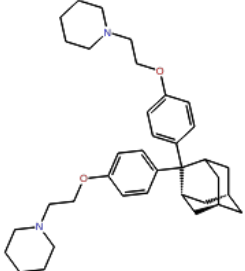
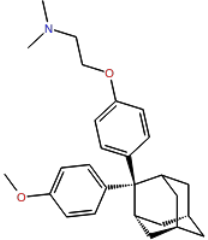
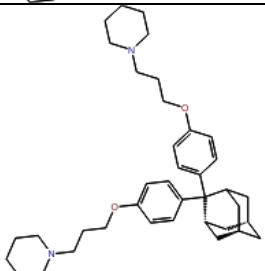
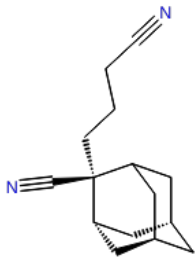
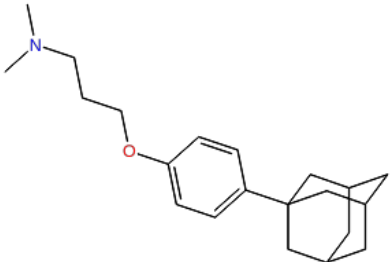
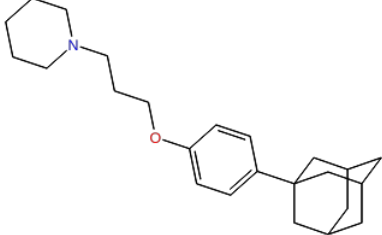
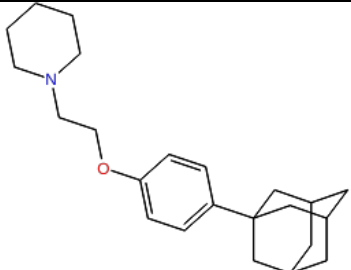
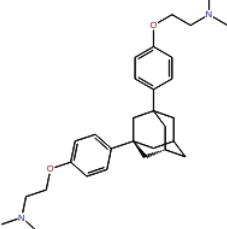
$C_{13}H_{10}F_1N_3O_1$	17D5		
-------------------------	------	--	--

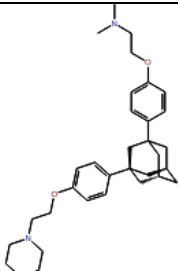
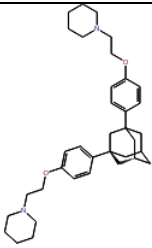
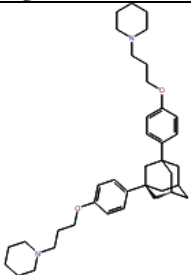
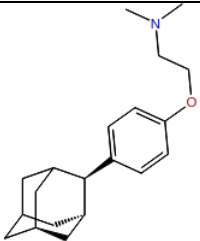
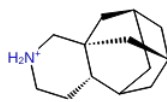
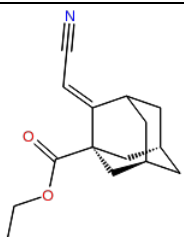
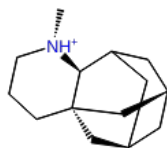
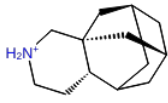
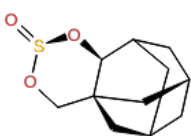
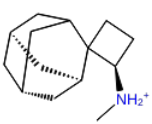
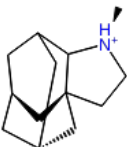
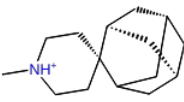
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

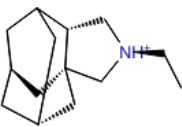
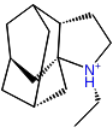
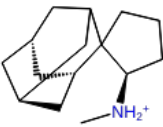
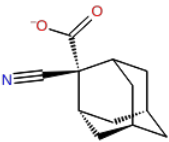
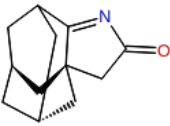
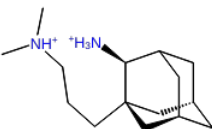
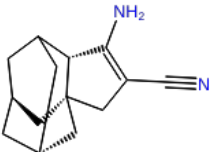
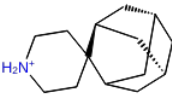
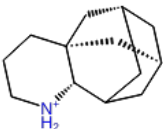
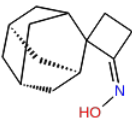
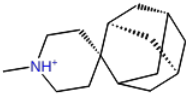
	Z28		Z36
	Z30		Z89
	Z31		Z35
	Z33		Z24
	Z27		Z38
	Z39		Z40

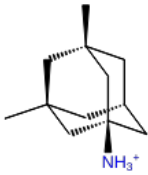
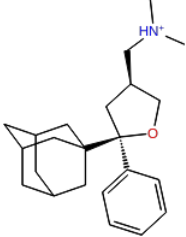
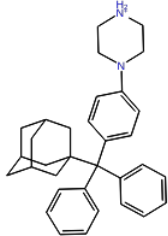
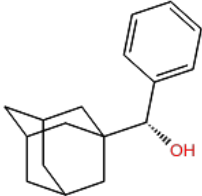
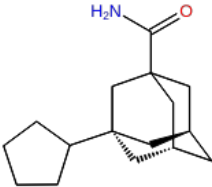
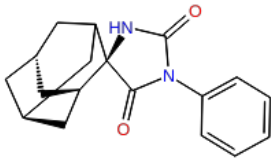
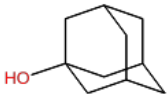
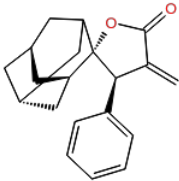
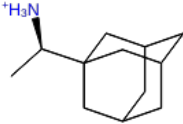
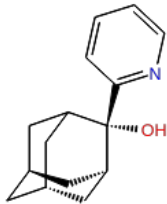
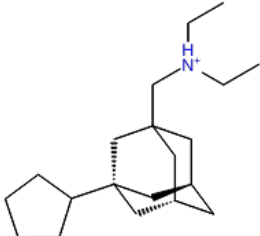
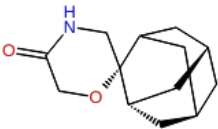
	Z41		Z42
	Z90		Z70
	Z71		Z72
	Z73		Z11
	Z75		Z25
	Z77		Z78

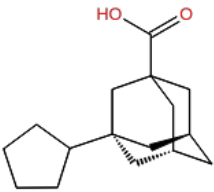
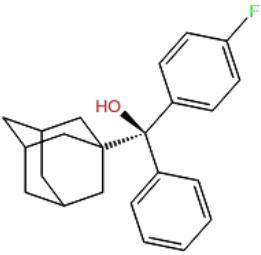
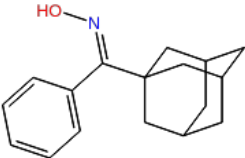
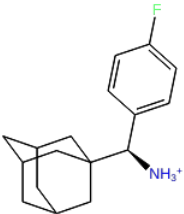
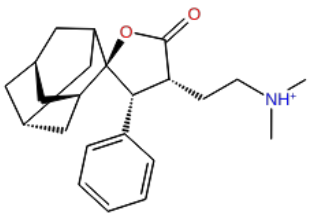
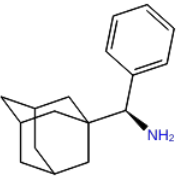
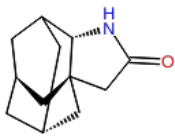
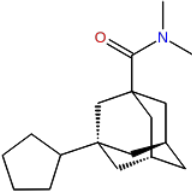
	Z79		Z80
	Z81		Z82
	Z83		Z84
	Z85		Z86
	Z87		Z88
	Z91		Z29

	Z92		Z93
	Z94		IP-2
	IP-4		IP-7
	IP-5		Z34
	IP-12		IP-15
	IP-14		IP-16

	IP-17		IP-18
	IP-19		IP-20
	Z20		Z1
	Z2		Z3
	Z4		Z5
	Z6		Z7

	Z8		Z9
	Z10		Z28
	Z12		Z13
	Z14		Z15
	Z16		Z17
	Z18		Z19

	Z67		Z47
	Z32		Z46
	Z45		Z62
	Z61		Z44
	Z58		Z59
	Z57		Z56

	Z55		Z54
	Z53		Z51
	Z48		Z49
	Z69		Z68

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Galdeano C., Ciulli A.(2016). Selectivity on-target of bromodomain chemical probes by structure-guided medicinal chemistry and chemical biology. *Future Med.Chem.*2016-0059

Ferri E., Petosa C., McKenna C. (2016). Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochemical Pharmacology* 106 : 1-18

Theodoulou N., Tomkinson N., Prinjha R., Humphreys P., (2016). Clinical progress and pharmacology of small molecule bromodomain inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology* 33:58-66.

Vidler L., Brown N., Knapp S., Hoelder S., (2012).Druggability analysis and structural classification of bromodomain acetyl-lysine binding sites. *Journal of Medicinal Chemistry.* 55:7346-7359

Hewings D., T. P. C. Rooney,L. E. Jennings, D. A. Hay, C. J. Schofield, P. E. Brennan, S. Knapp, S. J. Conway (2012). Progress in the Development and Application of Small Molecule Inhibitors of Bromodomain–Acetyl-lysine Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry.* 55:9393-9413

P. Filippakopoulos, S. Picaud, M. Mangos, T. Keates, J. Lambert, D. Barsyte-Lovejoy, I. Felletar, R. Volkmer, S. Muller, T. Pawson, A. Gingras, C. Arrowsmith, and S. Knapp (2012). Histone Recognition and Large-Scale Structural Analysis of the Human Bromodomain Family. *Cell.* 149: 214-231

Tomomi Noguchi-Yachide (2016). BET Bromodomain as a Target of Epigenetic Therapy *Chem. Pharm. Bull.* 64, 540–547

L. Simó-Riudalbas, M.Esteller (2015). Targeting the histone orthography of cancer: drugs for writers, erasers and readers. *British Journal of Pharmacology.* 172:2716-2732

P. Filippakopoulos, S. Knapp (2012). The bromodomain interaction module. *FEBS Letters.* 586:2692-2704

Xiang-Jiao Yang (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *BioAssays.* 26:1076–1087

Brian S. Gerstenberger, John D. Trzupek, Cynthia Tallant, Oleg Fedorov, Panagis Filippakopoulos, Paul E. Brennan, Vita Fedele, Sarah Martin, Sarah Picaud, Catherine Rogers, Mihir Parikh, Alexandria Taylor, Brian Samas, Alison O’Mahony, Ellen Berg, Gabriel Pallares, Adam D. Torrey, Daniel K. Treiber, Ivan J. Samardjiev, Brian T. Nasipak, Teresita Padilla-Benavides, Qiong Wu, Anthony N. Imbalzano, Jeffrey A. Nickerson, Mark E. Bunnage, Susanne Müller, Stefan Knapp and Dafydd R. Owen (2016). Identification of a Chemical Probe for Family VIII Bromodomains through Optimization of a Fragment Hit. *Journal of Medicinal Chemistry.*

Natalie H. Theodoulou, Paul Bamborough, Andrew J. Bannister, Isabelle Becher, Rino A. Bit, Ka Hing Che, Chun-wa Chung, Antje Dittmann, Gerard Drewes, David H. Drewry, Laurie Gordon, Paola Grandi, Melanie Leveridge, Matthew Lindon, Anne-Marie Michon, Judit Molnar, Samuel C. Robson, Nicholas C. O. Tomkinson, Tony Kouzarides, Rab K. Prinjha and Philip G. Humphreys (2015). Discovery of I-BRD9, a Selective Cell Active Chemical Probe for Bromodomain Containing Protein 9 Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*

Conway S. (2012). Bromodomains: Are Readers Right for Epigenetic Therapy? *Med. Chem. Lett.* 2012, 3, 691–694

V. Myrianthopoulos, N. Gaboriaud-Kolar, C. Tallant, M. Hall, S. Grigoriou, P. Moore Brownlee, O. Fedorov, C. Rogers, D. Heidenreich, M. Wanior, N. Drosos, N. Mexia, P. Savitsky, T. Bagratuni, E. Kastitis, E. Terpos, P. Filippakopoulos, S. Muller, A. Skaltsounis, J. Downs, S. Knapp, E. Mikros (2016). Discovery and Optimization of selective ligand for the Switch/Sucrose Non fermenting-related Bromodomains of Polybromo-Protein 1 by the Use of Virtual Screening and Hydration Analysis. *Journal of Medicinal Chemist*

Angulo, J., and Nieto, P.M. (2011). STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules—a quantitative approach. *Eur. Biophys. J.* 40, 1357–1369.

Banister, S.D., Wilkinson, S.M., Longworth, M., Stuart, J., Apetz, N., English, K., Brooker, L., Goebel, C., Hibbs, D.E., Glass, M., et al. (2013). The Synthesis and Pharmacological Evaluation of Adamantane-Derived Indoles: Cannabimimetic Drugs of Abuse. *ACS Chem. Neurosci.* 4, 1081–1092.

Biela, A., Betz, M., Heine, A., and Klebe, G. (2012). Water Makes the Difference: Rearrangement of Water Solvation Layer Triggers Non-additivity of Functional Group Contributions in Protein-Ligand Binding. *ChemMedChem* 7, 1423–1434.

Boyd, S.M., and de Kloe, G.E. (2010). Fragment library design: efficiently hunting drugs in chemical space. *Drug Discov. Today Technol.* 7, e173–e180.

Chen, Y., and Shoichet, B.K. (2009). Molecular docking and ligand specificity in fragment-based inhibitor discovery. *Nat. Chem. Biol.* 5, 358–364.

Dalvit, C., Fogliatto, G., Stewart, A., Veronesi, M., and Stockman, B. (2001). WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: Practical aspects and range of applicability. *J. Biomol. NMR* 21, 349–359.

Doak, B.C., Norton, R.S., and Scanlon, M.J. (2016). The ways and means of fragment-based drug design. *Pharmacol. Ther.* 167, 28–37.

Erlanson, D.A., Fesik, S.W., Hubbard, R.E., Jahnke, W., and Jhoti, H. (2016). Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, nrd.2016.109.

Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., and Andricopulo, A. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules* 20, 13384–13421.

- Fuller, N., Spadola, L., Cowen, S., Patel, J., Schönherr, H., Cao, Q., McKenzie, A., Edfeldt, F., Rabow, A., and Goodnow, R. (2016). An improved model for fragment-based lead generation at AstraZeneca. *Drug Discov. Today* 21, 1272–1283.
- H Niesen, F., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* 2, 2212–2221.
- Hajduk, P.J., and Greer, J. (2007). A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 211–219.
- Harner, M.J., Frank, A.O., and Fesik, S.W. (2013). Fragment-based drug discovery using NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* 56, 65–75.
- Hartshorn, M.J., Murray, C.W., Cleasby, A., Frederickson, M., Tickle, I.J., and Jhoti, H. (2005). Fragment-Based Lead Discovery Using X-ray Crystallography. *J. Med. Chem.* 48, 403–413.
- Hopkins, A.L., Keserü, G.M., Leeson, P.D., Rees, D.C., and Reynolds, C.H. (2014). The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 105.
- Hubbard, R.E., and Murray, J.B. (2011). Experiences in Fragment-Based Lead Discovery. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 509–531.
- Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., and Philpott, K. (2011). Principles of early drug discovery: Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1239–1249.
- Hwang, T.L., and Shaka, A.J. (1995). Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson. A* 112, 275–279.
- Janzen, W.P. (2014). Screening Technologies for Small Molecule Discovery: The State of the Art. *Chem. Biol.* 21, 1162–1170.
- Jencks, W.P. (1981). On the attribution and additivity of binding energies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 4046–4050.
- Joseph-McCarthy, D., Campbell, A.J., Kern, G., and Moustakas, D. (2014). Fragment-Based Lead Discovery and Design. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 693–704.
- Keserü, G.M., Erlanson, D.A., Ferenczy, G.G., Hann, M.M., Murray, C.W., and Pickett, S.D. (2016). Design Principles for Fragment Libraries: Maximizing the Value of Learnings from Pharma Fragment-Based Drug Discovery (FBDD) Programs for Use in Academia. *J. Med. Chem.* 59, 8189–8206.
- Klebe, G. (2006). Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov. Today* 11, 580–594.
- Köster, H., Craan, T., Brass, S., Herhaus, C., Zentgraf, M., Neumann, L., Heine, A., and Klebe, G. (2011). A Small Nonrule of 3 Compatible Fragment Library Provides

- High Hit Rate of Endothiapepsin Crystal Structures with Various Fragment Chemotypes. *J. Med. Chem.* **54**, 7784–7796.
- Ladbury, J.E. (2001). Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. *Thermochim. Acta* **380**, 209–215.
- Leavitt, S., and Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 560–566.
- Macalino, S.J.Y., Gosu, V., Hong, S., and Choi, S. (2015). Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 1686–1701.
- Mayer, M., and Meyer, B. (1999). Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1784–1788.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods* **34**, 254–265.
- Meyer, B., and Peters, T. (2003). NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 864–890.
- Over, B., Wetzel, S., Grütter, C., Nakai, Y., Renner, S., Rauh, D., and Waldmann, H. (2013). Natural-product-derived fragments for fragment-based ligand discovery. *Nat. Chem.* **5**, 21–28.
- Peng, C., Frommlet, A., Perez, M., Cobas, C., Blechschmidt, A., Dominguez, S., and Lingel, A. (2016). Fast and Efficient Fragment-Based Lead Generation by Fully Automated Processing and Analysis of Ligand-Observed NMR Binding Data. *J. Med. Chem.* **59**, 3303–3310.
- Renaud, J.-P., Chung, C., Danielson, U.H., Egner, U., Hennig, M., Hubbard, R.E., and Nar, H. (2016). Biophysics in drug discovery: impact, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 679–698.
- Scott, D.E., Coyne, A.G., Hudson, S.A., and Abell, C. (2012). Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 4990–5003.
- Scott, D.E., Bayly, A.R., Abell, C., and Skidmore, J. (2016). Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein–protein interaction challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15**, 533.
- Shoichet, B.K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature* **432**, 862–865.
- Silvestre, H.L., Blundell, T.L., Abell, C., and Ciulli, A. (2013). Integrated biophysical approach to fragment screening and validation for fragment-based lead discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 12984–12989.
- Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F.L., and Cabrita, E.J. (2011). Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.* **88**, 990–994.

