



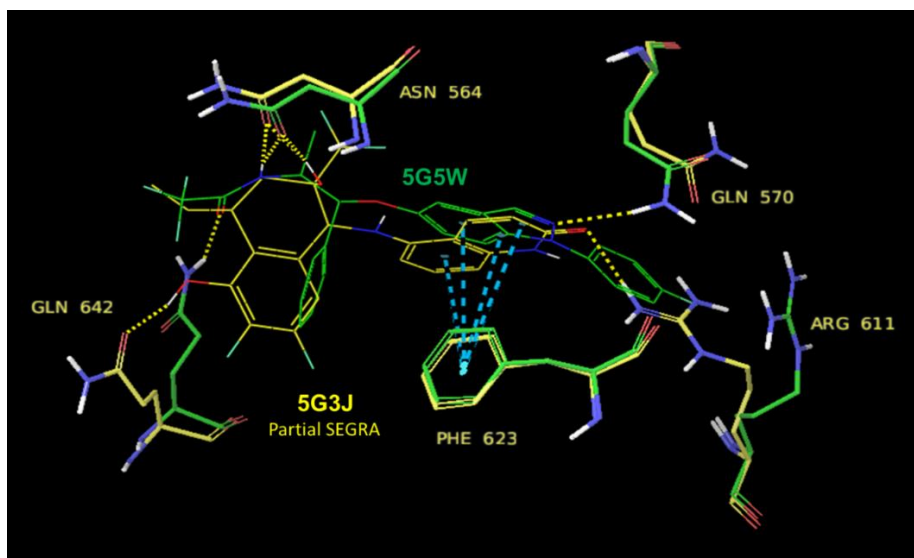
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

*«In silico μελέτες για την αναζήτηση επιλεκτικών
αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών»*



Τραυλός Νικηφόρος

Πτυχιούχος ΜΔΕ Βιοπληροφορικής, Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ (2016-2017)



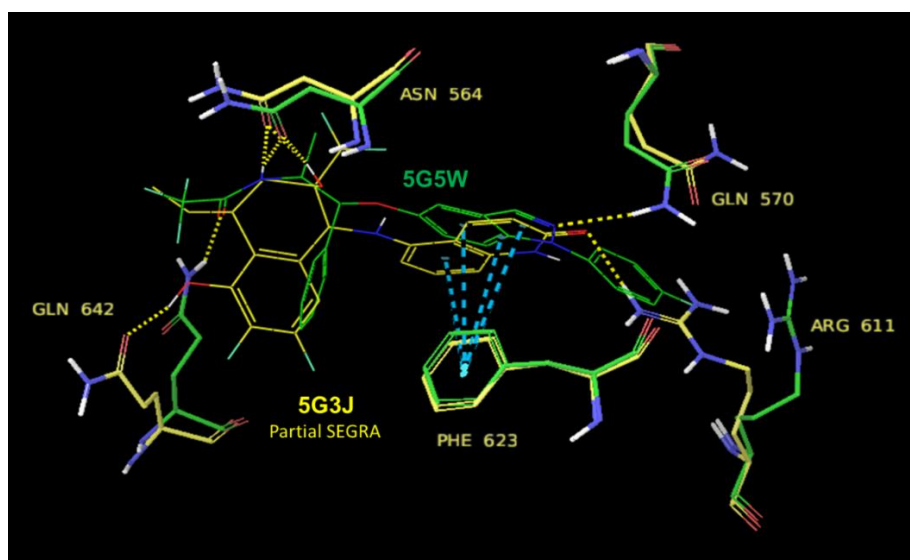
HELLENIC REPUBLIC
National and Kapodistrian
University of Athens

SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY

MASTER IN “BIOINFORMATICS”

MASTER DIPLOMA THESIS

“In-silico design of new and potent glucocorticoid receptor
agonists”



Travlos Nikiforos

MSc Bioinformatics, National and Kapodistrian University of
Athens

ATHENS (2016-2017)



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικό και Καποδιστριακό

Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

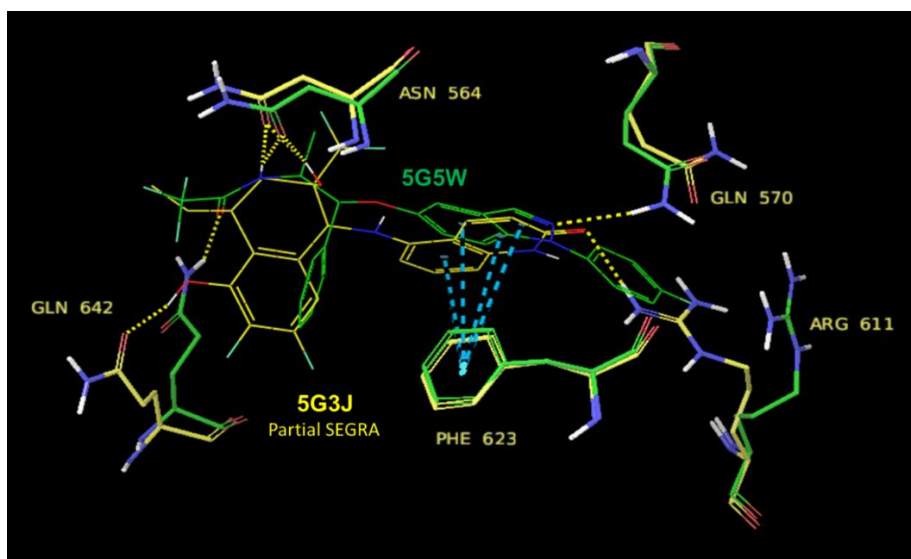
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»

Δ Ι Π Λ Ω Μ Α Τ Ι Κ Η Ε Ρ Γ Α Σ Ι Α

*«In silico μελέτες για την αναζήτηση επιλεκτικών
αγωνιστών του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών»*



Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Καθηγητής Κωνσταντίνος Βοργιάς (Επιβλέπων),

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Μαρία Ζερβού,

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δρ. Θεοδώρα Καλογεροπούλου

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) χρησιμοποιούνται ευρέως ως ισχυρά αντιφλεγμονώδη φάρμακα. Ωστόσο, η θεραπεία με GC συνοδεύεται συχνά από δυσμενείς παρενέργειες. Η αντιφλεγμονώδης δράση των GCs διαμεσολαβείται μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) εν μέρει με τον ανταγωνισμό του προφλεγμονώδους πυρηνικού παράγοντα NF-κΒ ενώ η πλειοψηφία των παρενεργειών θεωρείται ότι διαμεσολαβείται με την ενεργοποίηση των γονιδίων στόχων του GR (GRE-Glucocorticoid Receptor Elements).

Η εργασία αυτή στόχευσε στην ανακάλυψη νέων μη στεροειδών εκλεκτικών αγωνιστών του υποδοχέα GR (SEGRA) που κατά προτίμηση θα καταστέλλουν τη δράση του NF-κΒ (μονοπάτι transrepression) ενώ θα έχουν ένα προφίλ μερικού αγωνιστή στο μονοπάτι transactivation (μικρότερης έντασης ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων μέσω GRE) που σχετίζεται με ανεπιθύμητες παρενέργειες .

Αναζητήθηκαν νέα μόρια με πιθανό βιολογικό ενδιαφέρον με εικονική σάρωση της βιβλιοθήκη μορίων ZINC (7.600.000 καταχωρήσεις) δημιουργώντας ένα φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση γνωστά βιοδραστικά μόρια με προφίλ SEGRA. Αν και υπάρχουν αρκετές λυμένες δομές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, υιοθετήθηκε αυτή η προσέγγιση (ligand-based pharmacophore modeling) σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν διαφορετικού μεγέθους βιοδραστικά μόρια δεδομένου ότι ο GR διαθέτει ένα εξαιρετικά εύπλαστο κέντρο σύνδεσης (GR-LBD , glucocorticoid receptor-ligand binding domain) που μπορεί να προσαρμόζεται στο μέγεθος του προσδέτη.

Δημιουργήθηκε ένα φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση τη 'συνένωση' (merge) των κοινών χαρακτηριστικών της ομάδας εκπαίδευσης (training set) αποτελούμενης από 21 μη στεροειδή SEGAs σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα. Το τελικό φαρμακοφόρο μοντέλο αξιολογήθηκε και επικυρώθηκε με τη βοήθεια ήδη υπάρχουσας βιβλιοθήκης ελέγχου (προηγούμενη ερευνητική εργασία του

IBΦXB/EIE) αποτελούμενης από ένα σύνολο 85 δραστικών μορίων (actives) και 170 μη δραστικών μορίων (decoys) σύμφωνα με δεδομένα της βάσης ChEMBL.

Το πρωτόκολλο εικονικής σάρωσης που εφαρμόστηκε περιελάμβανε τη σάρωση της βιβλιοθήκη Zinc με βάση το φαρμακοφόρο μοντέλο, το φιλτράρισμα των ανακτηθέντων ενώσεων με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και την επιβολή μίας σειράς αλγορίθμων μοριακής πρόσδεσης αυξανόμενης ακρίβειας ανάλογα με το στάδιο και το πλήθος των ενώσεων. Συγκεκριμένα οι ενώσεις δοκιμάσθηκαν ως προς την πρόσδεσή τους στο GR-LBD με τους αλγορίθμους Glide HTVS (High-Throughput Virtual Screening), SP (Standard Precision) και IFD (Induced Fit Docking).

Τα τελευταία στάδια ελέγχου της μοριακής πρόσδεσης (SP και IFD) εφαρμόστηκαν σε δύο πρόσφατα λυμένες κρυσταλλικές δομές (pdb: 5G3J και pdb: 5G5W) προκειμένου για τη διεύρυνση του πλήθους των ενώσεων πιθανού ενδιαφέροντος.

Η τελική ταξινόμηση καθοδηγήθηκε από τη συγγένεια πρόσδεσης και την παρουσία κρίσιμων αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο, το προφίλ ADME με ιδιαίτερη έμφαση στη λιποφιλικότητα λαμβάνοντας υπόψη ότι η θήκη είναι εξαιρετικά λιπόφιλη καθώς και τον περιορισμένο αριθμό προβλεπόμενων μεταβολιτών ενώ ελήφθη υπόψη και η ποικιλομορφία στους χημειότυπους. Προκρίθηκαν 17 ενώσεις πιθανού ενδιαφέροντος για αγορά και βιολογική αποτίμηση.

Η διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο διάστημα 2017 - 2018, στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

ABSTRACT

Glucocorticoids (GCs) are among the most prescribed drugs worldwide for the treatment of numerous immune and inflammatory disorders. However, GC therapy is often accompanied by a wide range of adverse side effects. GCs anti-inflammatory effects are mediated through the glucocorticoid receptor (GR) mainly by inhibiting the pro-inflammatory transcription factor NF- κ B action, a mechanism termed transrepression. On the other hand, it is widely accepted that the majority of side effects of GCs are triggered through the transactivation activity, a mechanism which refers to the direct binding of activated GR to DNA elements known as glucocorticoid responsive elements (GREs).

This study aimed at discovering new non-steroidal selective GR receptor agonists (SEGRA) that would preferably suppress NF- κ B activity (transrepression pathway) while displaying a partial agonist profile in the transactivation pathway associated with undesirable side effects.

ZINC database (7.600.000 entries) was virtually screened against a generated ligand-based pharmacophore model based on known bioactive molecules with SEGRA profile. The ligand-based pharmacophore approach was adopted in an effort to identify potential hits of different sizes since the binding cavity of the GR-LBD is extremely flexible and can adapt to ligands of impressively different sizes.

A training set of 21 nonsteroidal SEGRA was used to construct a merged pharmacophore model bearing their common features. The model was refined and validated by virtually screening a database consisting of 85 actives and 170 inactives as recovered from ChEMBL database.

The applied protocol included the pharmacophore-based virtual screening of Zinc database, the filtering of the retrieved compounds based on their

physicochemical properties, and molecular docking studies at the GR-LBD active site by applying *in silico* docking algorithms of increasing accuracy (Glide HTVS -High Precision Virtual Screening, SP -Standard Precision, IFD- Induced Fit Docking). Two recently resolved crystal structures (pdb: 5G3J και pdb: 5G5W) were used for the SP and IFD docking calculations in order to expand the number of compounds of potential interest.

The final selection was guided by the binding affinity and the presence of critical interactions in the active site, the ADME profiling (high lipophilicity and low number of predicted metabolites) and chemotypes diversity. A set of 17 compounds was prioritized to be purchased for biological evaluation.

The research work of the current thesis was implemented at the Institute of Biology, Medicinal Chemistry and Biotechnology of the National Hellenic Research Foundation (2017-2018).

Περιεχόμενα

1	Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών	10
1.1	Πυρηνικοί υποδοχείς - Ο υποδοχέας GR.....	10
1.2	Δομικά χαρακτηριστικά του υποδοχέα GR	12
1.3	Η δέση πρόσδεσης – LBD	13
1.4	Κρυσταλλικές δομές συμπλόκων του GR–LBD με μικρά μόρια-προσδέτες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.....	16
2	Τα γλυκοκορτικοειδή και η φαρμακευτική τους δράση.....	20
2.1	Side Effects ή ανεπιθύμητες ενέργειες.....	21
3	Μηχανισμός δράσης των γλυκοκορτικοειδών	24
4	Το προφίλ του επιλεκτικού αγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA).....	27
5	σχεδιασμός στην ανακάλυψη φαρμάκου	29
5.1	Ορθολογικός σχεδιασμός	29
5.2.	Η χρήση των φαρμακοφόρων μοντέλων στην προσέγγιση CADD	31
6.	Μέθοδοι.....	33

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	38
7.1. Επιλογή ομάδας εκπαίδευσης του μοντέλου (training set).....	38
7.2. Κατασκευή φαρμακοφόρου μοντέλου	41
7.3. Αξιολόγηση και επικύρωση φαρμακοφόρου μοντέλου	43
7.4. Εικονική σάρωση της βιβλιοθήκης ZINK	47
7.4.1. High-Throughput virtual screening.....	49
7.5. Μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) με εφαρμογή αλγορίθμων υψηλής ακρίβειας.....	51
7.5.1. SP και IFD docking.....	54
7.6. Ομαδοποίηση και Επιλογή.....	60
8. Αποτελέσματα	63
8.1 ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟ 5G3J	64
8.2 Μόρια που επιλέγονται από την πρόσδεση στον κρύσταλλο 5g3j.....	73
9 Συντομογραφίες	88
10 Βιβλιογραφία	89
10.1 end.....	93

1 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

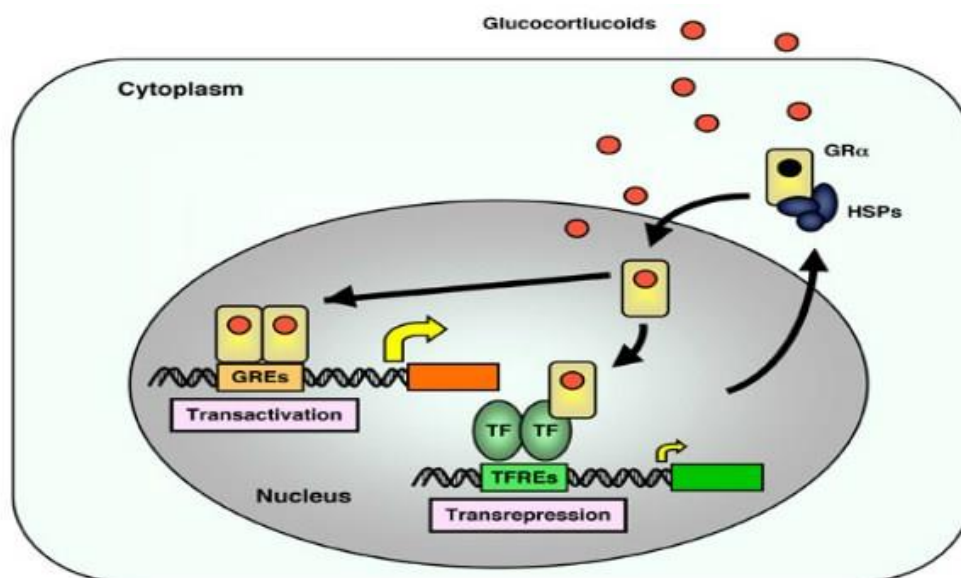
1.1 ΠΥΡΗΝΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ - Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ GR

Ο GR κατατάσσεται στην κλάση των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptors - NRs). Στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν αναγνωριστεί 48 NRs. Ο (GR) υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών ανήκει σε μια υποοικογένεια των NRs, γνωστή ως «υποδοχείς στεροειδών ορμονών» (steroid hormone receptor - SHR). Τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας αυτής είναι, ο (MR) υποδοχέας αλατοκορτικοειδών, ο (PR) υποδοχέας προγεστερόνης, ο (AR) υποδοχέας ανδρογόνων και οι υποδοχείς οιστρογόνων (ERα και ERβ (Πίνακας 1)

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι μεταγραφικοί παράγοντες, συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ή στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Ο υποδοχέας GR, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας SHR, στην ανενεργή του μορφή συγκρατείται στο κυτταρόπλασμα από τις πρωτεΐνες συνοδούς (chaperone proteins HSP). Οι ενδογενείς στεροειδείς ορμόνες που αποτελούν τους φυσιολογικούς προσδέτες των SHR, εξαιτίας της λιπιδικής φύσης τους διαπερνούν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες. Η πρόσδεση του φυσιολογικού προσδέτη (κορτιζόλη) ενεργοποιεί τον υποδοχέα GR και τον αποδεσμεύει από τις HSPs. Τα ενεργοποιημένα σύμπλοκα μεταναστεύουν στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρούν, είτε με ειδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στο γονιδίωμα (GRE-Glucocorticoid Receptor Elements), είτε με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες ρυθμίζοντας τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχουν ένα πλήθος βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της διατήρησης της εσωτερικής ομοιόστασης και του μεταβολισμού. (Εικόνα 1) [44]

Receptor	Abbreviation	Ligand
Androgen receptor	AR	Testosterone
Estrogen receptor	ER	Estrogen
Estrogen-related receptor	ERR	?
Glucocorticoid receptor	GR	Cortisol
Mineralocorticoid receptor	MR	Aldosterone
Progesterone receptor	PR	Progesterone
Retinoic acid receptor	RAR	Retinoic acid
Retinoid orphan receptor	ROR	?
Retinoic acid-related receptor	RXR	Rexinoids
Liver X receptor	LXR	Oxysterols
Peroxisome proliferator-activated receptor γ	PPAR γ	Fatty acid metabolites
Thyroid hormone receptor	TR	Thyroid hormone
Vitamin D ₃ receptor	VDR	Vitamin D ₃

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά παραδείγματα πυρηνικών υποδοχέων και οι φυσιολογικοί προσδέτες τους. Ορισμένοι από αυτούς παραμένουν «ορφανοί» [45]



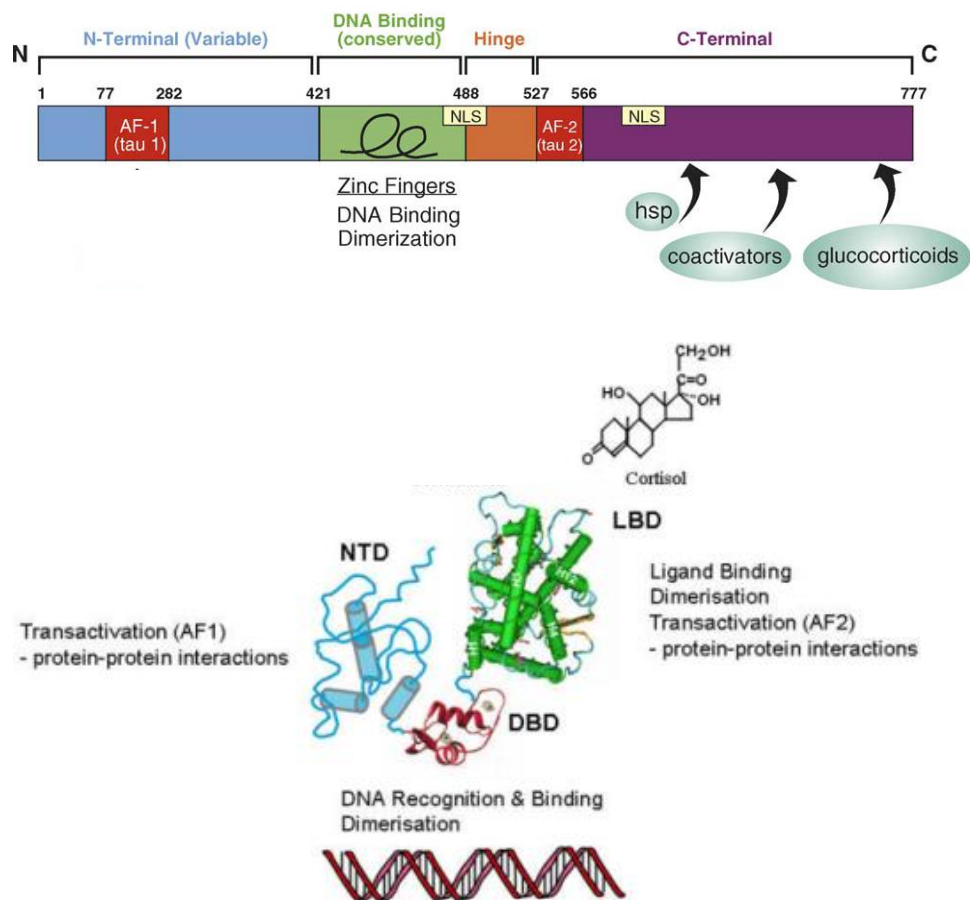
Εικόνα 1: Απλουστευμένο διάγραμμα σηματοδότησης του GR. Υποδεικνύεται η μετανάστευση του ενεργοποιημένου συμπλόκου από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου προάγεται η μεταγραφή γονιδίων μέσω απευθείας πρόσδεσης στο DNA (Transactivation) είτε καταστέλλεται [44]

1.2 ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ GR

Ο υποδοχέας GR, όπως και οι υπόλοιποι πυρηνικοί, έχουν τρεις δομικά αυτοτελείς περιοχές (domains). Η κεντρική περιοχή είναι αυτή που αναγνωρίζει, συνδέεται και αλληλεπιδρά με το DNA (DNA Binding Domain - DBD). Περιλαμβάνει δύο υψηλά συντηρημένα μοτίβα, που χαρακτηρίζονται από τη συμπλοκοποίηση δύο ιόντων Zn^{+2} , που συντελούν στη σωστή αναδίπλωση του DBD (zinc fingers). Στο καρβονυλικό άκρο του συνδέονται οι προσδέτες, η ενδογενής ορμόνη ή συνθετικά γλυκοκορτικοειδή (Ligand Binding Domain - LBD), και ενεργοποιείται ο υποδοχέας.

Η περιοχή LBD αποτελείται από 12 α-έλικες (H1-H12,) οι οποίες αναδιπλώνονται σχηματίζοντας στο κέντρο έναν υδρόφοβο πυρήνα, όπου συνδέεται ο προσδέτης. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται επίσης οι θέσεις πρόσδεσης των συνοδών πρωτεϊνών (HSP), των συνενεργοποιητών (coactivators) και άλλων μεταγραφικών παραγόντων καθώς και η περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφικής δράσης AF-2 (activation function-2). Πρόκειται για τμήμα της έλικας H12 η θέση της οποίας, μεταβάλλεται από την παρουσία του προσδέτη ώστε να αποτελέσει μέρος της υδρόφοβης κοιλότητας πρόσδεσης. Το αμινοτελικό άκρο (N-Terminal Domain - NTD) περιλαμβάνει την περιοχή ενεργοποίησης AF-1 (activation function-1), απαραίτητη για τη μέγιστη μεταγραφική δραστηριότητα του GR.

Οι περιοχές LBD και DBD των SHRs παρουσιάζουν σημαντική ομολογία σε ότι αφορά την αμινοξική ακολουθία αλλά και την τριτοταγή δομή σε αντίθεση με την περιοχή NTD. [27, 28]



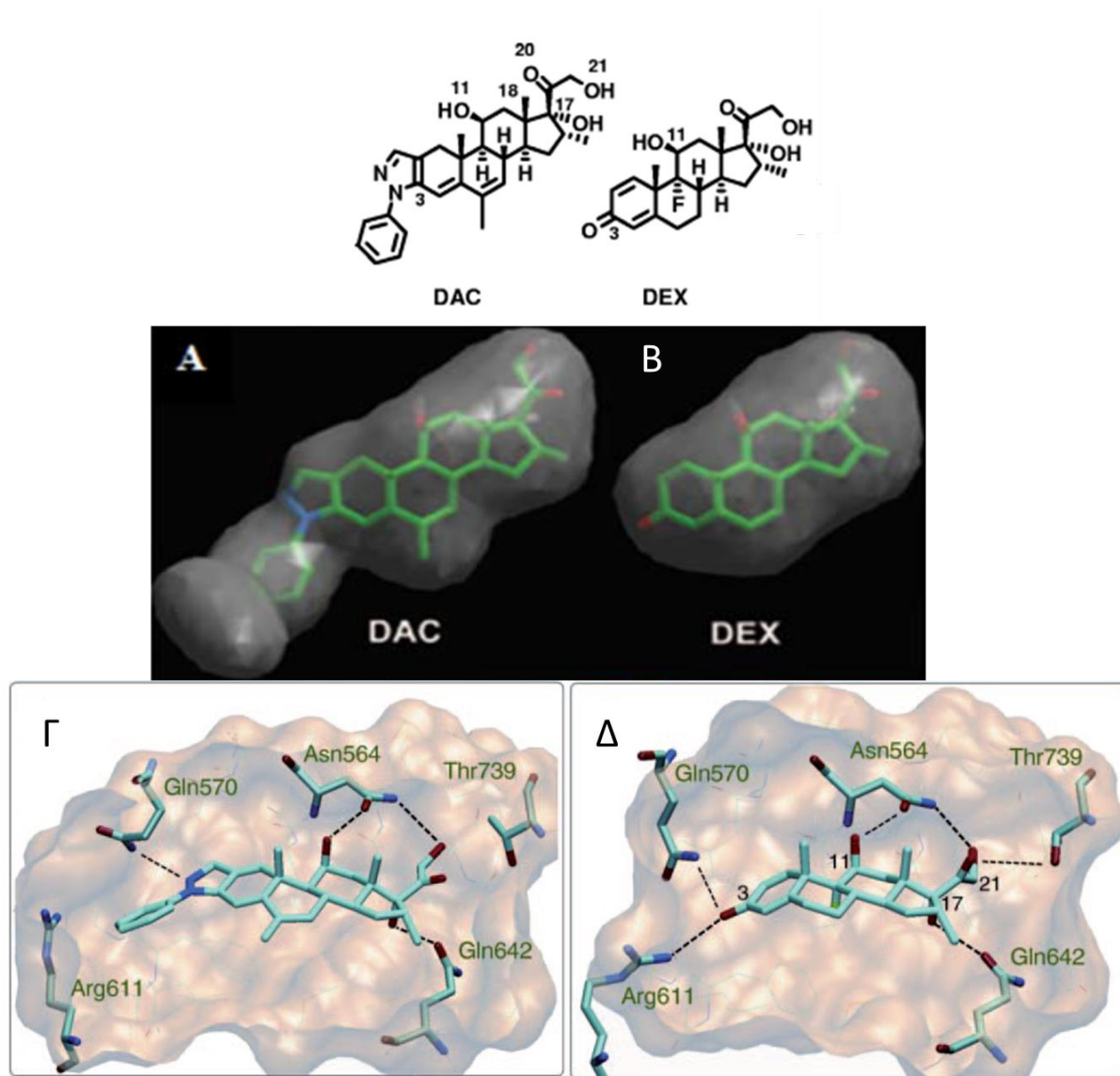
Εικόνα 1 : Οι τρεις δομικά αυτοτελείς περιοχές του GR. [46]

1.3 Η ΘΕΣΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ – LBD

Μελέτες πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας των συμπλόκων της αυτοτελούς περιοχής σύνδεσης (LBD) του GR με στεροειδή, αγωνιστές και ανταγωνιστές, οδήγησαν στη χαρτογράφηση του κέντρου πρόσδεσης. Στην Εικόνα 3 παρατίθεται η κρυσταλλική δομή του GR LBD με τη δεξαμεταζόνη (DEX), συνθετικό γλυκοκορτικοειδές που χορηγείται ως αντιφλεγμονώδες. Αξίζει να σημειωθούν οι αλληλεπιδράσεις των

πολικών ομάδων του στεροειδούς με την Asn564 (H3), η οποία είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση του υποδοχέα καθώς και οι δεσμοί H μεταξύ της καρβονυλομάδας στη θέση-3 του A-δακτυλίου του μορίου με τα αμινοξέα Arg611 (Helix 5) και Gln570 (Helix 3) που φαίνεται να οριοθετούν και το ένα άκρο της θήκης πρόσδεσης [49]. Αργότερα, αποδείχθηκε ότι το ενεργό κέντρο μπορεί να διευρυνθεί προς αυτή την κατεύθυνση με σημαντική μετατόπιση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων Arg611 και Gln570 με αποτέλεσμα, τη δημιουργία ενός νέου καναλιού στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα. Έτσι, ο χώρος του ενεργού κέντρου διευρύνεται σημαντικά επιτρέποντας την πρόσδεση μεγαλύτερων μορίων όπως το εξαιρετικά δραστικό φαινυλ πυραζολο γλυκο-κορτικοειδές δεακυλοκορτιβαζόλη (DAC) [47]. (Εικόνα 3). Είναι αξιοσημείωτο ότι αν και το μέγεθος του DAC είναι περίπου 25% μεγαλύτερο από το DEX, ο όγκος της θήκης πρόσδεσης στον κρύσταλλο του DAC είναι διπλάσιος (1,070 Å³) σε σχέση με τον όγκο της θήκης στον κρύσταλλο του DEX (540 Å³).

Συνοψίζοντας, ο GR διαθέτει ένα εξαιρετικά εύπλαστο κέντρο σύνδεσης που μπορεί να προσαρμόζεται στο μέγεθος του προσδέτη και αποτελεί έναν προκλητικό στόχο στις ερευνητικές προσπάθειες για το σχεδιασμό και ανάπτυξη νέων, μη στεροειδικών επιλεκτικών αγωνιστών.



Εικόνα 3: Η περιοχή GR-LBD όπου προσδένεται η φυσιολογική ορμόνη ή συνθετικά ανάλογα των γλυκοκορτικοειδών είναι ευέλικτη και μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με το μέγεθος του μορίου.- Παρατίθενται ενδεικτικά η θέση πρόσδεσης στο GR-LBD της δεξαμεθαζόνης (pdb: 1M2Z) και του δραστικού αναλόγου με στεροειδικό σκελετό DAC (pdb: 3BQD). Καταγράφονται επίσης οι αλληλεπιδράσεις με τα κρίσιμα αμινοξέα του ενεργού κέντρου ενώ εικονίζεται και για συγκριτικούς λόγους η επιφάνεια της δέσμης. [47,48]

1.4 ΚΡΥΣΤΑΛΛΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ GR–LBD ΜΕ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ-ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ

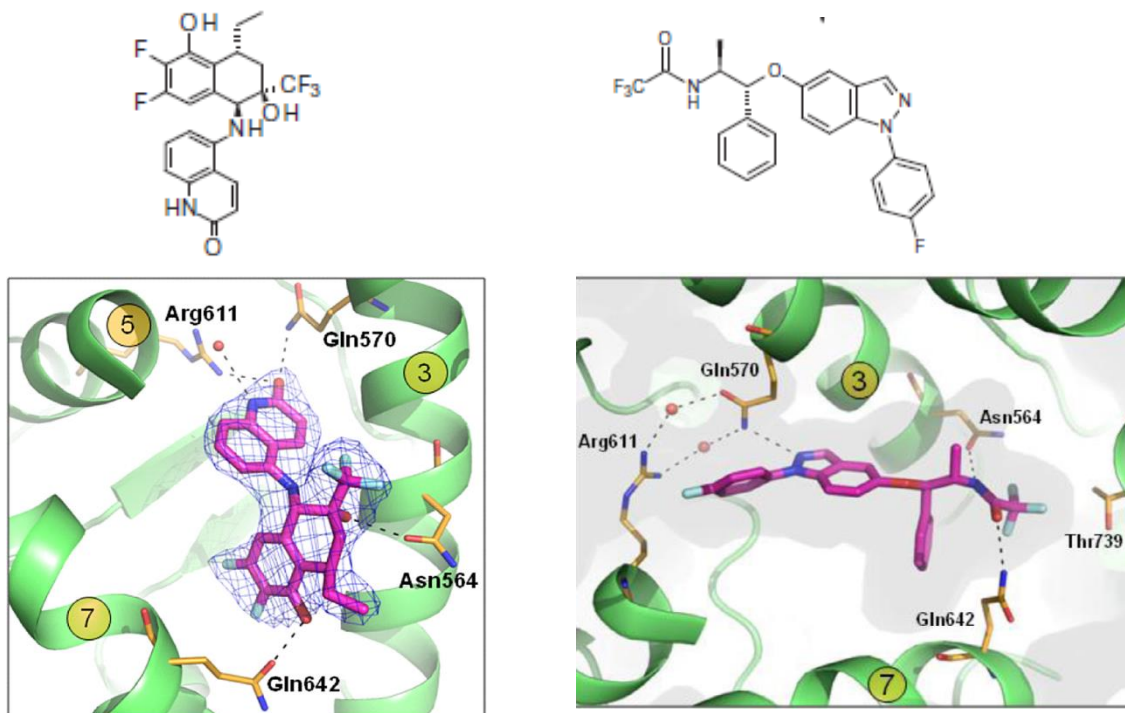
Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών έχει μελετηθεί εκτενώς. Η PDB [29] διατηρεί 65 κωδικούς με τον GR, τριάντα επτά εκ των οποίων είναι του ανθρώπου. Οι 23 από αυτές, όπου εμφανίζεται το LBD, αποτελούν κύριο αντικείμενο μελέτης για την δραστικότητα των φαρμάκων. Οι υπόλοιπες αναπαριστούν το DBD και μόνο σε μία, στη 5UC3, φαίνεται ολόκληρος ο υποδοχέας.

2018	6EL6	6EL7	6EL9		
2017	5NFP	5NFT	5G3J	5G5W	
2015	4UDC	4UDD			
2014	4MDD	4CSJ	4P6W	4P6X	4LSJ h
2010	3K22				
	3H52				
2009	h	3K23			
2008	3E7C	3CLD	3BQD		
	1M2Z				
2003	d	1P93	1NHZ		

Πίνακας 2: Όλες οι δομές του GR LBD και το έτος δημοσίευσης τους στην PDB.

Ο πρώτος κρύσταλλος λύθηκε τον Ιούνιο του 2003 και οι πλέον πρόσφατοι τον Φεβρουάριο του 2018. Οι δύο δομές με κωδικό 5G3J [6] και 5G5W [7] είναι αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο της μοριακής πρόσδεσης της εργασίας, καθώς

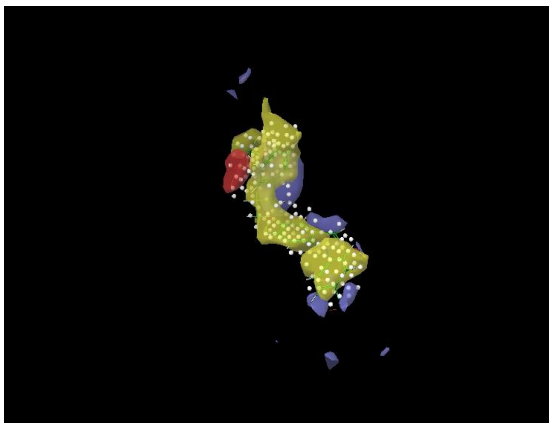
ήταν και οι πιο πρόσφατες αλλά και αυτές με την καλύτερη ανάλυση (resolution $2 \text{ \AA}^2$).



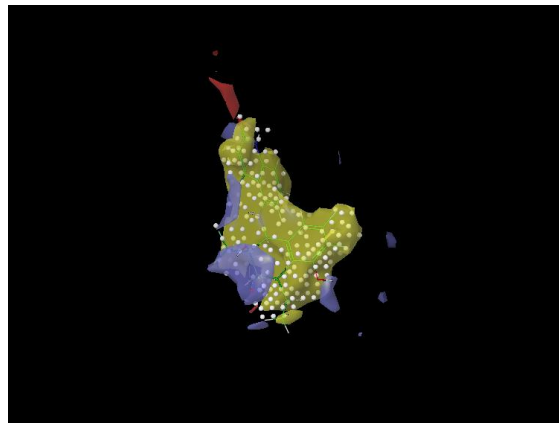
Εικόνα 4: Κρυσταλλικές δομές του GR-LBD με μη στεροειδείς αγωνιστές του υποδοχέα που παρουσιάζουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση *in vitro*. Οι ενώσεις-οδηγοί που σχεδιάστηκαν από την AstraZeneca ανήκουν στην κατηγορία των τετραυδροναφθαλένιων (αριστερά) (pdb: 5G3J) ενώ η ένωση στα δεξιά φέρει ως κεντρικό σκελετό αιθέρα του ινδαζολίου (pdb: 5G5W).

Η επιφάνεια της δέσμης πρόσδεσης για τους κρυστάλλους που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο της μοριακής πρόσδεσης στην παρούσα μελέτη μετρήθηκε ως, $232,554 \text{ \AA}^2$ για τον 5G5W και $244,902 \text{ \AA}^2$ για τον 5G3J. Η διαφορά τους είναι μικρή, είναι όμως αρκετή για να χωρέσει ένας ακόμα δακτύλιος στην LBD.(Εικόνα 5)

5G5W 232,554 Å²



5G3J 244,902 Å²

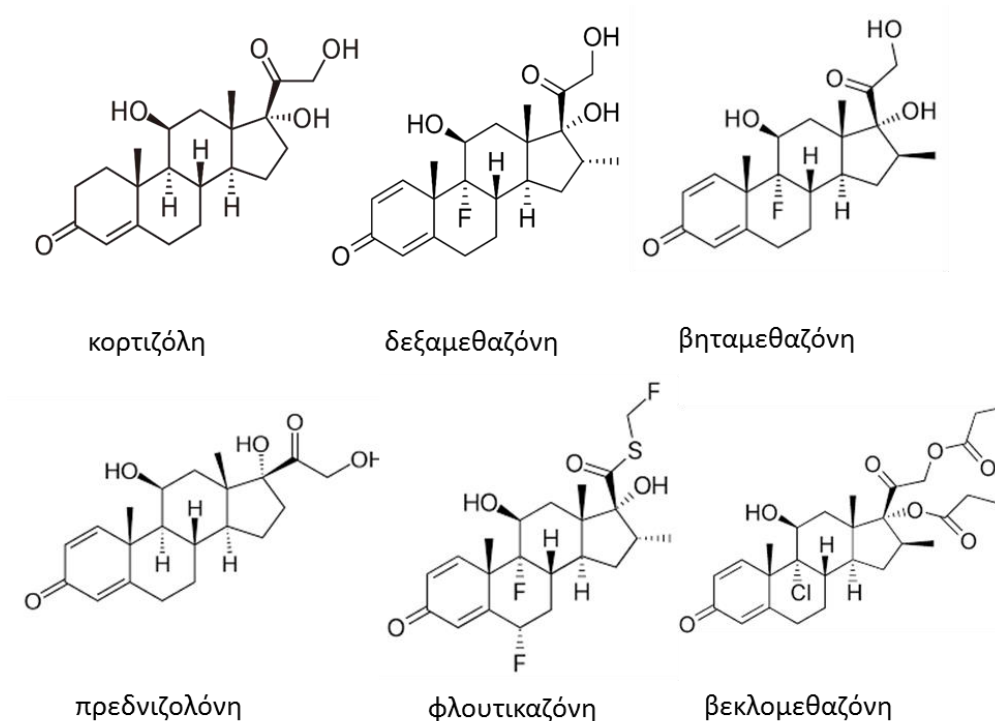


Πίνακας 3: Το LBD μαζί με το μόριο που κρυσταλλώθηκε στις δομές 5G5W και 5G3J. Οι δομές φαίνονται από δύο διαφορετικές οπτικές γωνίες (πάνω και κάτω). Αν και σε όγκο η διαφορά είναι μικρή είναι σαφές πως στον 5G5W το μόριο είναι πιο μακρύ και έχει διαταχθεί σε ευθεία, χωρίς να διπλώνει.

2 ΤΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΗ ΚΑΙ Η ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗ

Τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες που εκκρίνονται από τον φλοιό των επινεφριδίων και εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών όπως αντίδραση στο στρες, στο ανοσοποιητικό σύστημα, την αποδόμηση των πρωτεϊνών, τον μεταβολισμό των υδατανθράκων ενώ αυξάνουν την ηπατική γλυκονεογένεση με αποτέλεσμα την αύξηση της γλυκόζης του αίματος (υπεργλυκαιμία).

Τα φυσικά γλυκοκορτικοειδή (κορτιζόλη ή υδροκορτιζόνη) και τα συνθετικά ανάλογα (δεξαμεθαζόνη, βηταμεθαζόνη, πρεδνιζολόνη, φλουτικαζόνη) έχουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη και ανοσοκατασταλτική δράση,



Εικόνα 6: Στεροειδή γλυκοκορτικοειδή που χορηγούνται ως φάρμακα

Τα GCs αποτελούν τα πιο κοινά συνταγογραφούμενα φάρμακα παγκοσμίως για τη θεραπεία των αλλεργικών νόσων (άσθμα, ατοπική δερματίτιδα), αυτοάνοσων νοσημάτων (ερυθηματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα, αυτοάνοσες αιμολυτικές νόσοι, σκλήρυνση κατά πλάκας), φλεγμονωδών νόσων (αρθρίτιδα), λεμφωμάτων, ενδοκρινολογικών νόσων (υπερθυρεοειδισμός, επινεφριδιακή ανεπάρκεια ή νόσος Addison), άλλων νόσων (χρόνια βρογχίτιδα, σηπτικό shock, σαρκοείδωση) ενώ χρησιμοποιούνται επίσης για την πρόληψη της απόρριψης ενός μεταμοσχευμένου οργάνου [50]. Πολύ συχνά χορηγούνται για την άμεση ανακούφιση από τον μυϊκό πόνο.

Αναζήτηση στη βάση DisGeNet [37, 38] με τον κωδικό του γονιδίου της GR, NR3C1, επιστρέφει μία λίστα 362 ασθενειών που σχετίζονται με αυτή. Για πολλές από αυτές τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν μονόδρομο για την καταπολέμησή τους, καθώς είναι αυτά που άμεσα επηρεάζουν την ενεργοποίηση ή μη της GR.

2.1 SIDE EFFECTS Η ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ

Η ευεργετική δράση των στεροειδών GCs περιορίζεται από τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες όταν καταναλώνονται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η λίστα των παρενεργειών αυτών είναι μακρά, με κυριότερη την ανοσοκατασταλτική δράση που έχει σαν αποτέλεσμα, ευαισθησία στις λοιμώξεις και εξάπλωση μικροβιακών φλεγμονών. Ο αριθμός των λευκών κυττάρων του αίματος μειώνεται

σημαντικά, και αυτό σχετίζεται με την επίδραση του φαρμάκου στις κυτοσίνες και στους φλεγμονώδεις μεσολαβητές. Η παρατεταμένη χρήση στεροειδών GCs συνδέεται με υπεργλυκαιμία και αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης σακχαρώδους διαβήτη. Τυπικές παρενέργειες από τη χρήση γλυκοκορτικοειδών παρουσιάζονται αρκετά ομοιόμορφα ως φαρμακογενές σύνδρομο Cushing που αναφέρεται στην υπερβολική παραγωγή κορτιζόλης. Οι κλινικές εκδηλώσεις του δημιουργία καταρράκτη, παγκρεατίτιδα ενώ μια από τις πιο σοβαρές επιπλοκές είναι η δημιουργία οστεοπόρωσης. Τα οστά αποτελούνται από δύο τύπους κυττάρων, τους οστεοβλάστες που δομούν τα οστά, και τους οστεοκλάστες που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση των οστών. Τα GCs προωθούν την δράση των οστεοβλαστών και αναστέλλουν την δράση των οστεοβλαστών. [50]

Στον ακόλουθο Πίνακα 3 παρατίθενται ενδεικτικά οι ανεπιθύμητες ενέργειες για τη δεξαμεθαζόνη όπως καταγράφονται στη βάση SIDER 4.1 [39] που συγκεντρώνει όλες τις παρενέργειες εγκεκριμένων φαρμάκων:

Πίνακας 2 : Side Effects for Beclomethasone.

Dexamethasone	
Side effect	Data for drug
Intraocular pressure increased	2.01% - 35.5%
Conjunctival haemorrhage	13.4% - 30.3%
Eye disorder	very common
Hypertension	6.4% - 12.7%
Eye pain	5.22% - 8.05%

Visual acuity reduced	3.96% - 8.64%
Conjunctival hyperemia	5.42% - 6.64%
Nervous system disorder	common
Cataract	2.01% - 11.8%
Conjunctivitis	2.44% - 5.86%
Vitreous floaters	1.83% - 4.94%
Dry eye	2.13% - 4.63%
Headache	2.41% - 3.82%
Conjunctival oedema	1.22% - 4.63%
Ocular hypertension	0.602% - 4.63%
Vitreous detachment	1.61% - 4.32%
Retinal aneurysm	1.52% - 3.09%
Vitreous opacities	0.915% - 3.4%
Sensation of foreign body	1.22% - 2.16%
Corneal erosion	0.915% - 2.16%
Keratitis	0.915% - 1.85%
Eyelid ptosis	0.61% - 1.54%
Retinal tear	0.61% - 1.54%
Anterior chamber inflammation	0% - 1.85%
Glaucoma	0.305% - 1.23%
Corneal oedema	postmarketing
Endophthalmitis	postmarketing
Extravasation	postmarketing
Retinal detachment	postmarketing
Complication of device insertion	postmarketing
Device dislocation	postmarketing

Πίνακας 3 : Ανεπιθύμητες ενέργειες για την δεξαμεδαζόνη.

3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Μια από τις κύριες λειτουργίες των γλυκοκορτικοειδών είναι να προσδένονται στον GR και να διεγείρουν ή να αναστείλουν την γονιδιακή μεταγραφή.

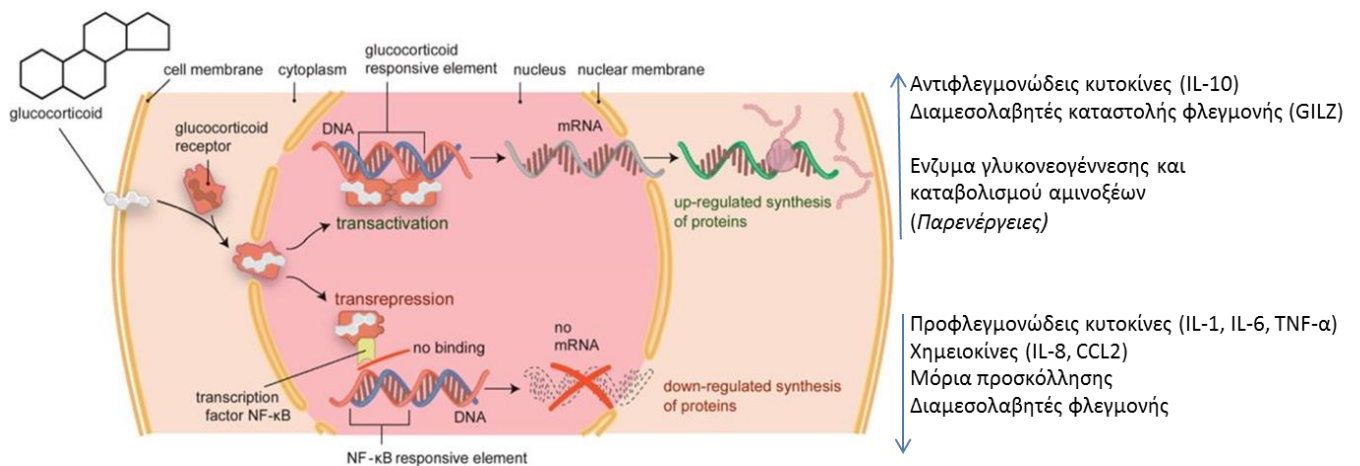
Η δράση των γλυκοκορτικοειδών στοχεύει στη διακοπή της καταστροφικής φλεγμονής που προκαλείται από πολλές διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. αλλεργίες, άσθμα και αυτοάνοσες ασθένειες).

Η φλεγμονή αποτελεί την πρώτη αντίδραση των μηχανισμών ανοσολογικής άμυνας του οργανισμού εξαιτίας κάποιου βλαπτικού παράγοντα (π.χ. μικρόβια, τοξίνες, τραύμα, φυσικοί παράγοντες όπως ακτινοβολία, θερμότητα). Η φλεγμονή προκαλεί τη μετάβαση στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) όπου αλληλεπιδρά με ειδικές ακολουθίες στους εκκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν ουσίες πολύ σημαντικές για τη διέγερση της φλεγμονής, όπως προφλεγμονώδεις κυττοκίνες, συνθετάσες προσταγλανδινών και νιτρικού οξειδίου, μεταλλοπρωτεάσες κ.λπ. Αυτοί οι προφλεγμονώδεις παράγοντες παίρνουν μέρος στην φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού καταστρέφοντας τους προσβεβλημένους ιστούς, ανταγωνίζονται τους παθογόνους μικροοργανισμούς κ.λπ. Η φλεγμονώδης αντίδραση συνοδεύεται από πόνο, ερυθρότητα, οίδημα, υψηλή θερμοκρασία.

Τα γλυκοκορτικοειδή παίζουν τεράστιο ρόλο στον έλεγχο της φλεγμονώδους αντίδρασης, καταστέλλουν τη φλεγμονώδη αντίδραση. Συνδέονται με μεγάλη συγγένεια και ενεργοποιούν τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (glucocorticoid receptor, GR) στο κυτταρόπλασμα και το ενεργοποιημένο σύμπλεγμα περνάει μέσα στον πυρήνα όπου μεταβάλλει την ταχύτητα μεταγραφής ρυθμιζόμενων γονιδίων με δύο κυρίως τρόπους: [Εικόνα 7]

a. προάγει τη μεταγραφή γονιδίων (transactivation) μέσω απευθείας πρόσδεσης σε στοιχεία του DNA γνωστά ως στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (glucocorticoid response elements, GREs)

β. αλληλεπιδρά απευθείας με τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB παρεμποδίζοντας τη σύνδεσή του στο DNA και καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφική δράση του (transrepression).



Εικόνα 7: Τα γλυκοκορτικοειδή (GCs) προσδένονται στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) στο κυτταρόπλασμα και τον ενεργοποιούν. Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο μεταναστεύει στον πυρήνα. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων (transactivation) μέσω απευθείας πρόσδεσης του συμπλόκου σε στοιχεία του DNA (glucocorticoid response elements, GREs) ενισχύει την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό καθώς επίσης και άλλων που σχετίζονται με αντιφλεγμονώδη δράση. Η αλληλεπίδραση του συμπλόκου με τον προφλεγμονώδη μεταγραφικό παράγοντα (NF-κB) αναστέλλει την πρόσδεσή του στο DNA καταστέλλοντας έτσι τη μεταγραφική του δράση (transrepression) και μειώνοντας την έκφραση προφλεγμονών πρωτεϊνών. [Τροποποιημένη εικόνα από [51]]

Αν και οι μηχανισμοί του transactivation και του transrepression δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι, είναι ευρέως αποδεκτό ότι, η αντιφλεγμονώδης δράση των GCs οφείλεται κυρίως στην καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του NF-κB ενώ πολλές από τις παρενέργειες τους (π.χ η επαγωγή ενζύμων της γλυκονεογένεσης που προκαλεί σοβαρή υπεργλυκαιμία) οφείλονται στο μονοπάτι transactivation.

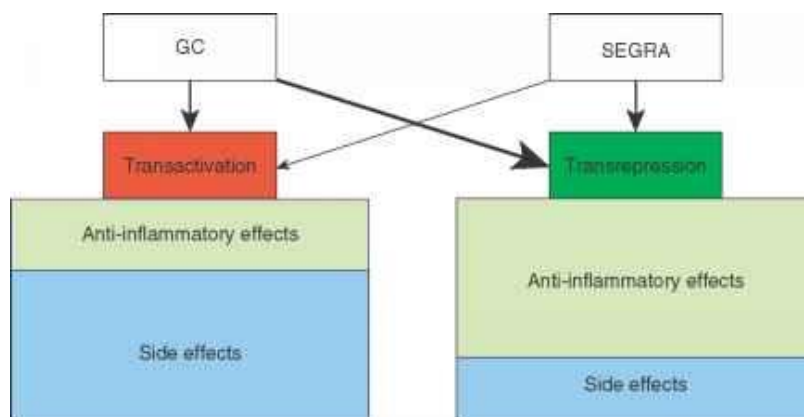
Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί ότι νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι το μονοπάτι transactivation οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση αντιφλεγμονωδών γονιδίων που πιθανά αποτελούν σημαντικό μέρος του μηχανισμού αντιφλεγμονώδους δράσης των GC [52].

Εχει δειχθεί ότι μερικές παρενέργειες είναι κατά κύριο λόγο διαμεσολαβούμενες από το μονοπάτι transactivation (π.χ. υπεργλυκαιμία) ενώ άλλες παρενέργειες (π.χ. οστεοπόρωση) διαμεσολαβούνται τόσο από το μονοπάτι transactivation του GR όσο και από το μονοπάτι transrepression του NF-κB.

4 ΤΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΥ ΑΓΩΝΙΣΤΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ (SEGRA)

Με στόχο το διαχωρισμό της αντιφλεγμονώδους δράσης από τις παρενέργειες των γλυκοκορτικοειδών οι ερευνητικές προσπάθειες στράφηκαν στην ανακάλυψη νέων εκλεκτικών αγωνιστών του GR (SEGRA-Selective Glucocorticoid Receptor Agonists) που κατά προτίμηση θα διαμεσολαβούν το μονοπάτι transrepression έναντι [54] του transactivation. [Εικόνα 8]

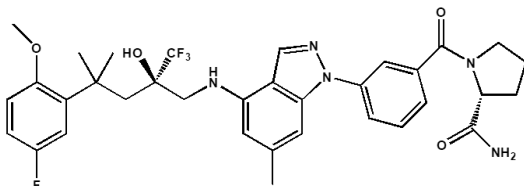
Η τρέχουσα βιβλιογραφία καταγράφει έναν αρκετά σημαντικό αριθμό νέων «εν δυνάμει» SEGRA, με αρκετούς από αυτούς να έχουν ανακαλυφθεί από μεγάλες φαρμακευτικές εταιρίες (GlaxoSmithKline, Abbott, Bayer Schering Pharma, Bristol-Myers Squibb, Merck, Boehringer Ingel heim Pharmaceuticals). [54, 55, 56, 57, 58]



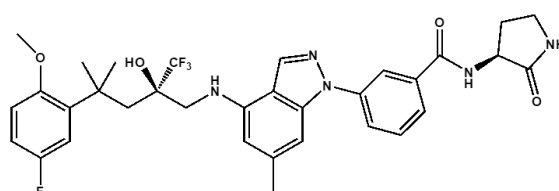
Εικόνα 8: Απλουστευμένο μοντέλο που υπογραμμίζει το επιθυμητό προφίλ των SEGRA. Η ανάπτυξη τους στοχεύει στην ελάττωση των παρενεργειών που κυρίως επάγονται από το μονοπάτι transactivation και στην αύξηση της αντιφλεγμονώδους δράσης που συνδέεται με την καταστολή του NF-kB (μονοπάτι transrepression) ώστε να προκύψουν φάρμακα με υψηλότερο λόγο όφελος/κίνδυνος σε σχέση με τα κλασσικά γλυκοκορτικοειδή [53].

Ενδεικτικά στην Εικόνα 9 παρατίθεται το προφίλ της βιολογικής δράσης ενός συνθετικού μη στεροειδούς SEGRA (Comp. 12 [55]) στα μονοπάτια transactivation και transrepression, συγκρινόμενο με το αντίστοιχο προφίλ ενός αναλόγου του (Comp. 11) το οποίο χαρακτηρίζεται από δράση ανάλογη κλασσικού γλυκοκορτικοειδούς (δεν έχει το προφίλ SEGRA). Παρατηρείται ότι και τα δύο μόρια καταστέλλουν τη δράση του NF-kB . Σε ότι αφορά το μονοπάτι transactivation όμως, το comp. 11 συμπεριφέρεται ως πλήρης αγωνιστής (full agonist) επάγοντας ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων μέσω GRE. Από την άλλη, η βιολογική απόκριση του comp. 12 στο μονοπάτι transactivation είναι σαφέστερα ελαττωμένη (περίπου στο ¼ της αντίστοιχης δράσης του comp. 11) εμφανίζοντας προφίλ μερικού αγωνιστή (partial agonist).

Compound 11 (pdb:3K23)
D-prolinamide analog



Compound 12 (NO available crystal structure with GR)
(3S)-2-pyrrolidinone amide analog



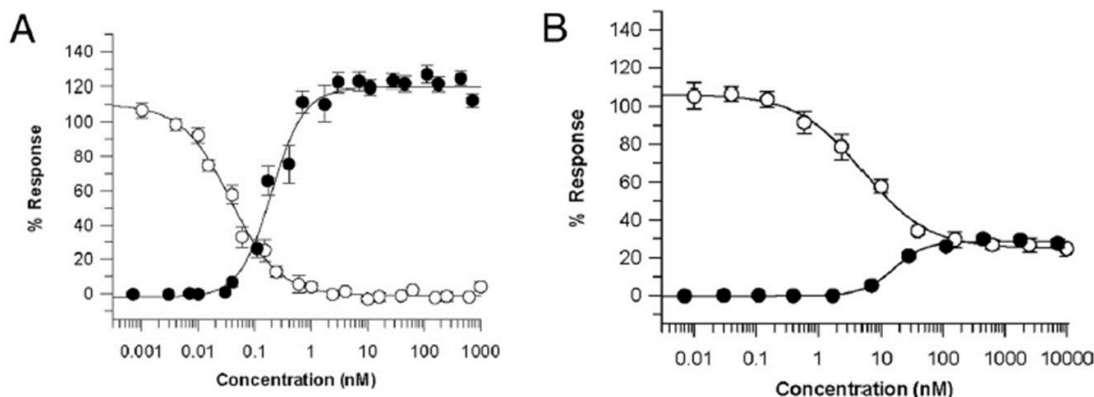
5 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ

5.1 ΟΡΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

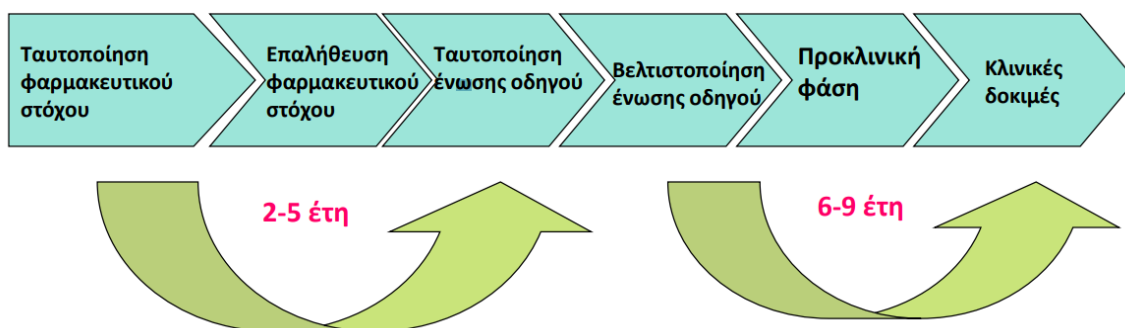
Η πορεία από την εύρεση μέχρι και την εμπορική χρήση ενός φαρμάκου είναι πολύ μεγάλη και περιέχει πολλά στάδια. Το κάθε στάδιο μπορεί να διαρκεί από

Εικόνα 9: Δομές μη στερεοειδών αγωνιστών του υποδοχέα GR και καμπύλες δόσο-απόκρισης της βιολογικής τους δράσης. Η ικανότητα καταστολής του NF-κΒ (transrepression) αναπαριστάται με ανοιχτόχρωμους κύκλους και η ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων μέσω GRE (transactivation) με μαύρους κύκλους. Το comp. 11 συμπεριφέρεται ως κλασσικό γλυκοκορτικοειδές ενώ το comp. 12 συμπεριφέρεται ως SEGRA. [55]

ένα έως αρκετά χρόνια και αυτό έχει αντίκτυπο και στο κόστος της έρευνας. Η ανακάλυψη και ο σχεδιασμός φαρμάκων με χρήση υπολογιστικών μεθόδων



(Computer-Aided Drug Design and Development - CADDD) μπορεί, πολλές φορές, να επιταχύνει τη διαδικασία και να αυξήσει την απόδοση ελαττώνοντας έτσι το κόστος και το ρίσκο της έρευνας.[1]

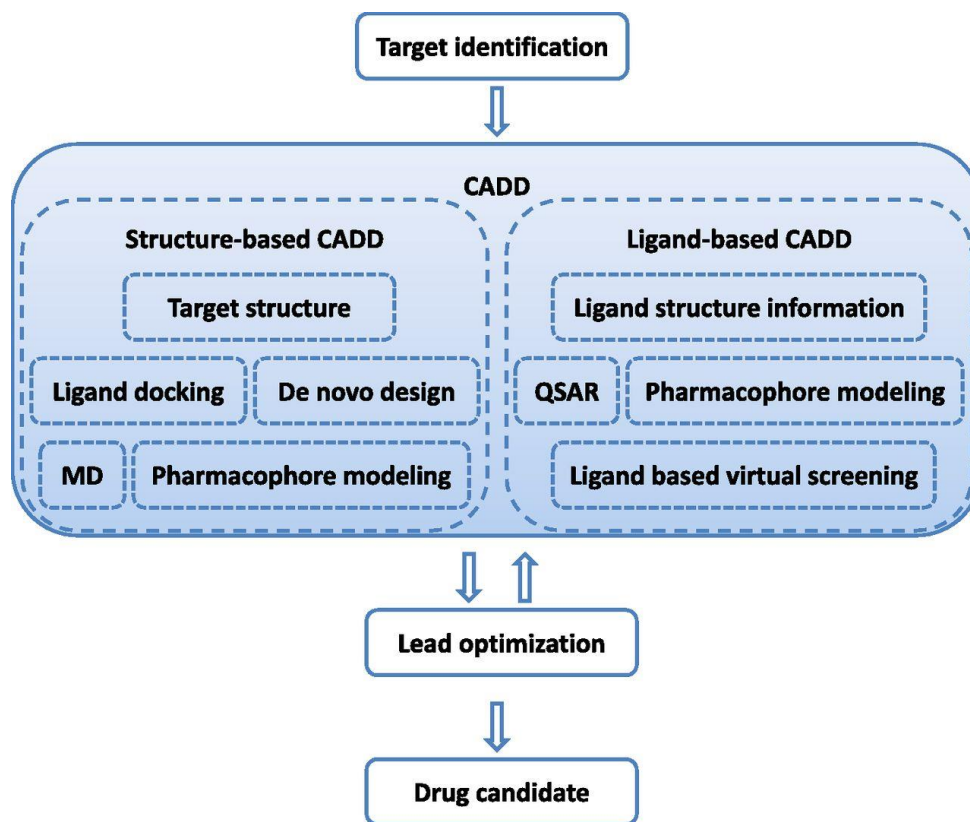


Εικόνα 8 Πορεία ανακάλυψης νέου φαρμάκου

Ο ορθολογικός σχεδιασμός είναι η πλέον σύγχρονη προσέγγιση για την ανακάλυψη φαρμάκου.

Η ταχεία τεχνολογική πρόοδος στα πεδία της χημείας και της βιοπληροφορικής, της δομικής βιολογίας και της υπολογιστικής τεχνολογίας, έχουν συμβάλλει καθοριστικά στην εφαρμογή υπολογιστικών μεθόδων (CADD) όπως μελέτες μοριακής πρόσδεσης και εικονική σάρωση τεράστιων βιβλιοθηκών μορίων ως ισχυρά εργαλεία που χρησιμοποιούνται συστηματικά στην πορεία ανακάλυψης φαρμάκου. Ως αναδυόμενη τεχνολογία, η προσέγγιση CADD επιταχύνει τη διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων χρησιμοποιώντας όλη τη διαθέσιμη πληροφορία από ήδη υπάρχοντα φάρμακα και βιολογικούς στόχους και συνδυάζοντας διεπιστημονική πληροφορία από διαφορετικά ερευνητικά πεδία.

Η προσέγγιση CADD έχει τη δυνατότητα να επισπεύσει σημαντικά τα πρώτα στάδια στην πορεία ανακάλυψης νέων φαρμάκων και να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας μειώνοντας έτσι και το κόστος. Συγκεκριμένα, μπορεί να επιταχύνει και να διευκολύνει την επικύρωση του στόχου, την αναγνώριση πιθανού βιοδραστικού μορίου (hit), τη βελτιστοποίηση προς ένωση-οδηγό (lead) ενώ επίσης μπορούν να προβλεφθούν και να βελτιστοποιηθούν οι φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό, την απέκκριση και την πιθανή τοξικότητα του υποψήφιου φαρμάκου. [Εικόνα 8]



Εικόνα 9 CADD in drug discovery/design pipeline. A therapeutic target is identified against which a drug has to be developed. Depending on the availability of structure information, a structure-based approach or a ligand-based approach is used. A successful CADD

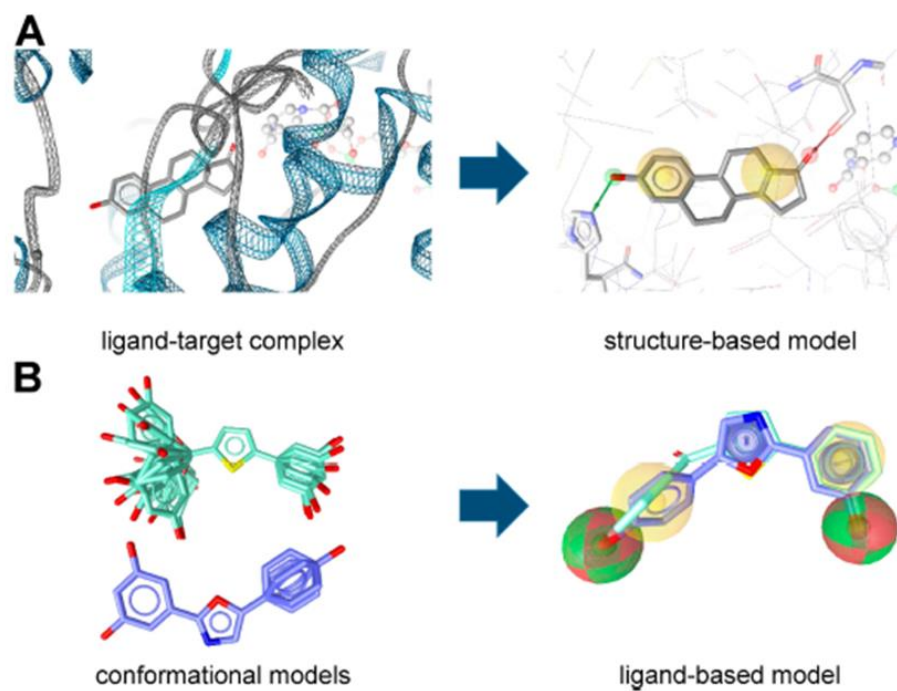
5.2. Η ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ CADD

Ο ορισμός κατά IUPAC ενός φαρμακοφόρου είναι "ένα σύνολο από στερικά και ηλεκτρονιακά χαρακτηριστικά που είναι απαραίτητα για να εξασφαλιστούν οι βέλτιστες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένο βιολογικό στόχο ώστε να ωθείται ή να παρεμποδίζεται η βιολογική δράση του".

Φαρμακοφόρα μοντέλα μπορούν να δημιουργηθούν χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις ανάλογα με τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του μοντέλου. Στην προσέγγιση που βασίζεται στη δομή του

συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη (structure-based pharmacophores) το μοτίβο των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μικρού μορίου-προσδέτη και του βιολογικού στόχου του εξάγεται από πειραματικά καθορισμένο σύμπλοκο στόχου-προσδέτη και καθοδηγεί την κατασκευή του φαρμακοφόρου μοντέλου. Οι τρισδιάστατες αυτές δομές των συμπλόκων λαμβάνονται κυρίως από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB), στην οποία συγκεντρώνονται όλες οι δομές που έχουν επιλυθεί τόσο από κρυσταλλογραφία ακτίνων X (X-Ray) όσο και από φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).

Στην προσέγγιση που βασίζεται στους προσδέτες (ligand-based pharmacophores), γίνεται ευθυγράμμιση (alignment) γνωστών βιοδραστικών μορίων για ένα βιολογικό στόχο και αναγνωρίζονται τα κοινά φαρμακοφόρα τμήματα των ενώσεων αυτών που αποτελούν την ομάδα εκπαίδευσης του μοντέλου (training set). Στην προσέγγιση αυτή, τα κοινά φαρμακοφόρα τμήματα θεωρούνται ως κρίσιμα για την εξαγωγή του φαρμακοφόρου μοντέλου. [Εικόνα 10] Τα φαρμακοφόρα μοντέλα αποτελούν τα εργαλεία αναζήτησης νέων πιθανών βιοδραστικών ενώσεων μέσα από τη διαδικασία Εικονικής Σάρωσης βιβλιοθηκών μορίων. [59, 60]



Εικόνα 10: Δημιουργία φαρμακοφόρα μοντέλων με βάση (Α) τη δομή του συμπλόκου πρωτεΐνης-προσδέτη (structure-based pharmacophores) και (Β) με βάση τους βιοδραστικούς προσδέτες (ligand-based pharmacophores) [Εικόνα από 59]

6. ΜΕΘΟΔΟΙ

Μοντελοποίηση φαρμακοφόρου και Εικονική Σάρωση

Η κατασκευή του φαρμακοφόρου μοντέλου και η εικονική σάρωση έγινε με χρήση του λογισμικού Advanced LigandScout 4.0 που διατίθεται από την IntelLigand, GmbH, Βιέννη, Αυστρία (<http://www.inteligand.com/ligandscout>).

Το φαρμακοφόρο μοντέλο επικυρώθηκε με ανάλυση ROC μέσω εικονικής σάρωσης μιας βιβλιοθήκης ελέγχου με 72 'ενεργά' και 170 'ανενεργά' μόρια που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Δημιουργήθηκε η 3D απεικόνιση για τα μόρια της βιβλιοθήκης και δημιουργήθηκαν 100 διαμορφώσεις ανά μόριο.

Σαρώθηκε εικονικά η βιβλιοθήκη μορίων ZINC [15] με 7.600.000 καταχωρήσεις.

Προετοιμασία πρωτεϊνών

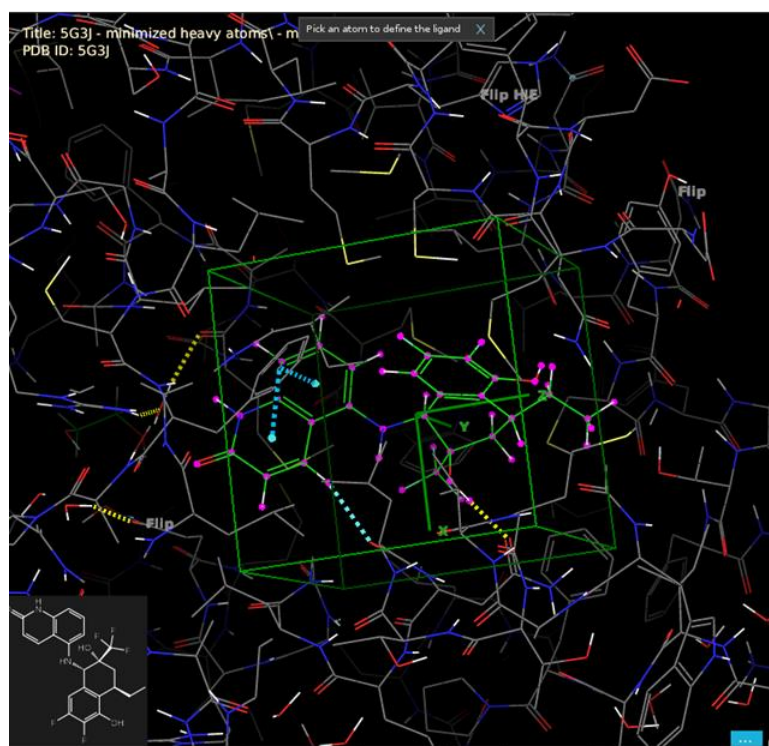
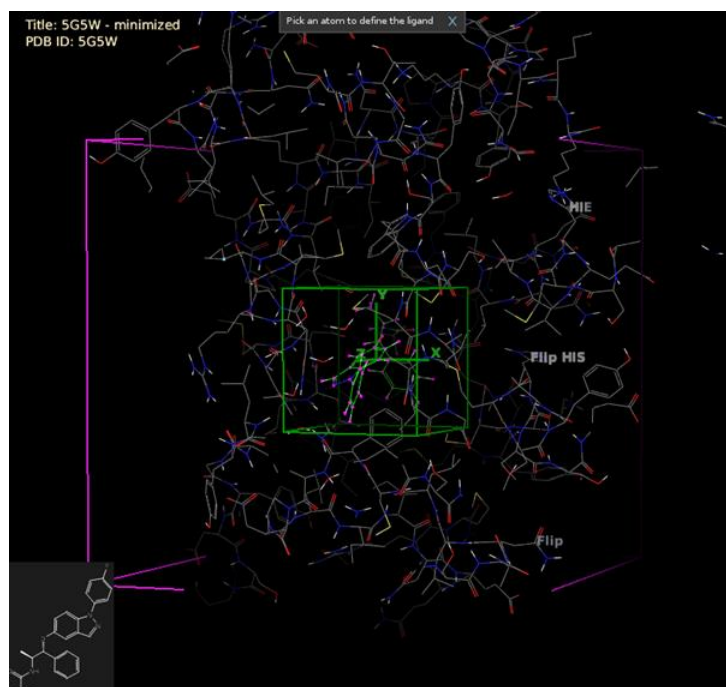
Οι δομές που ανακτήθηκαν από την PDB επεξεργάστηκαν με τη ρουτίνα Protein Preparation Wizard [19, 20] της σουίτας Maestro [21]. Η επεξεργασία περιλαμβάνει τη δυνατότητα διαγραφής των μορίων που δεν επηρεάζουν τη μελέτη (π.χ. μόρια ύδατος εκτός ενεργού κέντρου, συμπαραγόντας για τη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης κατά την κρυστάλλωση), την προσθήκη ατόμων υδρογόνου σε όλα τα αμινοξέα με βάση τη κατάσταση πρωτονίωσής τους στο pH που επιλέγεται και τη βελτιστοποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου.

Προετοιμασία ενώσεων

Τα μόρια της βάσης δεδομένων επεξεργάστηκαν με τον αλγόριθμο LigPrep2.7 [LigPrep; Schrodinger, LLc, NY, 2017] [18]. Ο αλγόριθμος αυτός οδηγεί σε ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις ενώ ελέγχονται όλες οι περιπτώσεις ταυτομέρειας και οι καταστάσεις ιονισμού για το εξεταζόμενο εύρος τιμών του $pH = 7 \pm 0.5$.

Δημιουργία πλέγματος στο κέντρο πρόσδεσης των πρωτεϊνών

Προκειμένου να εφαρμοστούν οι αλγόριθμοι μοριακής πρόσδεσης θα πρέπει πρώτα να καταγραφεί η πληροφορία σε σχετικά με το σχήμα και τις ιδιότητες της θήκης πρόσδεσης. Για τη δημιουργία αυτών των αρχείων χρησιμοποιήθηκε η ρουτίνα Grid generation της σουίτας Schrodinger. Τα πλέγματα που δημιουργήθηκαν για τους δύο κρυστάλλους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρατίθενται στην Εικόνα 11.



Εικόνα 11: Δημιουργία πλέγματος στην περιοχή πρόσδεσης των κρυστάλλων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική (πάνω: pdb 5G5W, κάτω: pdb 5G3J)

Αλγόριθμοι μοριακής πρόσδεσης Το λογισμικό Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) [22, 23, 24, 25] της εσουίτας Schrödinger χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης. Εφαρμόστηκαν αλγόριθμοι πρόσδεσης αυξανόμενης ακρίβειας υπολογισμών ανάλογα με το στάδιο κατά την πορεία της εικονικής σάρωσης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το High-throughput Virtual screening (Glide HTVS), το Standard Precision (Glide SP) και το Induced Fit docking (Glide IFD).

Η βαθμονόμηση της πρόσδεσης εκτιμάται από τη συνάρτηση Gscore που ορίζεται ως εξής:

$$GScore = 0.065*vdW + 0.130*Coul + Lipo + Hbond + Metal + BuryP + RotB + Site$$

Οι πρώτες τιμές είναι ξεκάθαρο ότι βαθμολογούν με διαφορετικά βάρη αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέα και προσδέτη (Van der Waals, Coulomb, λιπόφιλες αλληλεπιδράσεις, δεσμοί H, παρουσία μετάλλου). Οι τρεις τελευταίες τιμές χρήζουν μίας σύντομης επεξήγησης. Δυο αρνητικές βαθμολογίες, ή ποινές (penalty), η BuryP και η RotB, αφορούν ποινές για πολικές ομάδες που εγκλωβίζονται σε λιπόφιλο περιβάλλον και για περιορισμό της ευελιξίας περιστρεφόμενων δεσμών αν/χα. Και η τιμή Site η οποία αυξάνει την βαθμολογία ανάλογα με τις πολικές αλληλεπιδράσεις στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα.

7.	Compound	Ki [nM]	GR [nM]	IC50	αναφορά
----	----------	------------	------------	------	---------

II

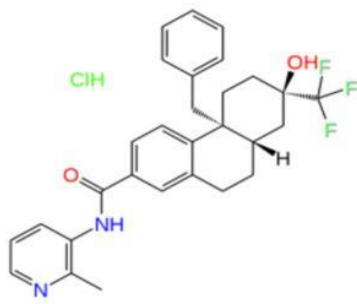
ΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

7.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΟΜΑΔΑΣ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ (TRAINING SET).

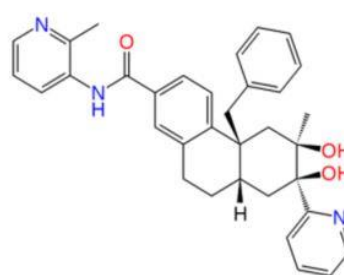
Στη περίπτωση της παρούσας εργασίας, αν και υπάρχουν πολλές, λυμένες, δομές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, αναζητήθηκαν νέα μόρια με πιθανό βιολογικό ενδιαφέρον με εικονική σάρωση δημιουργώντας ένα φαρμακοφόρο μοντέλο με βάση γνωστά βιοδραστικά μορίων με προφίλ SEGRA. Υιοθετήθηκε αυτή η προσέγγιση (ligand-based pharmacophore modeling) σε μια προσπάθεια να εντοπιστούν διαφορετικού μεγέθους βιοδραστικά μόρια δεδομένης της πλαστικότητας του κέντρου πρόσδεσης του GR-LBD.

Ετσι, αναζητήθηκαν μόρια, τα οποία να πληρούν το προφίλ SEGRA όπως εκτέθηκε στο αντίστοιχο κεφάλαιο. . Επιλέχθηκαν 21 μη στεροειδή SEGRA ανάμεσά τους και ενώσεις-οδηγοί μεγάλων φαρμακευτικών εταιριών όπως Pfizer (PF), η Bayer (BI), η AstraZeneca (ZK), η Eli Lilly and Co (LLY) και η GlaxoSmithKline (GSK), όπως παρατίθενται στον Πίνακα 4 και την Εικόνα 12α,β.

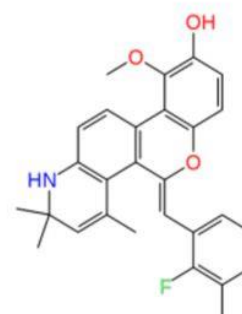
1	AZ/BSP WO2007/046747		2.3	[3]
2	BI-101-5		6	[3]
3	BI-102-6		4	[3]
4	BI-203		10	[3]
5	BI-115		2	[3]



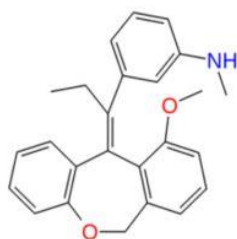
PF-802



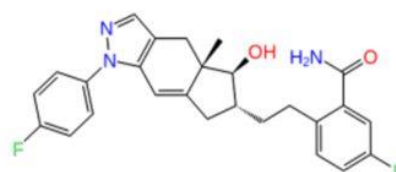
PF-761



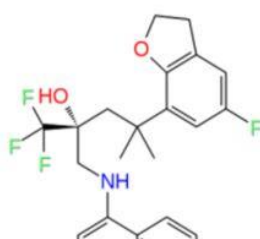
LGD-5552



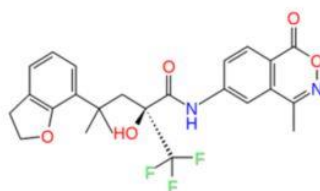
Compound 10



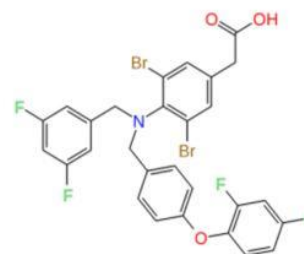
MK-5932



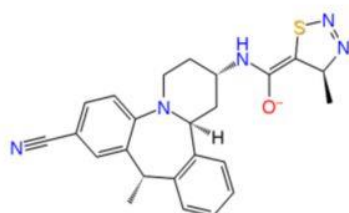
Mapracorat



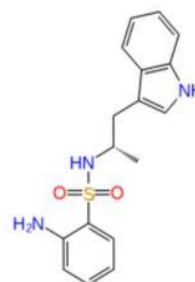
ZK-216348



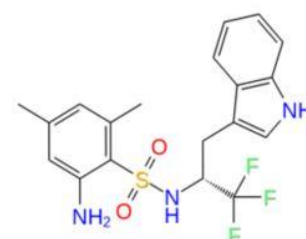
8g



Org-214007-0

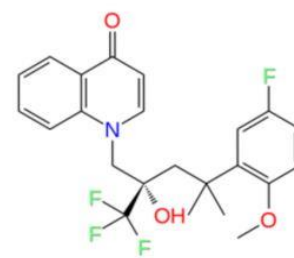
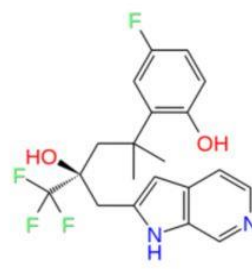
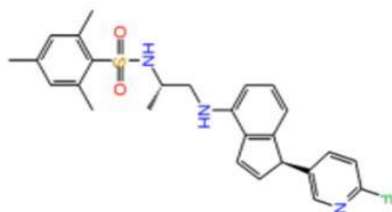
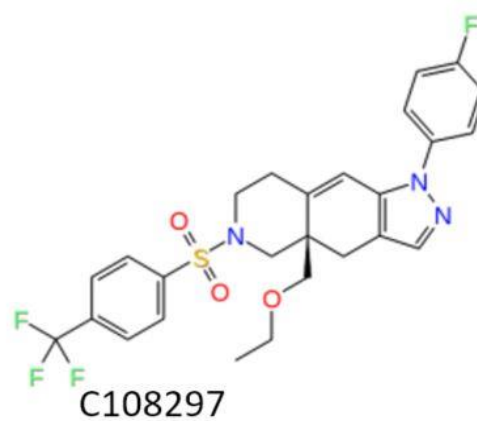
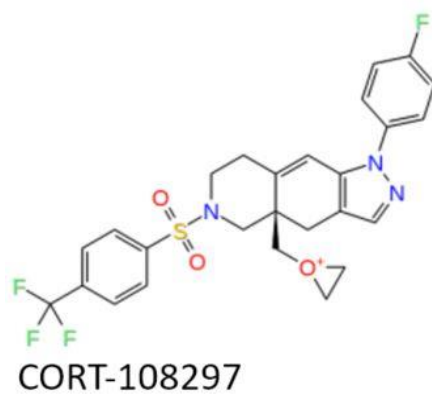
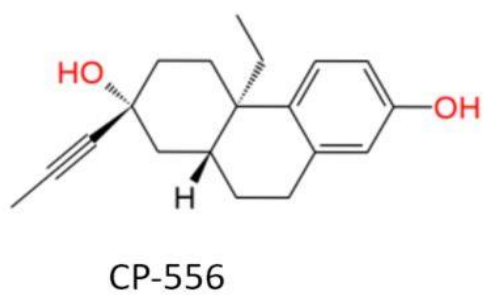
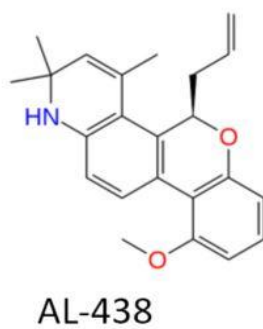
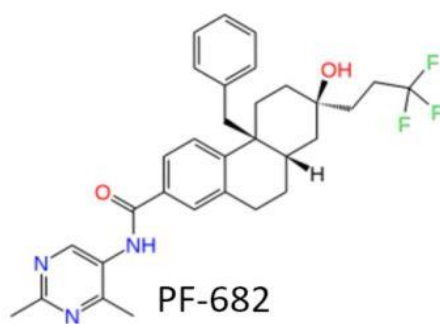
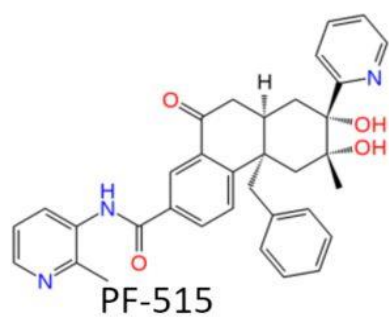


BI-101-5



BI-102-6

Εικόνα 12α: SEGRA που αποτέλεσαν την ομάδα εκπαίδευσης του φαρμακοφόρου μοντέλου



Εικόνα 126: SEGRA που αποτέλεσαν την ομάδα εκπαίδευσης του φαρμακοφόρου μοντέλου

Όταν ολοκληρώθηκε η επιλογή των μορίων από την βιβλιογραφία αναζητήθηκαν οι δομές τους (σε αρχεία SMILE ή SD) στις διάφορες βιβλιοθήκες ενώσεων όπως η ChEMBL [9], η PubChem [40] και η ChEMSpider [41], και άλλα σε κατοχυρωμένες ευρεσιτεχνίες. Όσες ενώσεις δεν ήταν δυνατόν να βρεθούν με τους παραπάνω τρόπους, σχεδιάστηκαν στο πρόγραμμα Maestro [10] της σουίτας Schrodinger.

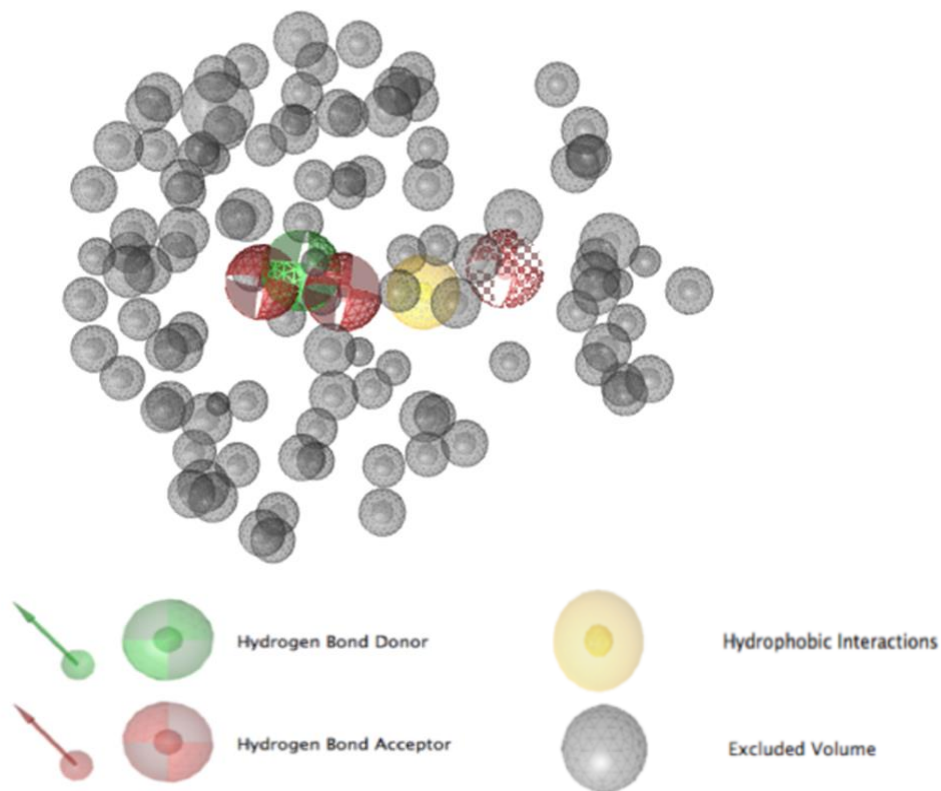
7.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

Σε πρώτο στάδιο ένα πλήθος (<200) διαφορετικών διαμορφώσεων των ενώσεων της ομάδας εκπαίδευσης παρήχθησαν με τον αλγόριθμο Omega [13], τα μόρια χωρίστηκαν σε ομάδες (clusters) με τον αλγόριθμο που υπάρχει ενσωματωμένος στη πλατφόρμα LigandScout [14]. Ένα φαρμακοφόρο μοντέλο δημιουργήθηκε για την κάθε ομάδα. Ακολούθησε η ‘συνένωση’ (merge) των κοινών χαρακτηριστικών των διάφορων φαρμακοφόρων μοντέλων για την δημιουργία του τελικού φαρμακοφόρου. Στη συνέχεια με προσθήκη σφαιρών αποκλεισμού (excluded volumes) παρήχθη το βέλτιστο φαρμακοφόρο μοντέλο (Εικόνα 13).

Το φαρμακοφόρο μοντέλο αποτελείται από πέντε χαρακτηριστικά. Τρεις δέκτες δεσμών υδρογόνου (HBA) ως κόκκινες σφαίρες, μία εκ των οποίων είναι

προαιρετική, ένα δότη δεσμού υδρογόνου (HBD), ως σφαίρα με πράσινο χρώμα, και μία περιοχή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που παρουσιάζεται με μια κίτρινη σφαίρα. Οι γκρι σφαίρες στην ευρύτερη περιοχή που γειτνιάζει προς το φαρμακοφόρο μοντέλο είναι οι περιοχές αποκλεισμού (exclusion volumes).

Στη βελτιστοποίηση του φαρμακοφόρου μοντέλου συνέβαλε καθοριστικά ο τρόπος με τον οποίο τοποθετήθηκαν, σε στρατηγικά σημεία, οι σφαίρες αποκλεισμού όπως θα εκτεθεί στο επόμενο κεφάλαιο.



Εικόνα 13: Τα φαρμακοφόρα χαρακτηριστικά του βελτιστοποιημένου φαρμακοφόρου μοντέλου

7.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΦΟΡΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

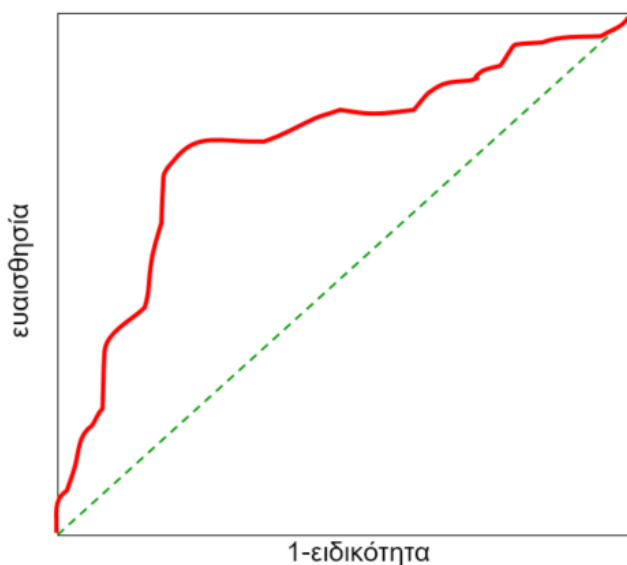
Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στη μοντελοποίηση του φαρμακοφόρου με βάση το οποίο θα σαρωθεί εικονικά η βάση δεδομένων είναι ο σχεδιασμός της βιβλιοθήκης ελέγχου (test set). Η βιβλιοθήκη αυτή σχεδιάζεται ώστε να συμπεριλάβει γνωστά δραστικά μόρια (actives) αλλά και μη δραστικά (inactives) έναντι του βιολογικού στόχου που διερευνάται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Η αξιολόγηση και επικύρωση του φαρμακοφόρου μοντέλου συνίσταται στην ικανότητα του να διακρίνει μεταξύ δραστικών και μη δραστικών μορίων. Συγκεκριμένα, εκτιμάται η επίδοση του φαρμακοφόρου μοντέλου σε ότι αφορά την ανάκτηση από τη βιβλιοθήκη ελέγχου του μέγιστου δυνατού αριθμού δραστικών μορίων και αντίστοιχα του ελάχιστου αριθμού μη δραστικών μορίων.

Η επίδοση του φαρμακοφόρου μοντέλου εκτιμήθηκε με βάση

α. τη βαθμολογία προσαρμογής των ενώσεων ελέγχου στα χαρακτηριστικά του φαρμακοφόρου (pharmacophore-fit score). Ιδανικά η βαθμονόμηση των δραστικών μορίων πρέπει να είναι η μέγιστη σε αντίθεση με τη βαθμονόμηση των μη δραστικών

β. την καμπύλη Λειτουργικών Χαρακτηριστικών Δέκτη ή καμπύλη ROC (Receiver Operating Characteristic curve). Η καμπύλη αποτελεί έναν γραφικό τρόπο για να αξιολογηθεί το φαρμακοφόρο μοντέλο σε σχέση με την ικανότητά του να επιλέγει από τη βιβλιοθήκη ελέγχου ενώσεις με τη βέλτιστη αναλογία μεταξύ των δραστικών και των μη δραστικών. Ο y-άξονας (ευαισθησία) εκφράζει την πιθανότητα σωστής επιλογής και αντιστοιχεί στο δείκτη επιλογής των αληθώς

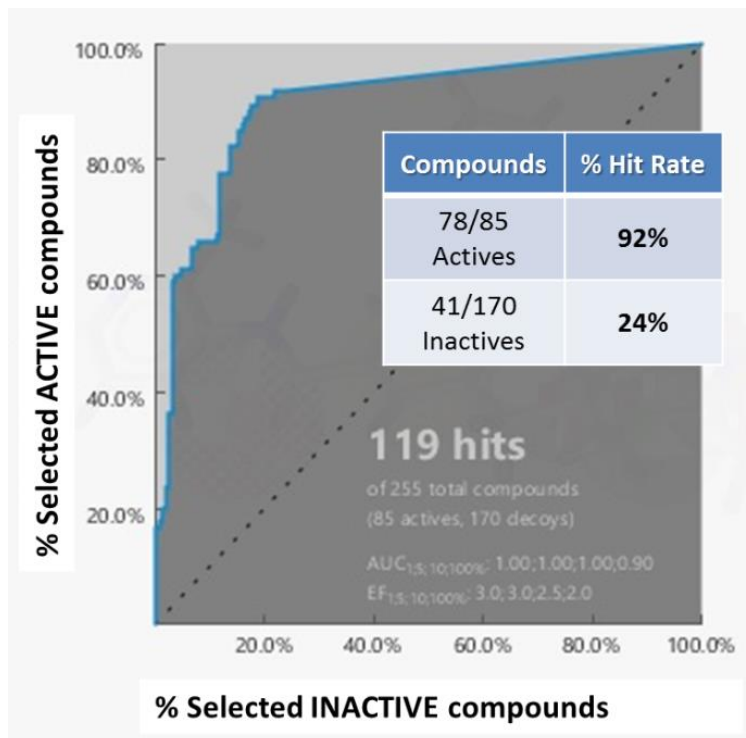
θετικών (αληθώς δραστικών ενώσεων) όπως εκφράζεται από το λόγο ($Tp/(Tp+FN)$), με Tp =True Positive και FN =False Negative. Ο x-άξονας (1-εξειδίκευση) εκφράζει την πιθανότητα λανθασμένης επιλογής και αντιστοιχεί στο δείκτη των ψευδώς θετικών (ψευδώς δραστικών ενώσεων) εκφραζόμενος από τη σχέση $1 - (TN/(TN+FP))$, με TN =True Negative και FP =False Positive. (Εικόνα 14)



Εικόνα 14: Καμπύλη ROC. Ένα φαρμακοφόρο μοντέλο με άριστη επίδοση θα έδινε μια καμπύλη σαν ορθή γωνία (εμβαδό κάτω από την καμπύλη $AUC=100\%$) δηλ. ευαισθησία 100% χωρίς απώλεια στην εξειδίκευση. Αντίθετα, ένα κακό φαρμακοφόρο αντιστοιχεί στη διαγώνιο γραμμή (διακεκομμένη), δίνει εμβαδό $AUC=50\%$, δηλαδή η πιθανότητα ορθής επιλογής ισούται με την πιθανότητα λανθασμένης επιλογής επομένως το μοντέλο επιλέγει στην τύχη μόρια.

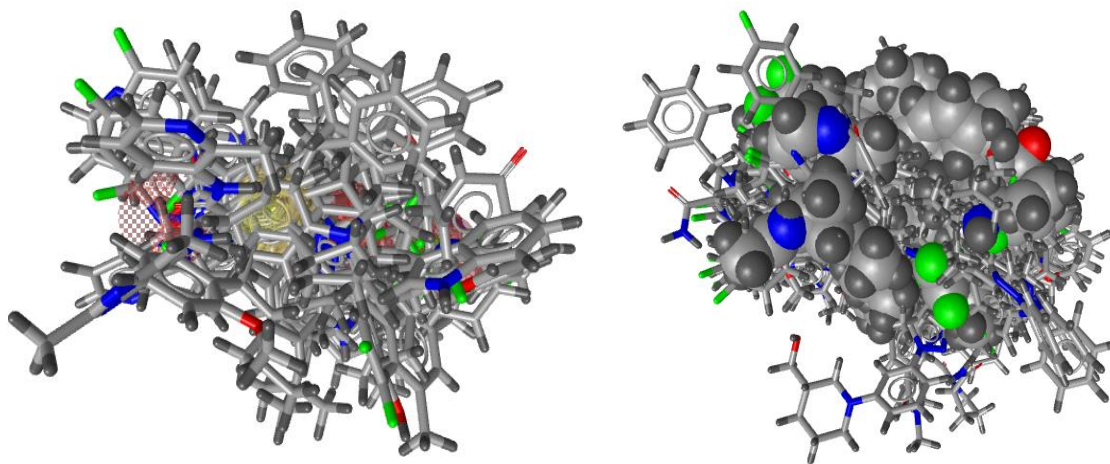
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως βιβλιοθήκη ελέγχου ήδη υπάρχουσα βιβλιοθήκη μορίων της Ομάδας Μοριακής Ανάλυσης του IBΦXB/EIE με δεδομένα της βάσης ChEMBL που περιλάμβανε ένα σύνολο 170 μη δραστικών μορίων (decoys) και 85 δραστικών μορίων (actives). Τα αποτελέσματα για την απόδοση του φαρμακοφόρου ήταν πολύ ικανοποιητικά καθώς καταφέρνει να επιλέξει 78/85 δραστικές ενώσεις και μόνο 41/170 μη δραστικές ενώ η περιοχή κάτω από την καμπύλη ($AUC=90\%$)(Εικόνα 15). Η επιτυχία του μοντέλου υποδεικνύεται και

από την αρχική κάθετη κλίση της καμπύλης με το 20% των μορίων που επιλέγονται με το καλύτερο pharmacophore-fit score να ανήκουν στις δραστικές ενώσεις.

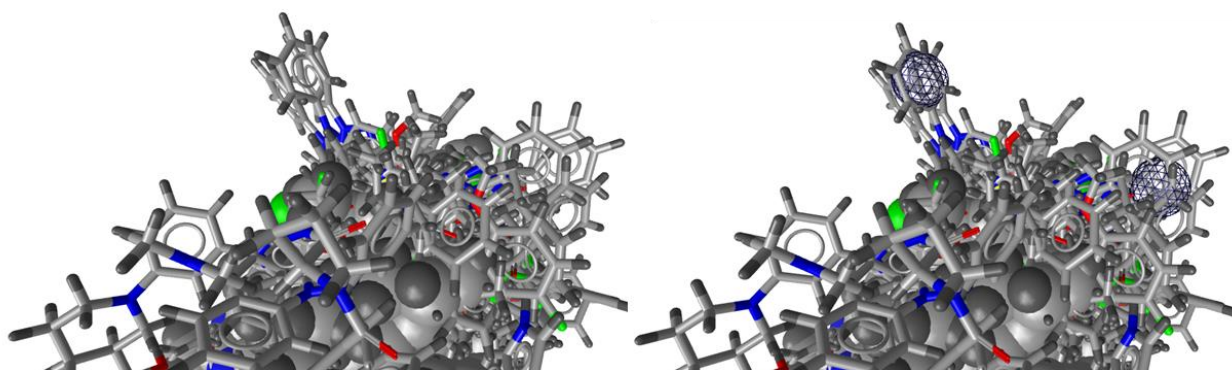


Εικόνα 15: Καμπύλη ROC του εξαχθέντος φαρμακοφόρου μοντέλου

Στη βελτιστοποίηση του φαρμακοφόρου μοντέλου συνέβαλε καθοριστικά ο τρόπος με τον οποίο τοποθετήθηκαν, σε στρατηγικά σημεία, οι σφαίρες αποκλεισμού. (Εικόνες 16, 17)



Εικόνα 16: (αριστερά) Υπέρθεση των 78 δραστικών μορίων επί του αρχικού φαρμακοφόρου μοντέλου (χωρίς τις σφαίρες αποκλεισμού). (δεξιά) Στο φαρμακοφόρο μοντέλο έχουν υπερτεθεί εκτός από τα 78 δραστικά μορία (αναπαράσταση space filling) και τα 170 μη δραστικών (αναπαράσταση ribbon)



Εικόνα 17: Μεγέθυνση από την υπέρθεση όλων των μορίων της βιβλιοθήκης ελέγχου επί του φαρμακοφόρου μοντέλου. Τα δραστικά μορία σε αναπαράσταση space filling και τα μη δραστικά σε αναπαράσταση ribbon (αριστερά) Δεκάδες λανθασμένα hits 'τρυπούν' την επιφάνεια των σωστών hits. (δεξιά) Σε σημεία που συγκεντρώνονται πολλά λανθασμένα (ψευδώς θετικά) εισάγονται σφαίρες αποκλεισμού.

From MW	To MW		ZINC DB	Pharma- cophore	Biochemical filters	HTVS Docking 5G5W
---------	-------	--	---------	--------------------	------------------------	----------------------

7.4. ΕΙΚΟΝΙΚΗ ΣΑΡΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ZINC

Στην παρούσα εργασία σαρώθηκε εικονικά η βιβλιοθήκη μορίων ZINC [15] με 7.600.000 καταχωρήσεις. Ο Πίνακας 5 καταγράφει το πλήθος των ενώσεων που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων στα διάφορα στάδια της Εικονικής Σάρωσης τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

Η βιβλιοθήκη διαιρέθηκε σε υποβιβλιοθήκες με βάση το μοριακό βάρος των ενώσεων και τα μόρια κάθε επιμέρους υποβιβλιοθήκης ελεγχθήκαν ως προς την προσαρμογή τους στο φαρμακοφόρο μοντέλο με χρήση του αλγόριθμου iscreen της σουίτας LigandScout [14] και τις προεπιλεγμένες ρυθμίσεις αυτού. Η σάρωση ανέδειξε ένα πλήθος 3.338.109 μορίων με ικανοποιητική προσαρμογή (Pharmacophore-fit score>12). Η λίστα των ανακτηθέντων μορίων φιλτραρίστηκε στη συνέχεια με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες. Επιλέχθηκαν 1.629.629 ενώσεις με τιμές για τις φυσικοχημικές ιδιότητες (Μοριακό βάρος, λιποφιλικότητα, αριθμός δοτών δεσμών H, αριθμός δεκτών δεσμών H, πολική επιφάνεια και αριθμός δεσμών με δυνατότητα περιστροφής) στο εύρος των τιμών των 21 μορίων της ομάδας εκπαίδευσης του φαρμακοφόρου (Πίνακας 6). Η επιλογή έγινε με το πρόγραμμα Canvas [16, 17] της σουίτας Maestro.

300	310		482501	187889	30315	10000
310	320		556148	221567	49618	10000
320	330		618850	254095	71593	10000
330	340		701866	292199	89933	10000
340	350		803428	343208	123171	10000
350	360		762735	329941	145421	10000
360	370		738969	321880	151956	10000
370	380		514958	222140	110840	10000
380	390		349415	156645	95571	10000
390	400		330634	153705	100649	10000
400	410		242133	112499	79720	10000
410	420		228104	107105	78780	10000
420	430		219723	102796	77798	10000
430	440		205180	98333	75609	10000
440	450		189727	90378	71358	10000
450	460		151276	73305	59136	10000
460	470		132445	64884	52915	10000
470	480		122061	59810	49031	8858
480	490		105798	52226	42345	5897
490	500		91001	44869	35961	3728
500	600		98614	48635	37909	1793
300	600		7,645,566	3,338,109	1,629,629	190,276

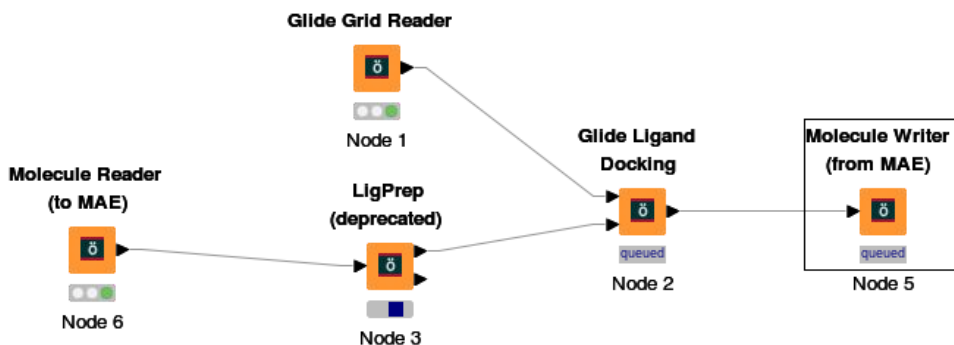
Πίνακας 5: Πλήθος ενώσεων που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων ZINC κατά την πορεία της Εικονικής Σάρωσης

property	min	max
MW	320	550
AlogP	2	7
HBD	0	4
HBA	2	6
PSA	50	150
RotB	2	7

Πίνακας 6: Εύρος τιμών για τις φυσικοχημικές ιδιότητες των επιλεχθέντων μορίων από την Εικονική Σάρωση

7.4.1. High-Throughput virtual screening

Οι επιλεγμένες ενώσεις ελέχθησαν στην συνέχεια ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους στο ενεργό κέντρο του GR-LBD. Χρησιμοποιήθηκε το σύμπλοκο pdb: 5G5W και εφαρμόστηκε ένας γρήγορος αλγόριθμος (High Throughput Virtual Screening) HTVS [26]. Ο έλεγχος πρόσδεσης έγινε μέσω της πλατφόρμας KNIME όπου οι επιμέρους κόμβοι (nodes) υλοποιούν συναρτήσεις του MAESTRO, Schrodinger Suite, για την εικονική σάρωση υψηλής ακριβείας. (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Διάγραμμα ροής του KNIME για τον έλεγχο της πρόσδεσης των μορίων της βάσης δεδομένων στον κρύσταλλο 5G5W Εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος πρόσδεσης HTVS (High Throughput Virtual Screening)

Αναλυτικά το διάγραμμα ροής του Knime περιελάμβανε τα ακόλουθα:

1. Εισαγωγή των επιλεχθέντων από τα προηγούμενα στάδια μορίων σε μορφή SDF, τα οποία ο κόμβος ‘Molecule Reader’ διαβάζει και αυτόματα τα μετατρέπει σε μορφή MAE (αναγνωρίσιμη από το Maestro)
2. Στον κόμβο ‘Glide Grid Reader’ εισάγεται το αρχείο που περιλαμβάνει τα χαρακτηριστικά του πλέγματος (grid) με πληροφορίες σχετικές με το σχήμα και τις ιδιότητες της θήκης πρόσδεσης.
3. Τα μόρια από τον πρώτο κόμβο υφίστανται προεπεξεργασία μέσω του κόμβου ‘LigPrep’. Ο αλγόριθμος αυτός οδηγεί σε ελαχιστοποιημένες ενεργειακά διαμορφώσεις ενώ ελέγχονται όλες οι περιπτώσεις ταυτομέρειας και οι καταστάσεις ιονισμού για το εξεταζόμενο εύρος τιμών του pH= 7+/-0.5.Εξάλλου, το κρυσταλλικό σύμπλοκο ελήφθη σε pH=7. .
4. Ο κόμβος ‘Glide Ligand Docking’ στη συνέχεια έλεγχει τη μοριακή πρόσδεση στο ενεργό κέντρο της GR-LBD.
5. Τέλος ο κόμβος 5 καταγράφει τον τρόπο πρόσδεσης των μορίων , μια πόζα για το κάθε μόριο, σε μορφή MAE.

Τα μόρια ταξινομήθηκαν ως προς τη συγγένεια πρόσδεσής τους και θέτοντας ένα κατώφλι στο σκορ πρόσδεσης ίσο με 10, ο αριθμός των ενώσεων περιορίστηκε σε 190.276.

7.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ (MOLECULAR DOCKING) ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΛΓΟΡΙΘΜΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ

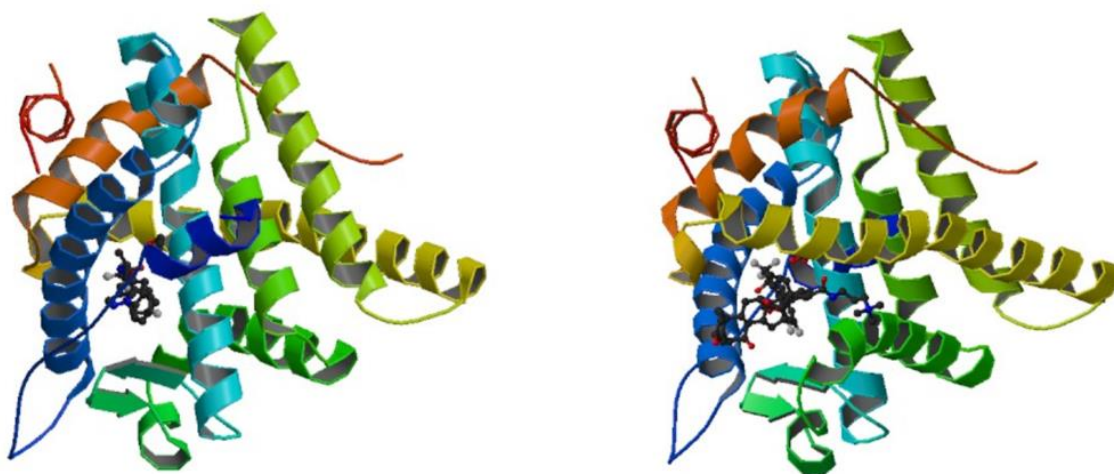
Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν ως οι υψηλότερου ενδιαφέροντος από την προηγούμενη high-throughput διαδικασία ελέγχθηκαν στη συνέχεια ως προς την πρόσδεσή τους στο ενεργό κέντρο της GR-LBD και τις αλληλεπιδράσεις τους με τα κρίσιμα αμινοξέα της θήκης με εφαρμογή αλγορίθμων υψηλότερης ακρίβειας. Οι κρύσταλλοι που επιλέχθηκαν για το docking ήταν οι δύο πιο πρόσφατοι – κατά την υλοποίηση της παρούσας διπλωματικής, δημοσιευμένοι το 2017 (pdb: 5G3J [6] και 5G5W [7]). (Εικόνα 19).

Αν και η προηγούμενη διαδικασία του HTVS είχε υλοποιηθεί με τη χρήση του κρυσταλλικού συμπλέγματος pdb: 5G5W, θεωρήθηκε σκόπιμο στη συνέχεια της μελέτης να εξετασθούν οι επιλεγμένες ενώσεις και ως προς την πρόσδεσή τους στη θήκη πρόσδεσης του κρυστάλλου pdb: 5G3J. Η στρατηγική αυτή εφαρμόστηκε προκειμένου για τη διεύρυνση του πλήθους των ενώσεων πιθανού ενδιαφέροντος. Η ένωση-οδηγός που έχει συγκρυσταλλωθεί στο σύμπλοκο pdb: 5G3J παρουσιάζει

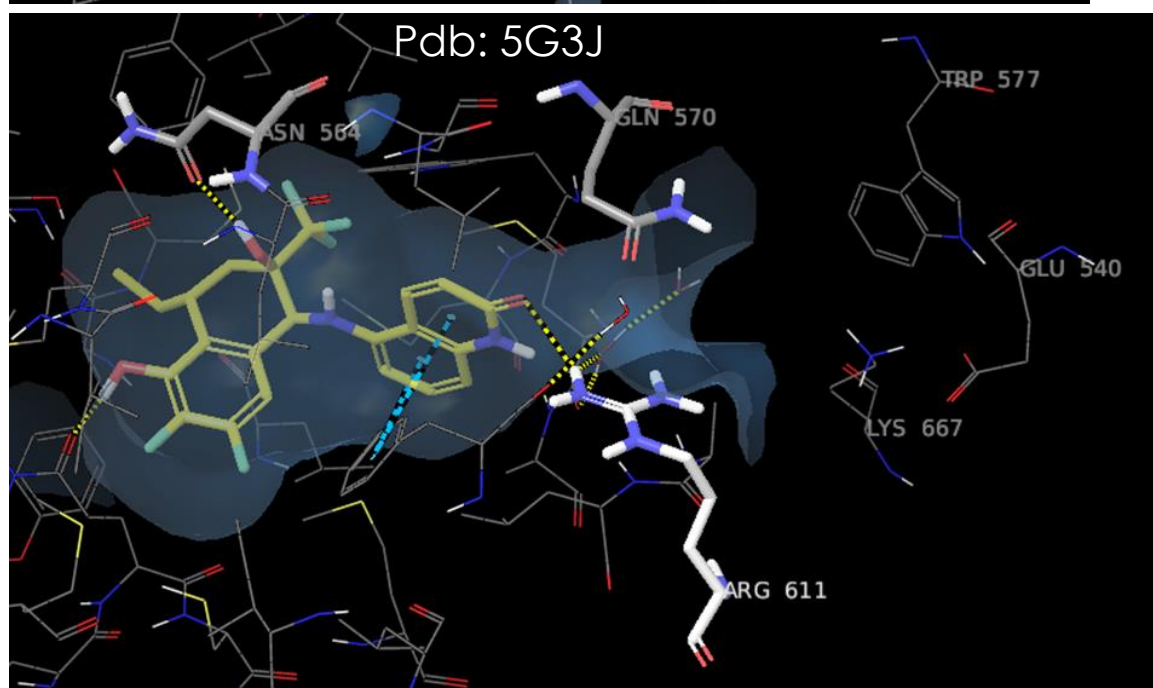
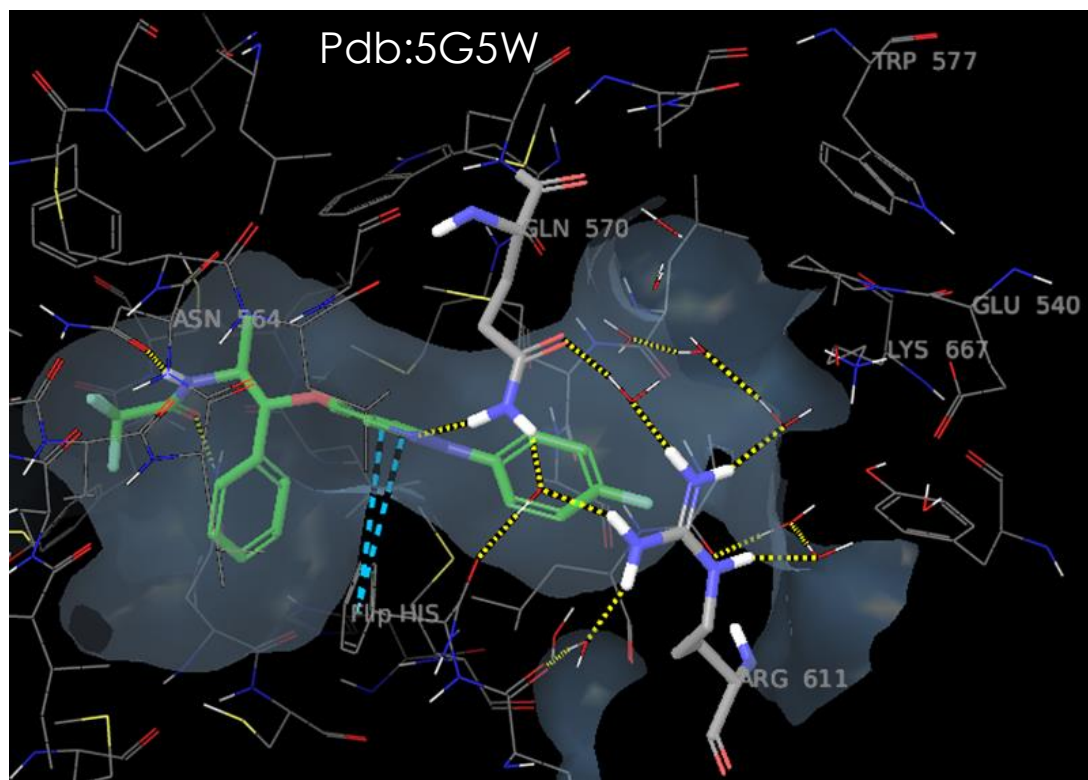
εξαιρετικό ενδιαφέρον σε ότι αφορά το προφίλ SEGRA (μερικός ανταγωνιστής στο TA μονοπάτι, μερικός αγωνιστής στο μονοπάτι TR) [61].

Επιπλέον, η παρόμοια επιφάνεια της θήκης πρόσδεσης για τους δύο κρυστάλλους η οποία μετρήθηκε ως, 244,902 Å² για τον 5G5W και 232,554 Å² για τον 5G3J δεν αναμένονταν να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα για την επιλογή.

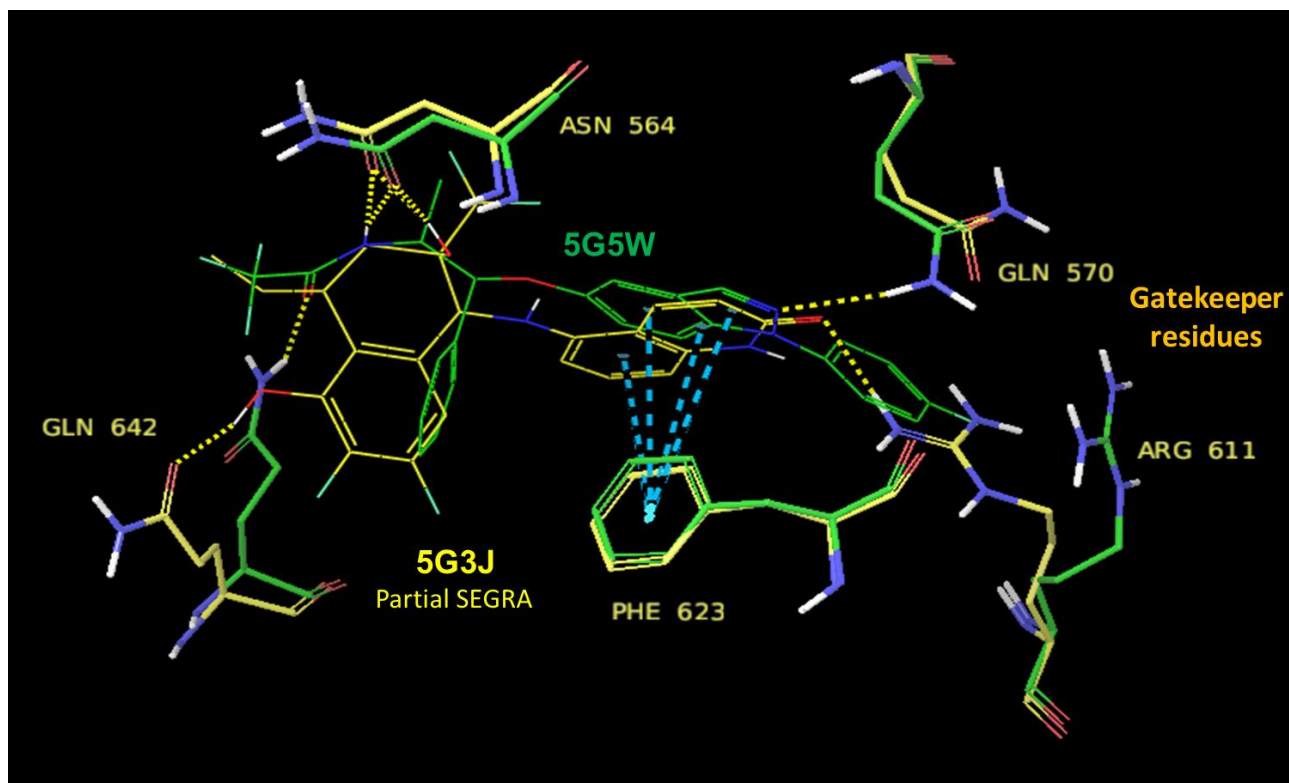
Στην Εικόνα 20 απεικονίζονται οι δύο δραστικές ενώσεις στη θήκη πρόσδεσης του GR-LBD με τις κύριες αλληλεπιδράσεις τους ενώ στην Εικόνα 21 έχει γίνει υπέρδεση των προσδετών για συγκριτικούς λόγους. Αξίζει να σημειωθεί η μετατόπιση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων Gln570 και Arg611 (gatekeeper residues) στον κρύσταλλο 5G5W τα οποία όπως έχει ήδη εκτεθεί οδηγούν στη διάνοιξη του ενεργού κέντρου.



Εικόνα 19: Κρυσταλλικά σύμπλοκα της GR-LBD με μη στεροειδείς αγωνιστές του υποδοχέα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες μοριακής πρόσδεσης. Αριστερά εικονίζεται η δομή pdb: 5G3J και δεξιά η δομή pdb: 5G5W.



Εικόνα 20: Πρόσδεση των ενώσεων-οδηγών που σχεδιάστηκαν από την AstraZeneca στο ενεργό κέντρο του GR-LBD με τις κύριες αλληλεπιδράσεις τους. (επάνω) ανάλογο με κεντρικό σκελετό αιθέρα του ινδαζολίου (pdb: 5G5W). (κάτω) ανανάλογο τετραυδروναφθαλενίου (pdb: 5G3J)



Εικόνα 21: Υπέρθεση των προσδεδεμένων αγωνιστών στη θήκη πρόσδεσης του GR-LBD σύμφωνα με τα κρυσταλλικά δεδομένα. Με πράσινο χρώμα εικονίζεται το ανάλογο με κεντρικό σκελετό αιθέρα του ινδαζολίου (pdb: 5G5W) ενώ έχουν σημειωθεί οι αλληλεπιδράσεις του με τα αμινοξέα της θήκης τα οποία επίσης φαίνονται με πράσινο χρώμα. Αντίστοιχα με κίτρινο χρώμα εικονίζεται το ανάλογο τετραυδρωναφθαλενίου (pdb: 5G3J) και οι αλληλεπιδράσεις του με τα αμινοξέα της θήκης τα οποία επίσης φαίνονται με κίτρινο χρώμα. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί H, με μπλε χρώμα οι αλληλεπιδράσεις *πi-πi* μεταξύ αρωματικών δακτυλίων.

7.5.1. SP και IFD docking

Αρχικό φιλτράρισμα σε σχέση με την αλληλεπίδραση με την Asn564.

Οι επιλεγμένες από το HTVS ενώσεις φιλτραρίστηκαν αρχικά ώστε να αποκλειστούν όλα τα μόρια που δεν αλληλεπιδρούν με την ασπαραγίνη 564 του υποδοχέα, Asn564. Όπως έχει ήδη εκτεθεί αλλά όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 7, η αλληλεπίδραση αυτή είναι κρίσιμη για την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Το φίλτρο αυτό περιορίσε τον αριθμό των ενώσεων από 190.276 σε 43.459. (Πίνακας 8)

Πίνακας 7: Αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα του ενεργού κέντρου της GR-LBD όπως καταγράφονται σε κρυσταλλικά συμπλέγματα με γλυκοκορτικοειδή και μη στεροειδείς αγωνιστές του υποδοχέα

PDB	Cavity	Ligand	Hydrogen Bonds								Lipophilic (π-π)	
			Leu563	Asn564	Gln570	Met604	Gln642	Glu540	Arg611	Thr739	Tyr735	Phe623
4LSJ	Small	Dibenzoxapine Sulfonamide (non steroid) Ki=0.268 nM	-	Y	-	-	-	-	-	Y	-	Y
3E7C	Large	GSK866 <chem>C23H21Cl2F4N5O3</chem> (non steroid) IC ₅₀ =3.2 nM	Y	Y	Y	Y	Y	-	-	-	Y	Y

3K23	Large	D-prolinamide $C_{34}H_{37}F_4N_5O_4$ (non steroid) $IC_{50}=6.3$ nM	Y	Y	Y	-	-	Y	-	-	-	Y
3K22	Large	D-alaninamide $C_{22}H_{21}F_6N_5O_3$ (non steroid) $IC_{50}=12.6$ nM	Y	Y	Y	-	-	-	-	-	-	Y
3BQD	Large	DAC $C_{30}H_{36}N_2O_4$ (Steroid)	-	Y	Y	-	Y	-	-	-	-	Y
1M2Z & 1P93	Small	DEX $C_{22}H_{29}F O_5$ (Steroid) $IC_{50}=0.5-22$ nM	-	Y	Y (only in 1M2Z)	-	Y	-	Y	Y	-	-
3CLD	Small	Fluticasone Furoate $C_{27}H_{29}F_3O_6S$ (Steroid) $IC_{50}=0.04$ nM	-	Y	Y	-	-	-	-	-	-	Y
5G5W	Small		-	Y	Y	-	Y	-	-	-	-	Y
5G3J	Small		-	\Y	Y	-	Y	-	-	-	-	Y

Standard Precision (SP) docking

Οι επιλεγμένες ενώσεις δοκιμάστηκαν αρχικά ως προς την πρόσδεσή τους στη θήκη πρόσδεσης με εφαρμογή του αλγορίθμου Glide SP. Με βάση τη βαθμονόμηση της πρόσδεσης για τους συγκρυσταλλωμένους προσδέτες (Gscore= -13,6 και αντίστοιχα για τους κρυστάλλους 5G5W και 5G3J) επιλέχθηκαν για τη συνέχεια της μελέτης οι ενώσεις με Gscore < -11.

Το κριτήριο αυτό περιόρισε σημαντικά το πλήθος των ενώσεων σε 1636 (pdb: 5G5W) και 1005 (pdb:5G3J). (Πίνακας 8)

Induced Fit docking

Οι ενώσεις που προκρίθηκαν από την προηγούμενη διαδικασία δοκιμάστηκαν ως προς την πρόσδεσή τους με εφαρμογή του πρωτοκόλλου IFD το οποίο επιτρέπει διαμορφωτικές αλλαγές στις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων του ενεργού κέντρου επαγόμενες από την πρόσδεση της δοκιμαζόμενης ένωσης. Μέσα από μια εξαντλητική διαδικασία προβλέπονται με τη μέγιστη δυνατή ακρίβεια οι πιθανότεροι τρόποι πρόσδεσης και οι προκαλούμενες διαμορφωτικές αλλαγές εντός του ενεργού κέντρου.

Για κάθε μόριο από τα 1636 (pdb: 5G5W) και 1005 (pdb:5G3J) του προηγούμενου βήματος δημιουργήθηκαν 15 διαφορετικές πόζες. Η τελική επιλογή των ενώσεων πιθανού ενδιαφέροντος έγινε με βάση τη βαθμονόμηση της πρόσδεσης (Π) αλλά και τις σημαντικές αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα της θήκης πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, τέθηκε φίλτρο στους πιθανότερους τρόπους πρόσδεσης (poses) ώστε να ικανοποιούνται οι αλληλεπιδράσεις που αναγράφονται στην Εικόνα 22.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας προκρίθηκε ένας αριθμός 455 ενώσεων (Πίνακας 8)

Pose Filter

Use structures from: Project Table (7818 selected entries)

Select a pose viewer file, or a receptor and pose entries from the Project Table, then identify one or more pose criteria.

☒ Create poses from input ligand-receptor complexes
☐ Auto-detect ligand

Filter Criteria

Poses must match: All

ID	Pose Criteria	Receptor ASL
1	hbond	(res.num 564) OR (res.num 563)
2	hbond	(res.num 570) OR (res.num 611) OR (res.num 604)
3	hbond	(res.num 739) OR (res.num 736) OR (res.num 642) OR (res.num 540)

Criteria Parameters

Maximum hbond distance: 2.5
Minimum hbond donor angle: 90.0
Minimum hbond acceptor angle: 60.0

Strict Reset Options...

Filter Project Table

☒ Select only entries that match
Filter Entries

ob name: pose_filter_struct_grouping_2 Run

Host=cp01, Incorporate=Append new entries

Εικόνα 22: Φίλτρο με κρίσιμες αλληλεπιδράσεις για την τελικά επιλογή των ενώσεων με βάση τους πιθανότερους τρόπους πρόσδεσης (poses) από την εφαρμογή του πρωτοκόλλου μοριακής πρόσδεσης IFD,

From [MW]	To [MW]	HTVS Docking 5G5W	Asn564		SP Docking 5G5W	Docking_ score > 11	IFD + pose filters	SP Docking 5G3J	Docking_ score > 11	IFD + pose filters
300	310	10000	3155		3155	3		3153	11	
310	320	10000	3604		3604	3		3604	21	
320	330	10000	3691		3691	29		3691	48	
330	340	10000	3482		3482	34		3481	73	
340	350	10000	3387		3387	50		3385	103	
350	360	10000	3420		3420	112		3415	125	
360	370	10000	3193		3193	139		3180	133	
370	380	10000	2622		2622	100		2601	86	
380	390	10000	2474		2474	139		2443	77	
390	400	10000	2325		2325	182		2275	67	
400	410	10000	1817		1817	131		1741	47	
410	420	10000	1736		1736	154		1663	47	
420	430	10000	1555		1555	138		1445	43	
430	440	10000	1435		1435	130		1270	37	
440	450	10000	1292		1292	91		1112	23	
450	460	10000	1147		1147	66		947	19	
460	470	10000	1077		1077	58		880	21	
470	480	8858	891		891	38		689	10	
480	490	5897	594		594	17		457	9	
490	500	3728	362		362	17		267	3	
500	600	1793	200		200	5		143	2	
300	600	190,276	43,459		43,459	1,636	282	41,842	1,005	173

Πίνακας 8: Πλήθος ενώσεων που προκρίθηκαν στην πορεία της μοριακής πρόσδεσης

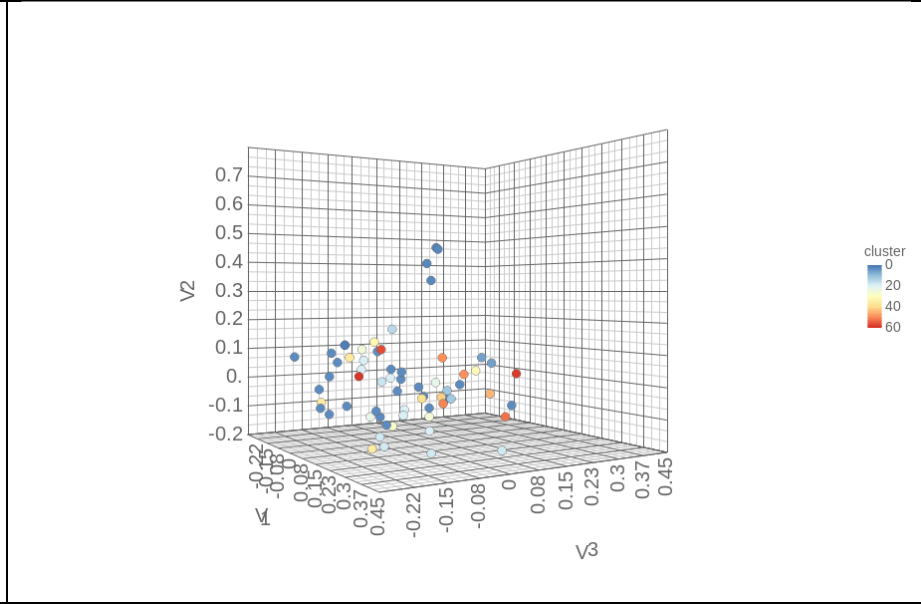
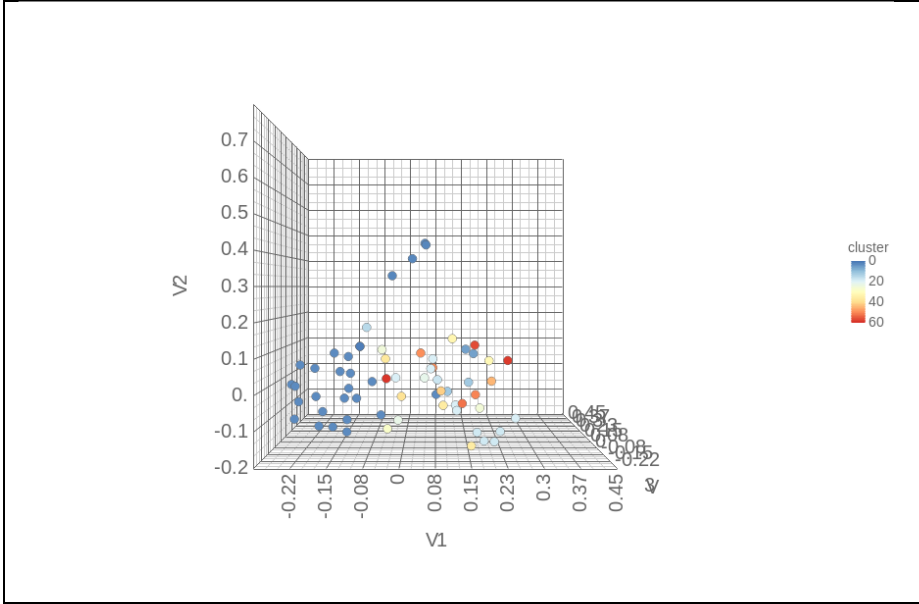
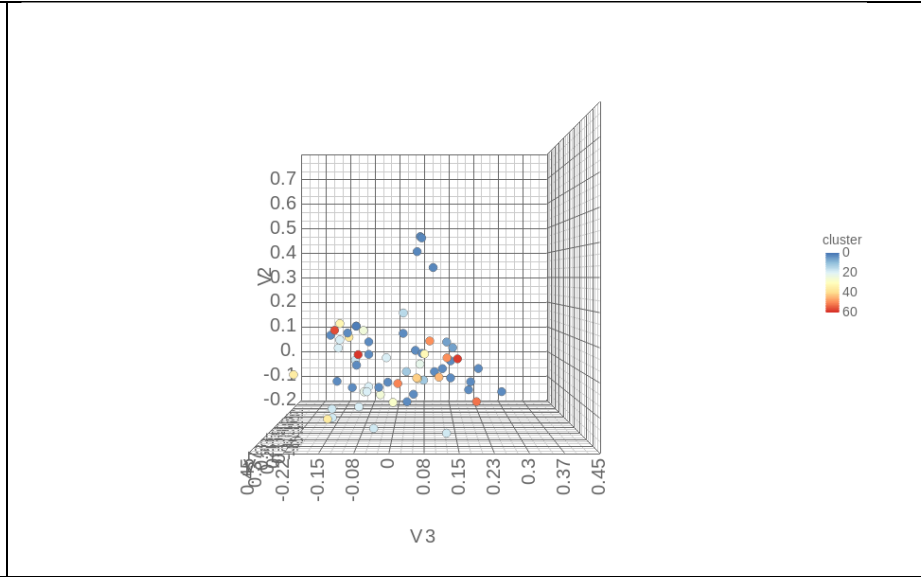
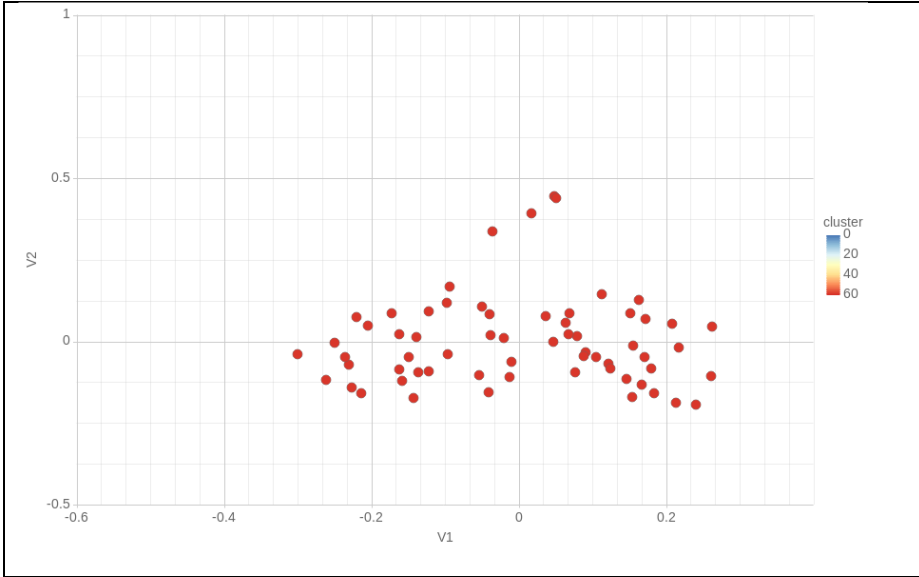
7.6. ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ

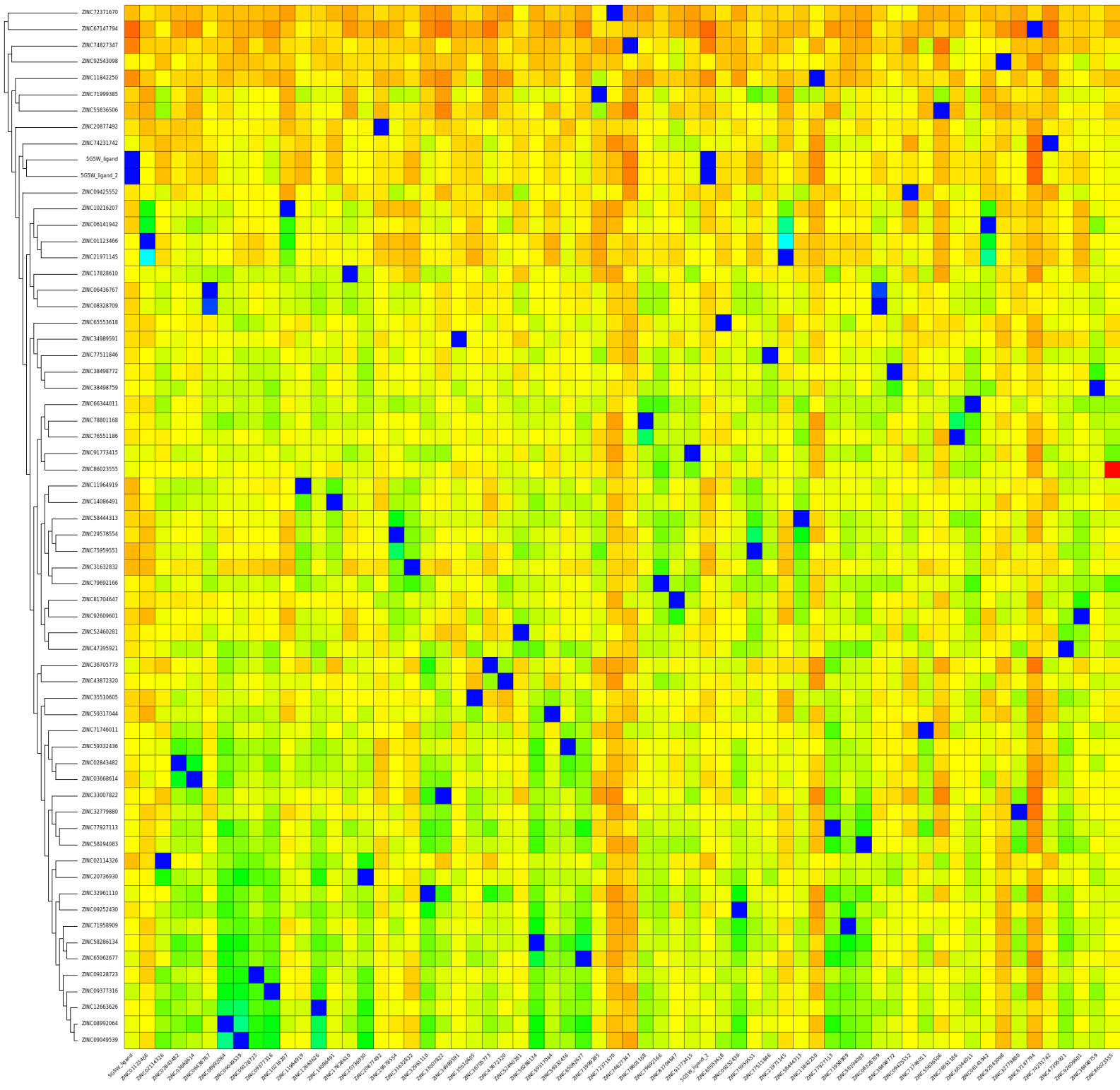
Στο κρύσταλλο 5G5W η περιοχή πρόσδεσης LBD είναι μεγαλύτερη από αυτήν στο κρύσταλλο 5G3J και έτσι μπορεί να φιλοξενήσει και μεγαλύτερα μόρια. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα μετά το SP και το IFD να προκύψουν 50% περισσότερα μόρια σε σχέση με τον κρύσταλλο 5G3J.

Αναζητήθηκε ένα εργαλείο το οποίο θα μπορούσε να ομαδοποιήσει αυτά τα μόρια ανάλογα με τη δομική ομοιότητά τους ώστε να επιλεγθούν στη συνέχεια αντιπροσωπευτικά μόρια από την κάθε ομάδα. Το ChemMine [42] είναι ένα διαδικτυακό εργαλείο που κάνει ακριβώς αυτό.

Αρχικά ο χρήστης καλείται να σχεδιάσει ή ανεβάσει ένα αρχείο με τα, προς εξέταση, μόρια. Τέσσερις αλγόριθμοι είναι στη διάθεση του χρήστη για να επιλέξει με ποιον από αυτούς θέλει να ομαδοποιήσει το σετ των ενώσεων.

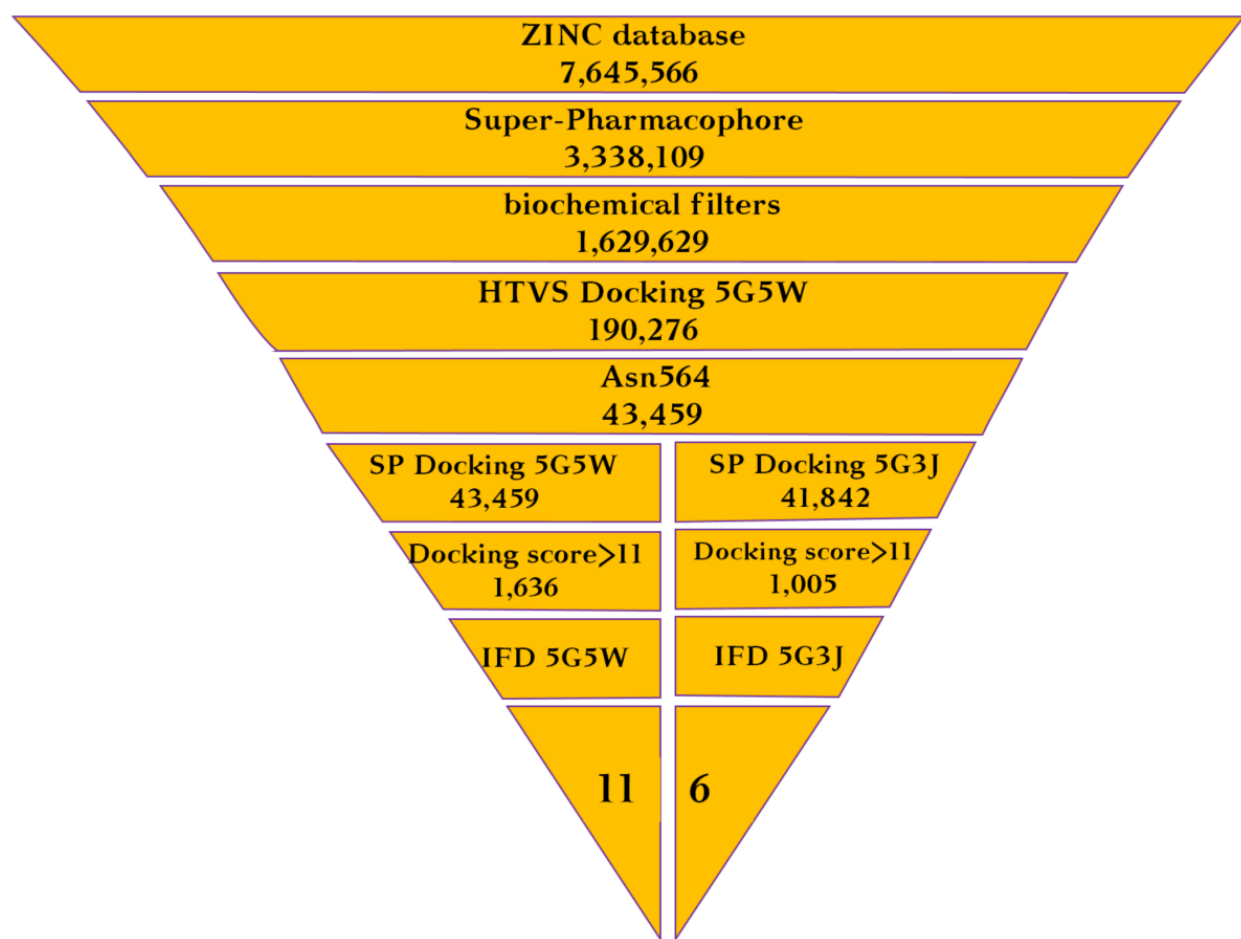
64 μόρια εισήχθησαν στο ChemMine και με βάση την ομαδοποίηση τους αλλά και την ενδεδειγμένη μελέτη του τρόπου πρόσδεσής τους προκρίθηκαν 31 ενώσεις με πιθανό ενδιαφέρον ως SEGRA. Η ομαδοποίηση των ενώσεων φαίνεται στην επόμενη εικόνα.





8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η πορεία αναζήτησης νέων αγωνιστών του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με προφίλ SEGRA συνοψίζεται στο ακόλουθο διάγραμμα ροής. Το σύνολο των 51 ενώσεων που προκρίθηκαν από τη διαδικασία εξετάσθηκαν ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Καθοριστικοί παράγοντες για την τελική ταξινόμηση αποτέλεσαν η συγγένεια πρόσδεσης, η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη λιποφιλικότητα λαμβάνοντας υπόψη ότι η θήκη είναι εξαιρετικά λιπόφιλη καθώς και ο περιορισμένος αριθμός προβλεπόμενων μεταβολιτών. Τέλος ελήφθη υπόψη η ποικιλομορφία στους χημειότυπους. Οι 17 ενώσεις που τελικά προκρίνονται για αγορά και βιολογική αποτίμηση. παρουσιάζονται στη συνέχεια. Παρατίθενται επίσης πίνακες με τα σκορ πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του GR-LBD, οι προβλεπόμενες φυσικοχημικές τους ιδιότητες καθώς 2D/3D διαγράμματα όπου εικονίζονται οι προβλεπόμενοι τρόποι πρόσδεσης των ενώσεων.

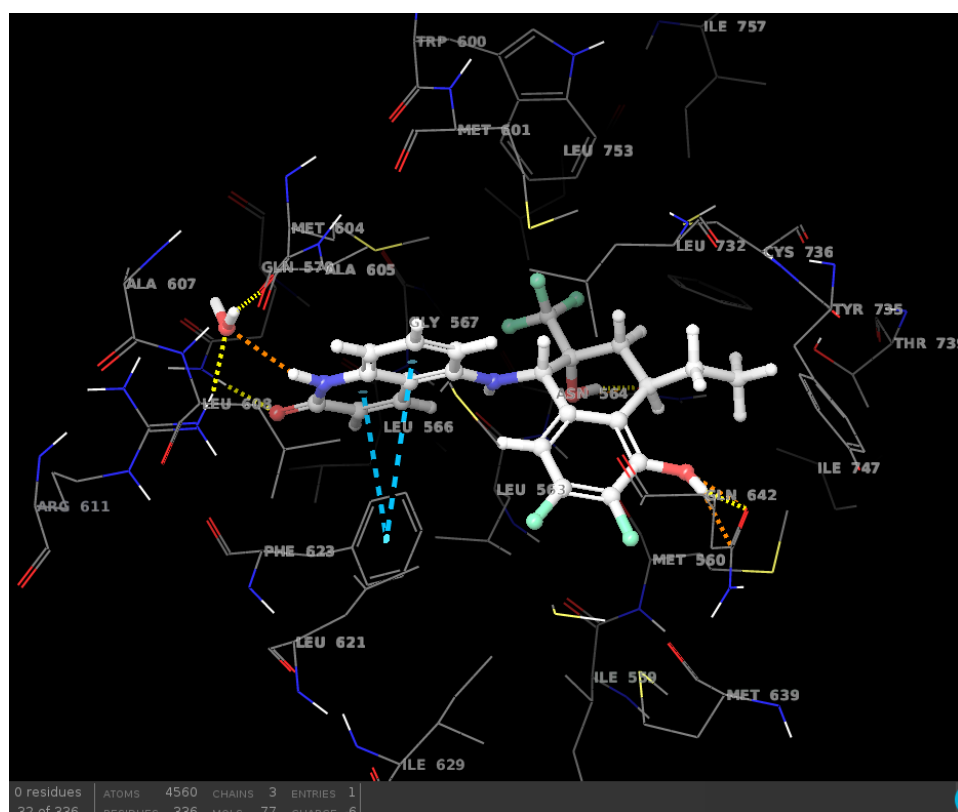


8.1 ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟ 5G3J

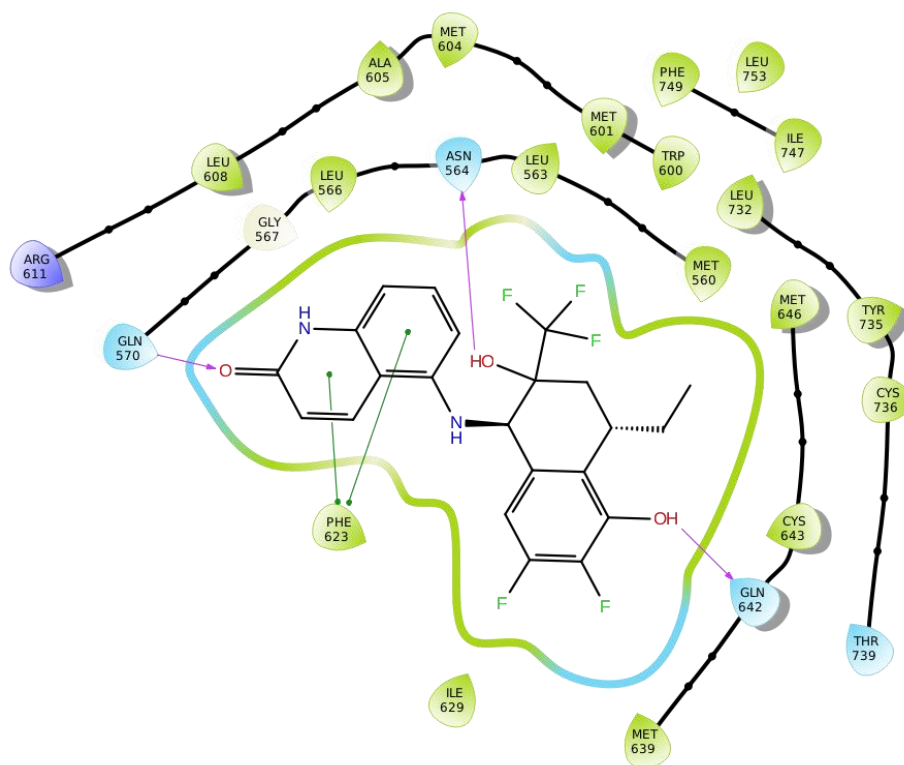
#	Title	Glide gscore	IFDScore	glide ligand efficiency	Pharmacophore- Fit Score	tautomer probability	Ionization Penalty
0	5G3J ligand	-15.156	-616.543	-0.473		1	0.0257
1	ZINC33682914	-14.436	-619.645	-0.412	49.63	1	0.0021
2	ZINC16734222	-13.764	-617.438	-0.405	41.5	1	0.0025
3	ZINC09211540	-13.414	-617.277	-0.447	50.49	1	0.0009
4	ZINC84541473	-13.356	-614.722	-0.512	40.65	1	0.0485
5	ZINC12822595	-13.196	-616.083	-0.44	50.1	1	0
6	ZINC24632820	-13.191	-616.519	-0.44	41.48	1	0.0038

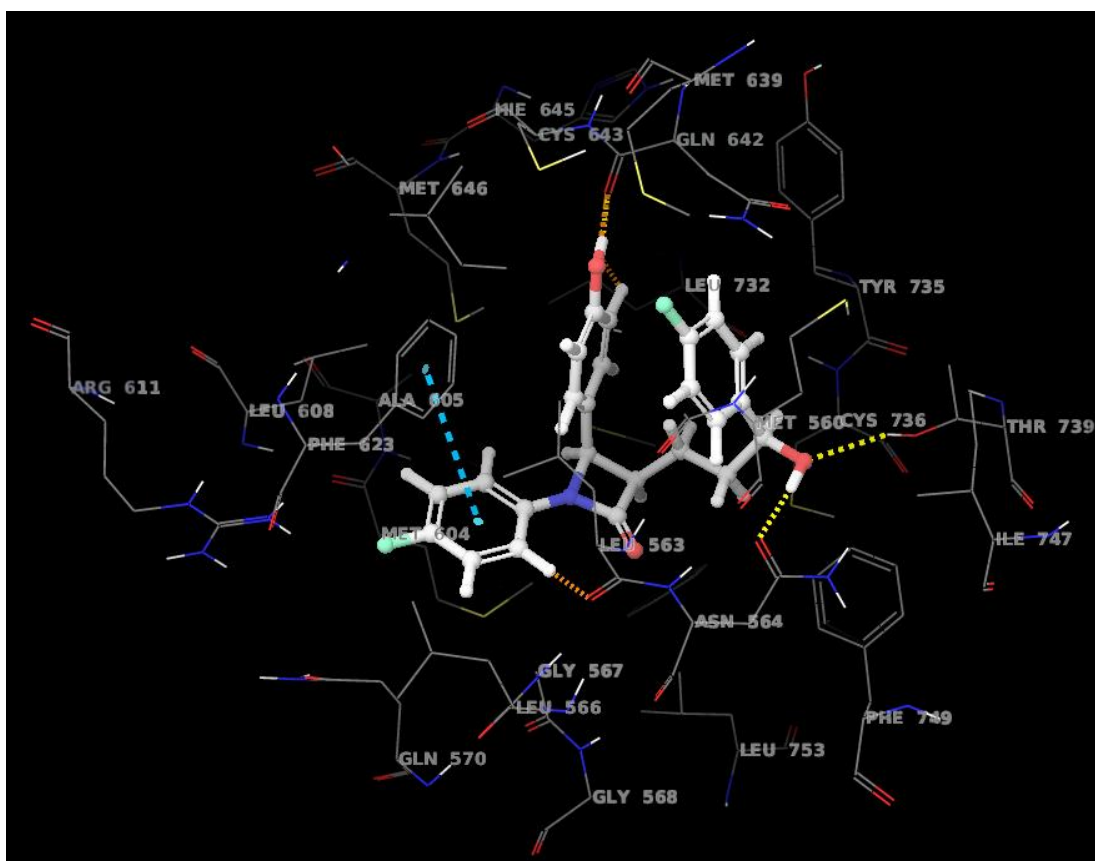
5G3J Title	QPlogPoct o/w (-2.0 / 6.5)	QPlogS (-6.5 / 0.5)	QPlogHERG IC50 value for blockage of HERG K+: log IC50 (concern< -5)	QPPCaco Caco-2 permeability (nm/sec) (<25 poor, >500 great)	QPlogBB (-3.0/1.2)	Percent Human Oral Absorption. % gastrointestinal absorption (+20%) (<25% poor)
ZINC33682914	19.705	-6.881	-6.691	141.599	-1.511	94.646
ZINC16734222	17.536	-8.883	-5.902	543.857	-0.389	91.53
ZINC09211540	19.473	-5.184	-5.255	730.081	-0.666	100
ZINC84541473	19.006	-5.598	-5.571	1535.294	-0.383	100
ZINC12822595	17.791	-7.09	-5.901	3464.308	0.361	100
ZINC24632820	16.731	-7.593	-5.899	370.818	-0.686	94.101

5G3J Title	QPPMDCK MDCK permeability (nm/sec) (<25 poor, >500 great)	QPlogKhsa QP log KHSA (-1.5/1.5)	#metab Primary metabolites (1/8)	Lipinski Rule Of Five	Percent Human Oral Absorption	CNS (--/++)
ZINC33682914	187.658	0.909	5	0	94.646	-2
ZINC16734222	3937.706	1.759	6	2	91.53	0
ZINC09211540	931.898	0.641	3	0	100	0
ZINC84541473	1220.622	0.454	2	0	100	0
ZINC12822595	10000	0.972	3	1	100	1
ZINC24632820	1301.758	1.314	4	1	94.101	0

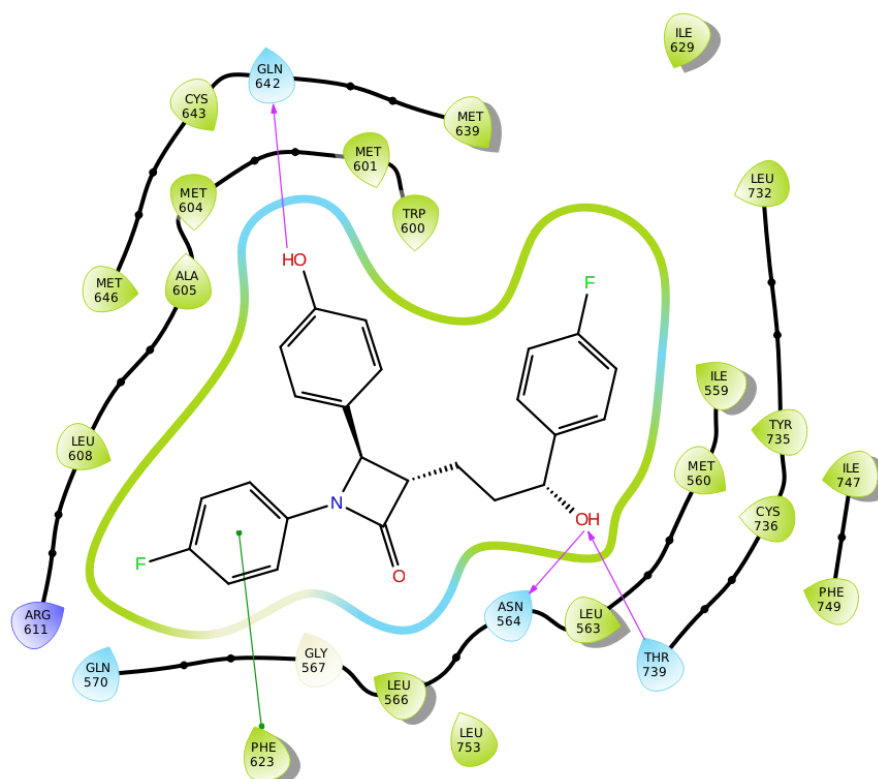


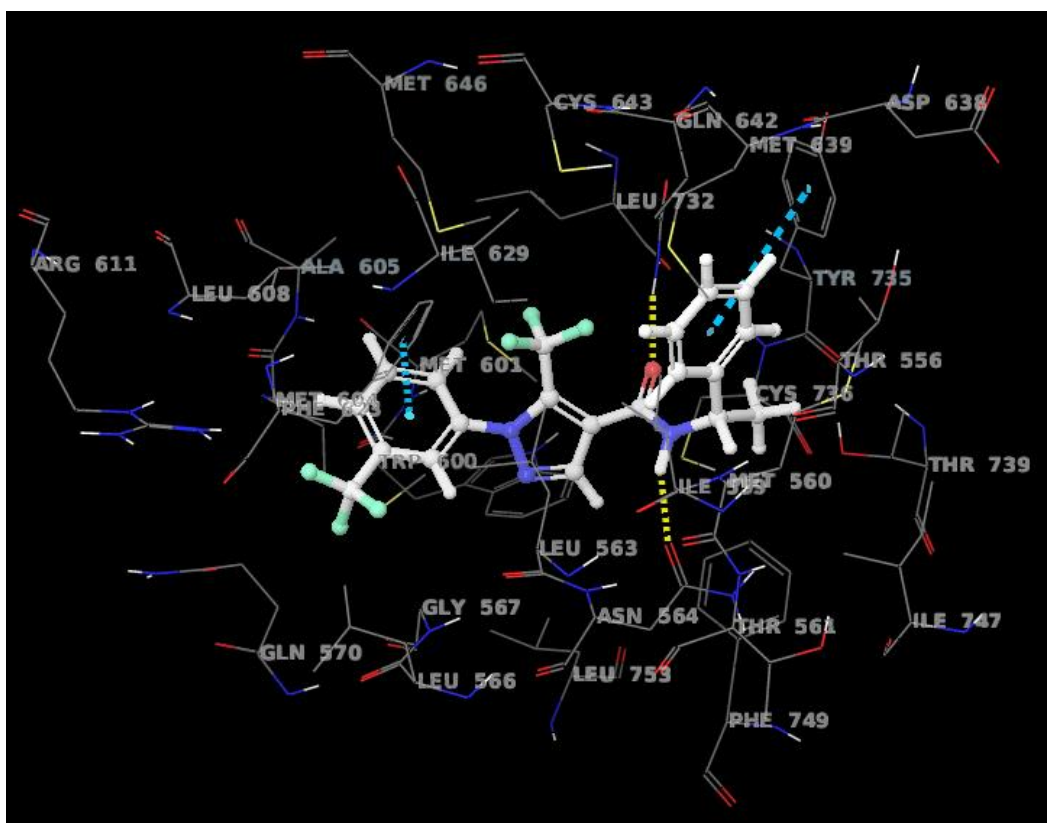
5g3j



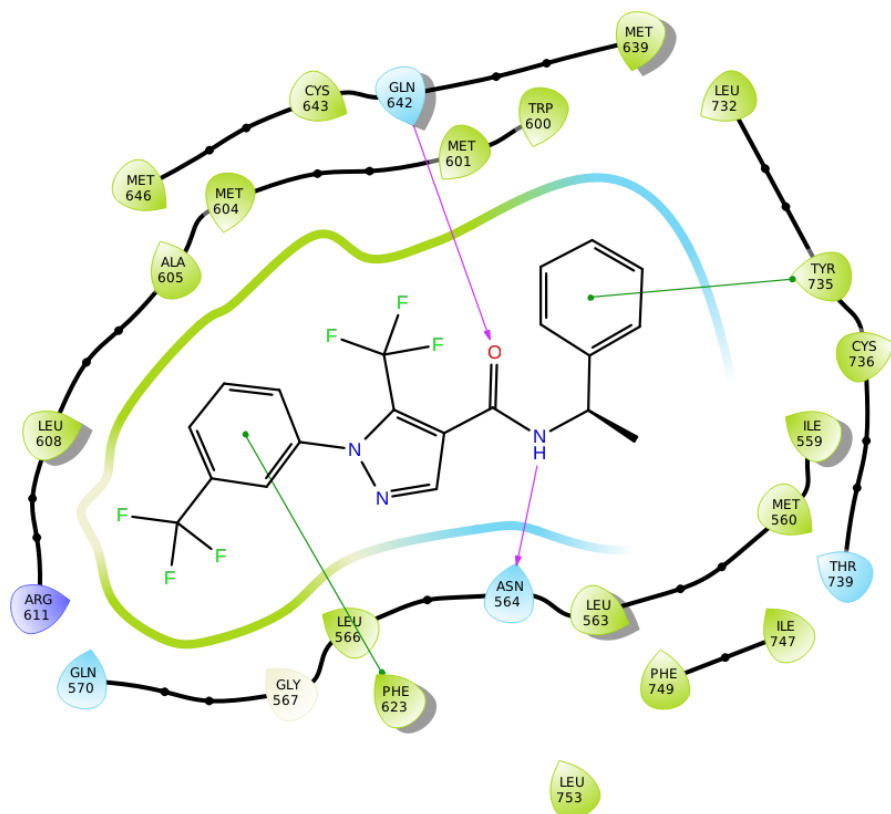


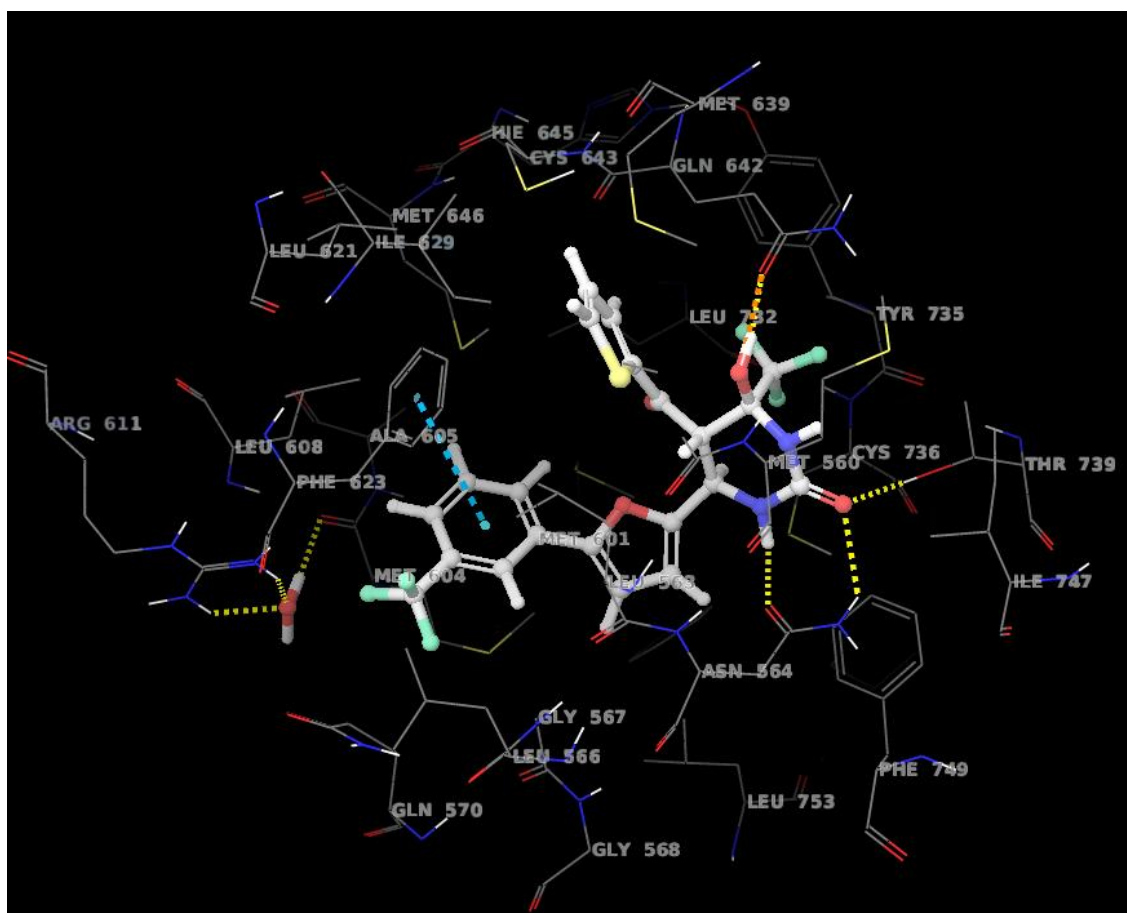
ZINC09211540



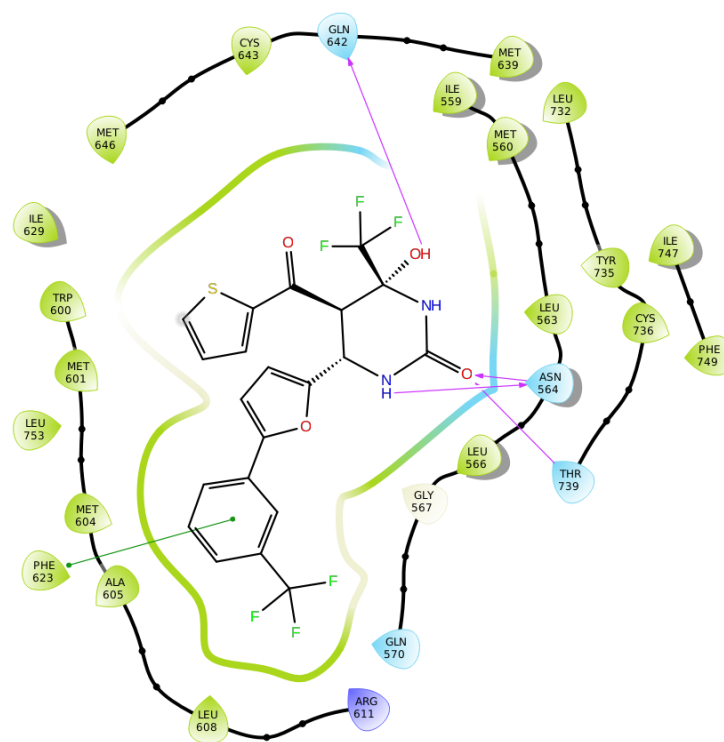


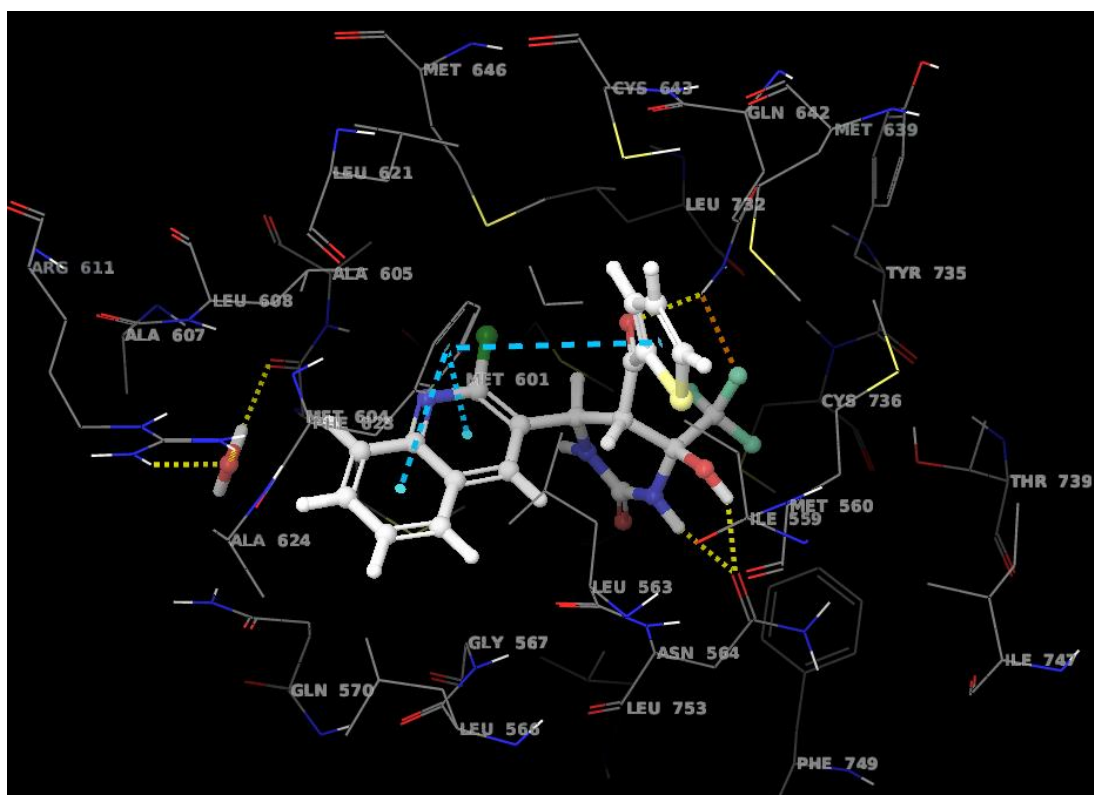
ZINC12822595



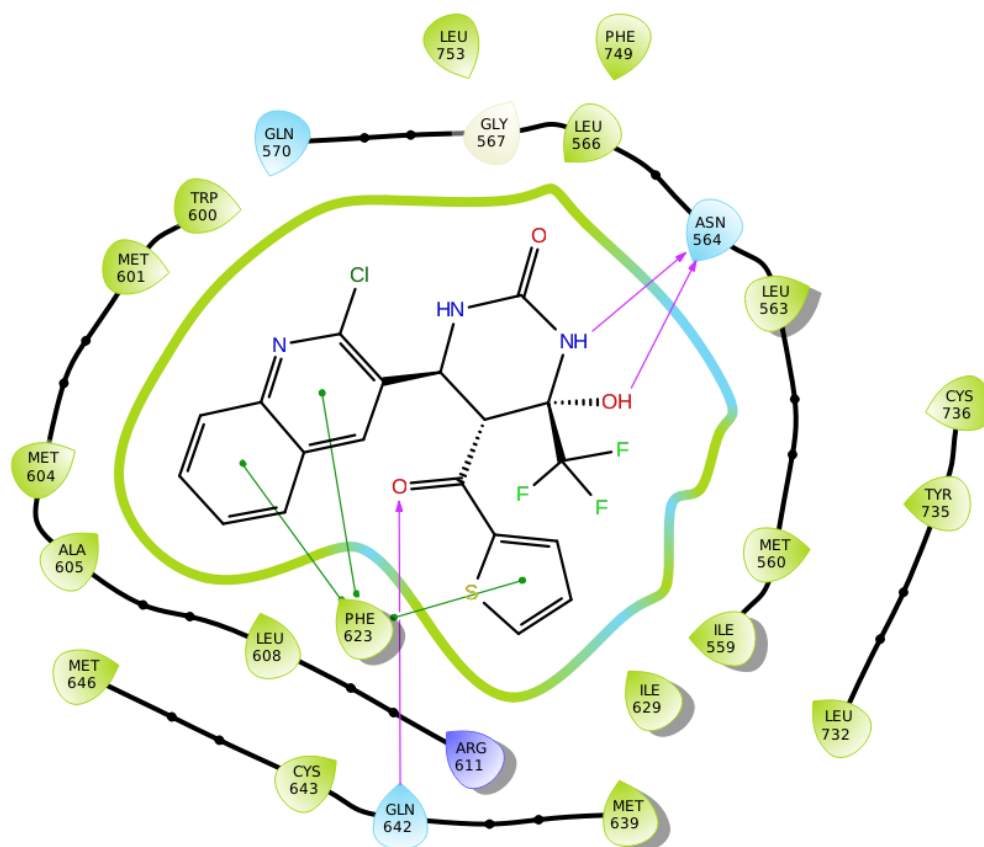


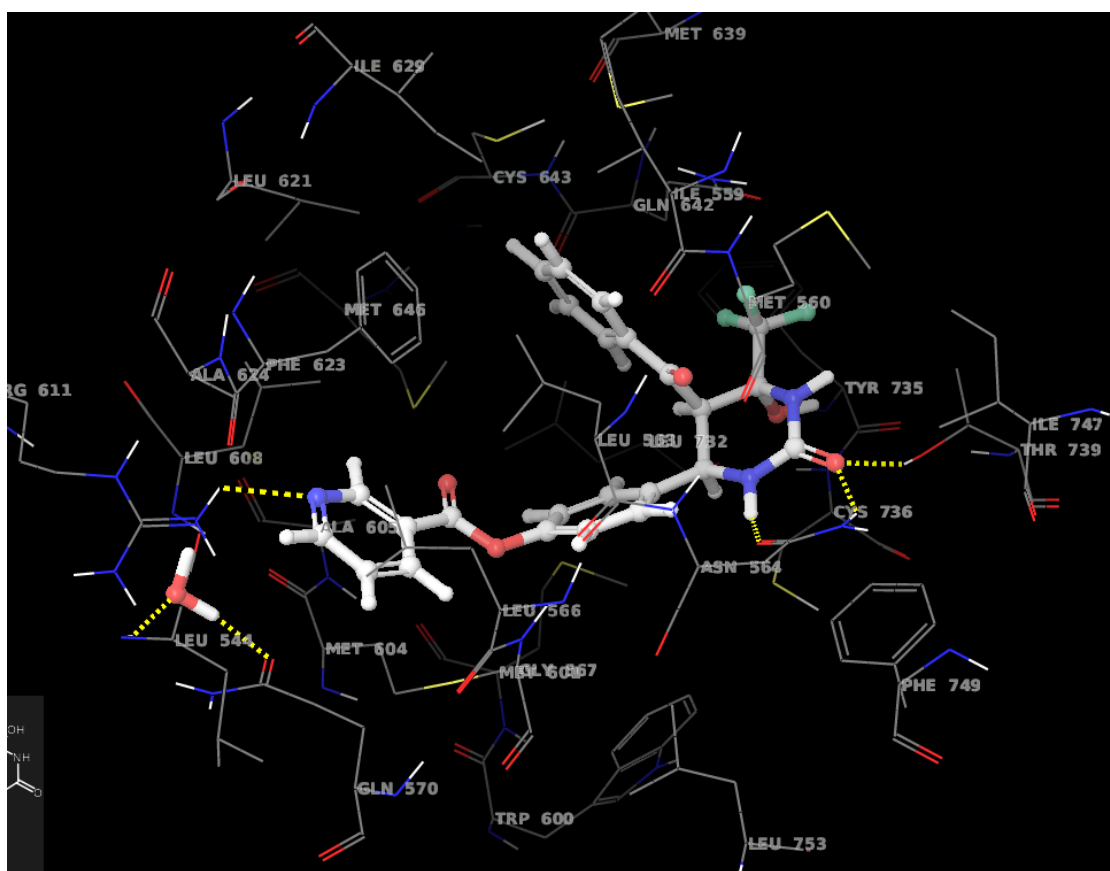
ZINC16734222



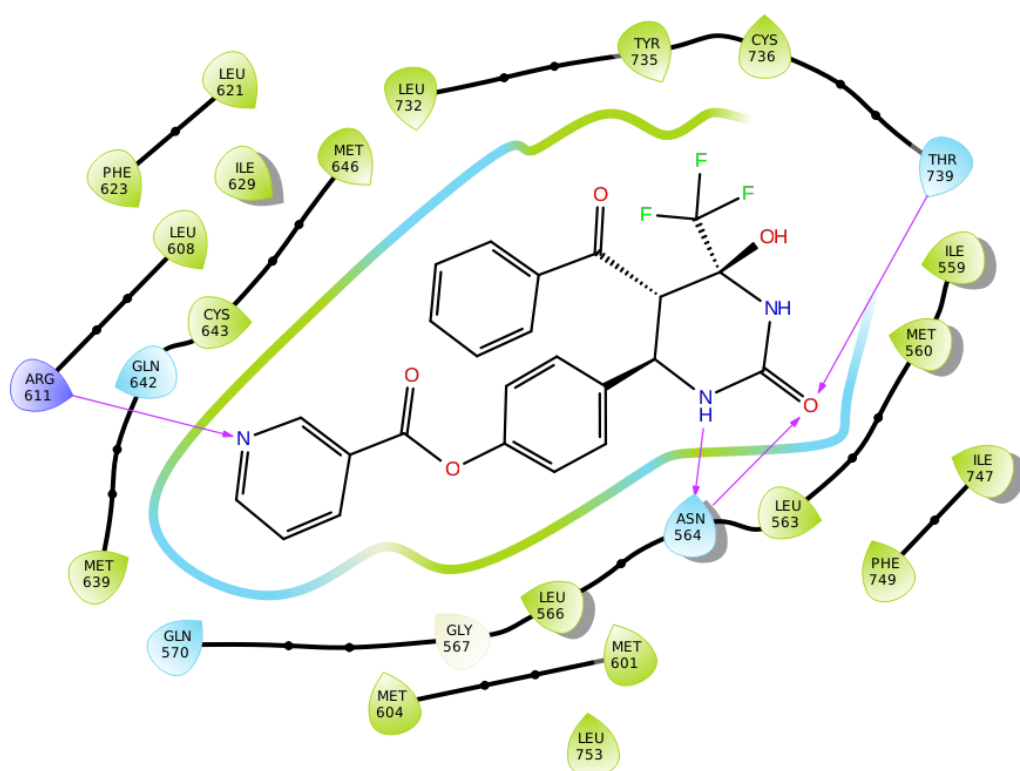


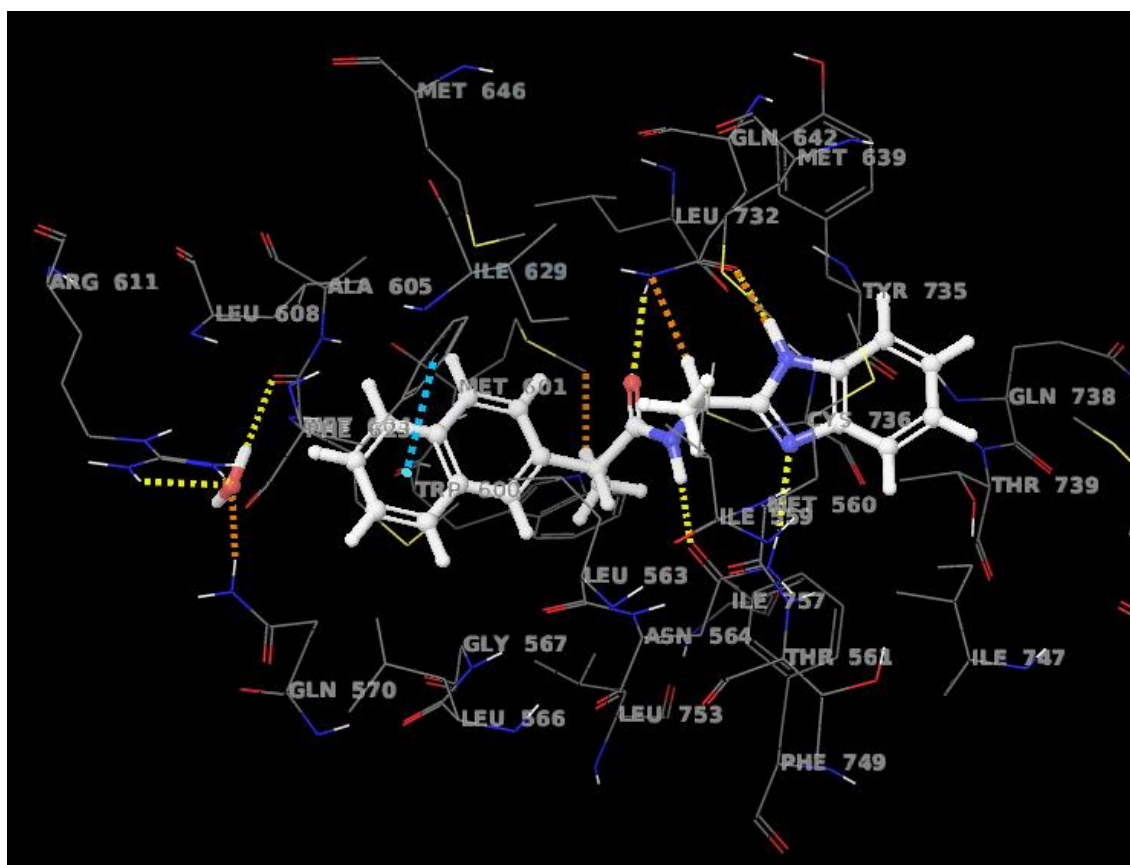
ZINC24632820



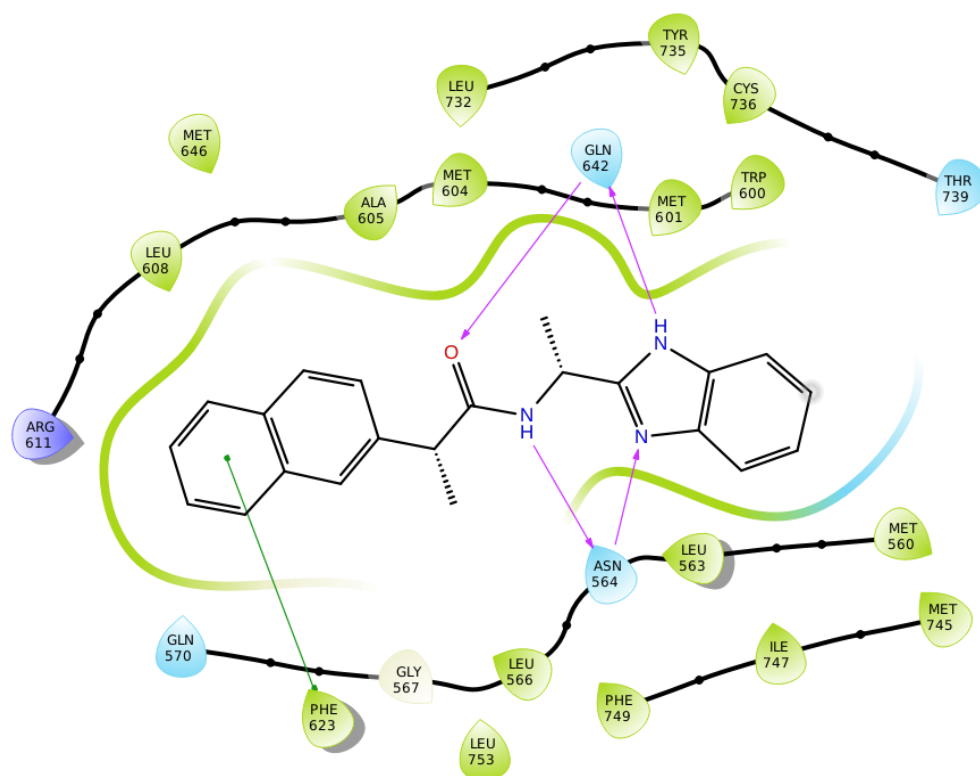


ZINC33682914





ZINC84541473

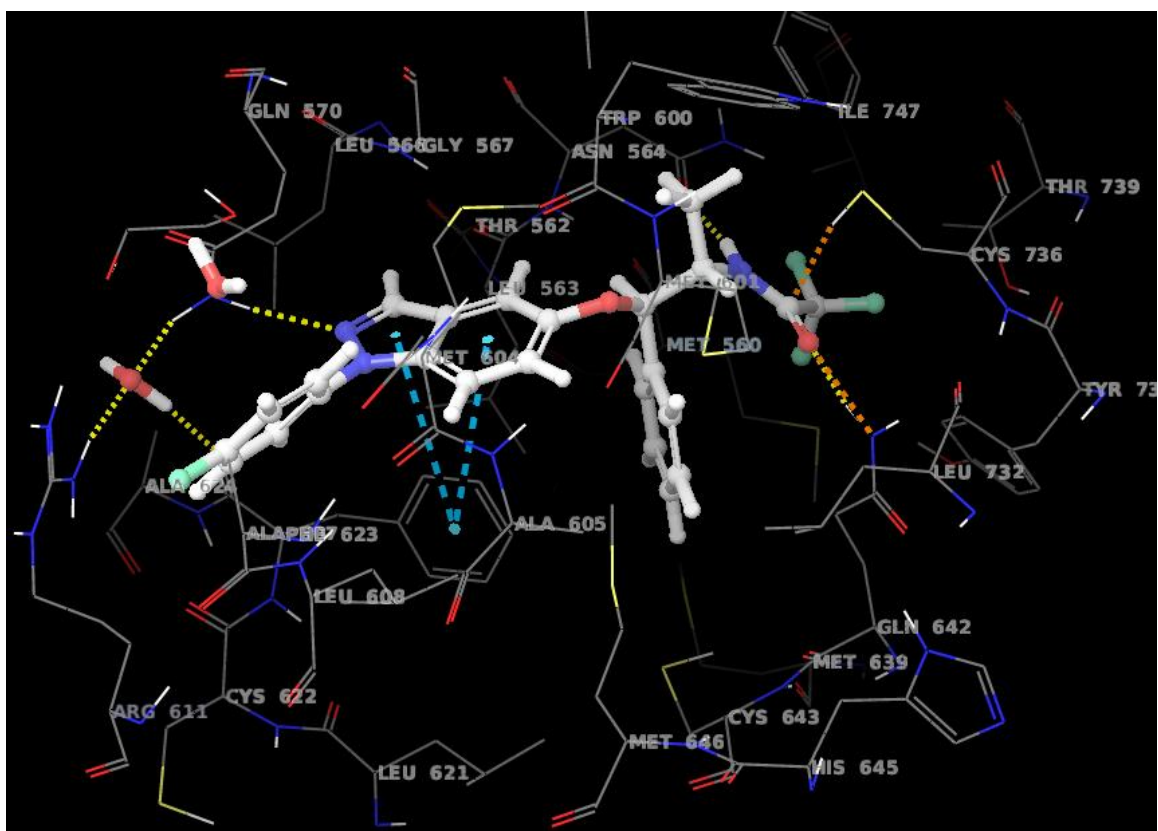


8.2 ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟ 5G3J

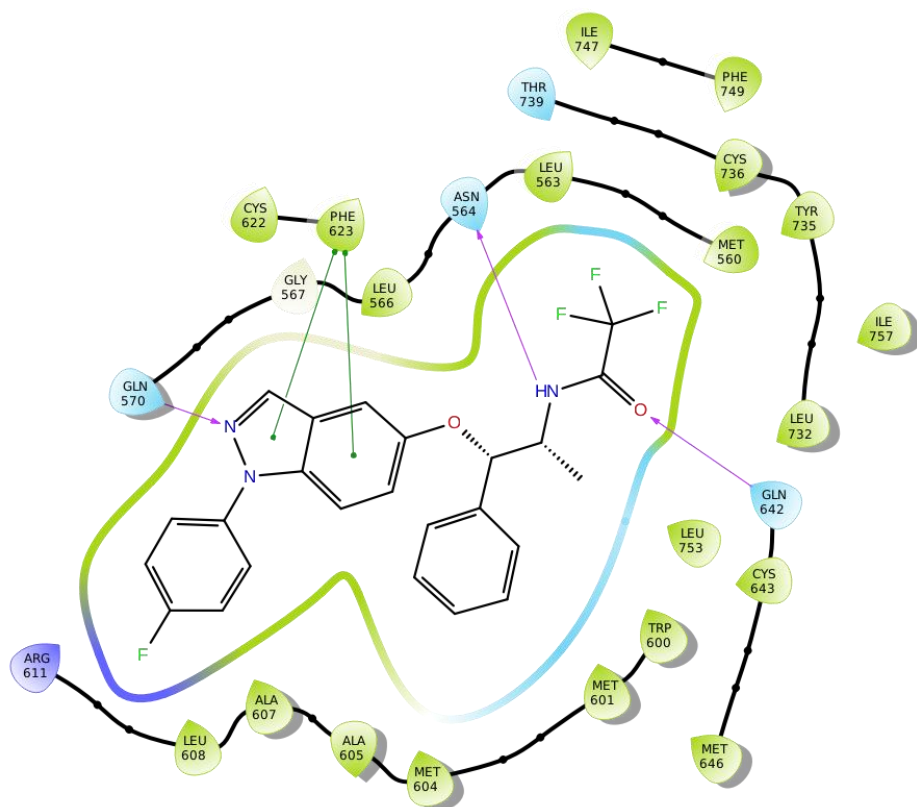
#	Title	glide gscore	IFDScore	glide ligand efficiency	Pharmacophore- Fit Score	tautomer probability	Ionization Penalty
0	5G5W ligand	-14.521	-587.199	-0.44		1	0.0003
1	ZINC09377316	-14.199	-588.98	-0.444	50.68	1	0
2	ZINC34989591	-14.162	-587.944	-0.429	50.74	0.999	0.0067
3	ZINC09252430	-14.082	-587.866	-0.453	41.29	1	0.0522
4	ZINC35510605	-14.069	-587.675	-0.469	49.37	1	0
5	ZINC17828610	-13.757	-589.608	-0.444	40.65	1	0
6	ZINC21971145	-13.453	-588.057	-0.453	50.3	0.573	0.0002
7	ZINC77927113	-13.307	-588.541	-0.459	48.87	1	0
8	ZINC01123466	-13.3	-588.019	-0.447	40.5	0.573	0.0002
9	ZINC38498772	-13.175	-590.792	-0.454	49.07	1	0
10	ZINC71746011	-12.993	-587.323	-0.466	40.65	0.5	0.0441
11	ZINC11964919	-12.096	-587.555	-0.432	50.94	0.5	0.0018

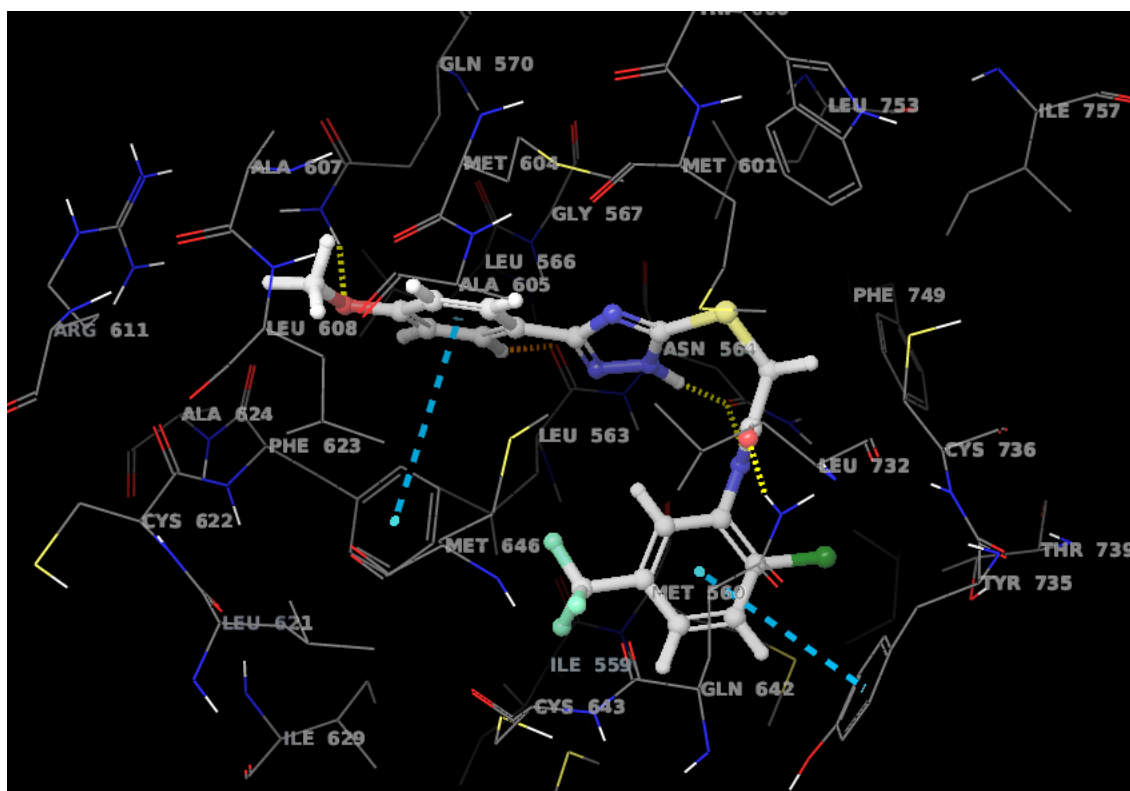
5G5W Title	QPlogPoct o/w (-2.0 / 6.5)	QPlogS (-6.5 / 0.5)	QPlogHERG IC50 value for blockage of HERG K+: log IC50 (concern< -5)	QPPCaco Caco-2 permeability (nm/sec) (<25 poor, >500 great)	QPlogBB (-3.0/1.2)	Percent Human Oral Absorption. % gastrointestinal absorption (+20%) (<25% poor)
ZINC09377316	20.466	-4.948	-5.189	1118.749	-0.531	100
ZINC34989591	22.822	-5.493	-5.654	892.447	-0.905	100
ZINC09252430	21.738	-6.428	-6.748	729.956	-0.907	100
ZINC35510605	22.524	-5.371	-7.273	1275.218	-0.825	100
ZINC17828610	23.514	-6.973	-7.361	433.307	-1.076	100
ZINC21971145	22.312	-6.168	-7.336	953.19	-0.894	100
ZINC77927113	19.015	-5.658	-4.579	1966.578	-0.365	100
ZINC01123466	20.977	-6.587	-5.896	1476.882	-0.126	100
ZINC38498772	20.887	-6.552	-5.787	1563.896	-0.077	100
ZINC71746011	20.454	-6.478	-6.48	1018.559	-0.613	100
ZINC11964919	20.651	-6.746	-6.703	1205.863	-0.584	100
ZINC09377316	20.466	-4.948	-5.189	1118.749	-0.531	100

5G5W Title	QPPMDCK MDCK permeability (nm/sec) (<25 poor, >500 great)	QPlogKhsa QP log KHSa (-1.5/1.5)	#metab Primary metabolites (1/8)	Lipinski Rule Of Five	CNS (--/++)
ZINC09377316	1654.266	0.27	4	0	0
ZINC34989591	621.046	0.34	4	0	-1
ZINC09252430	641.183	0.534	3	0	-1
ZINC35510605	1021.218	0.201	5	0	-1
ZINC17828610	754.688	0.371	4	0	-2
ZINC21971145	469.727	0.573	3	0	-1
ZINC77927113	1550.384	0.628	3	0	0
ZINC01123466	10000	0.487	3	0	0
ZINC38498772	10000	0.507	3	0	0
ZINC71746011	910.391	0.689	3	0	-1
ZINC11964919	1488.973	0.548	2	0	0
ZINC09377316	1654.266	0.27	4	0	0

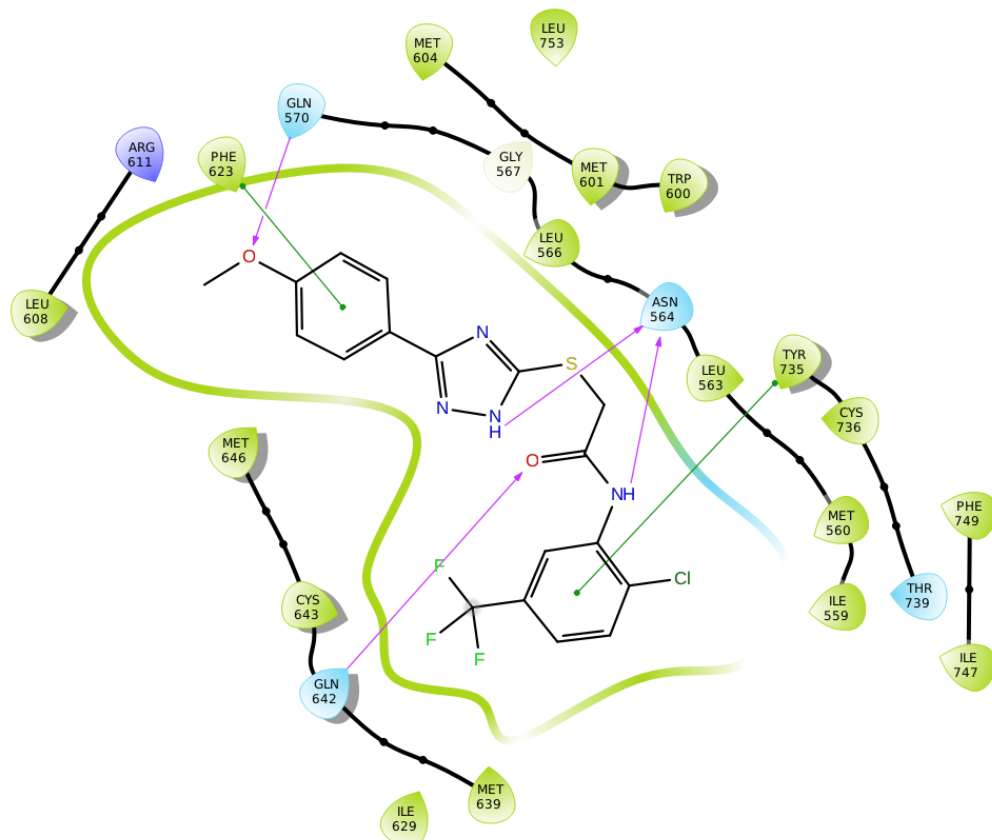


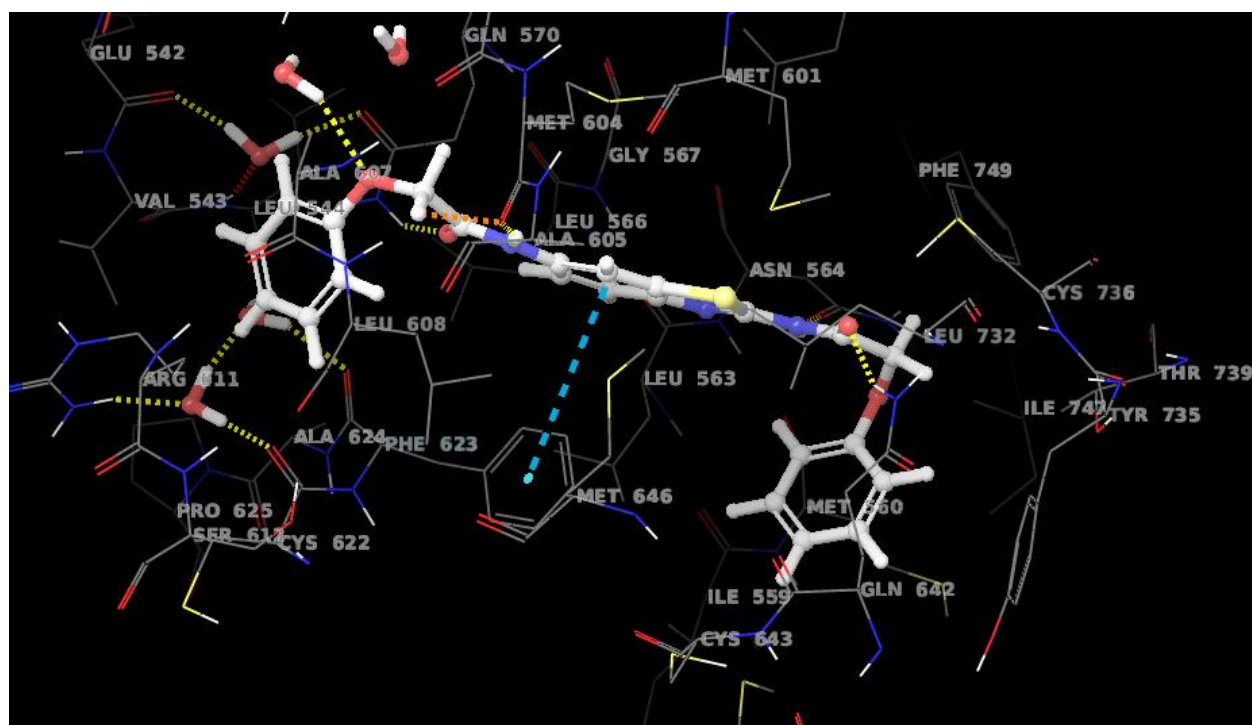
5g5w



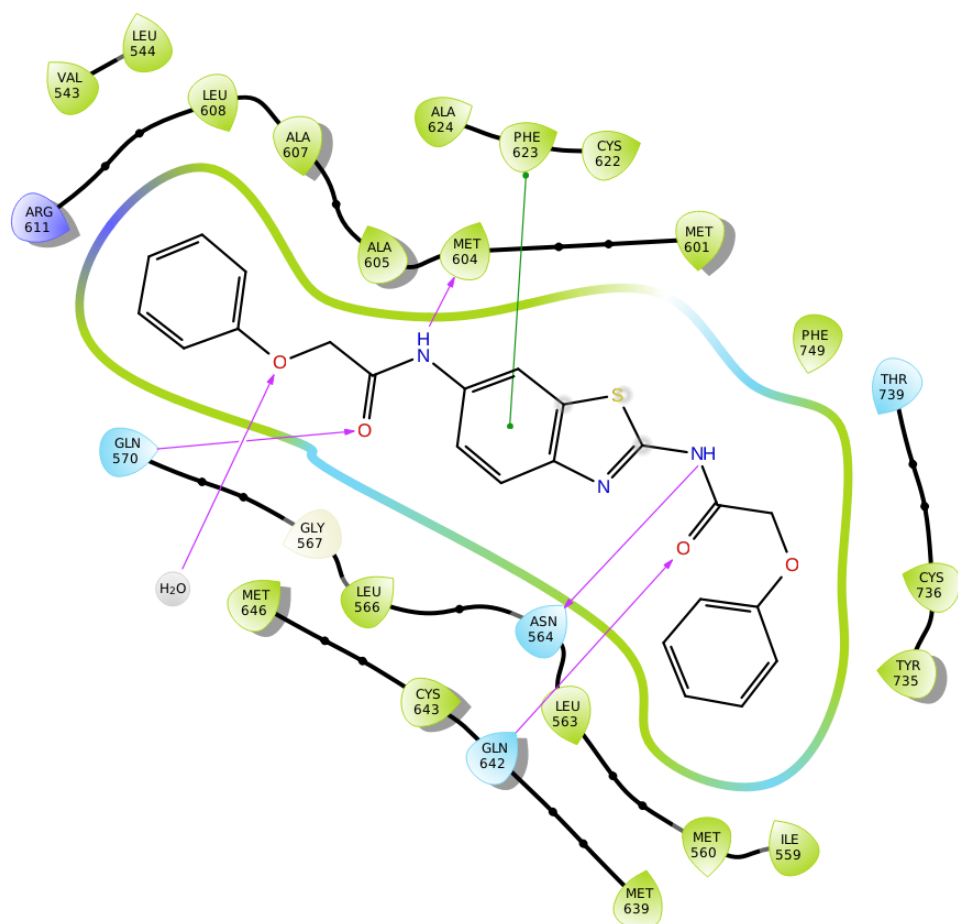


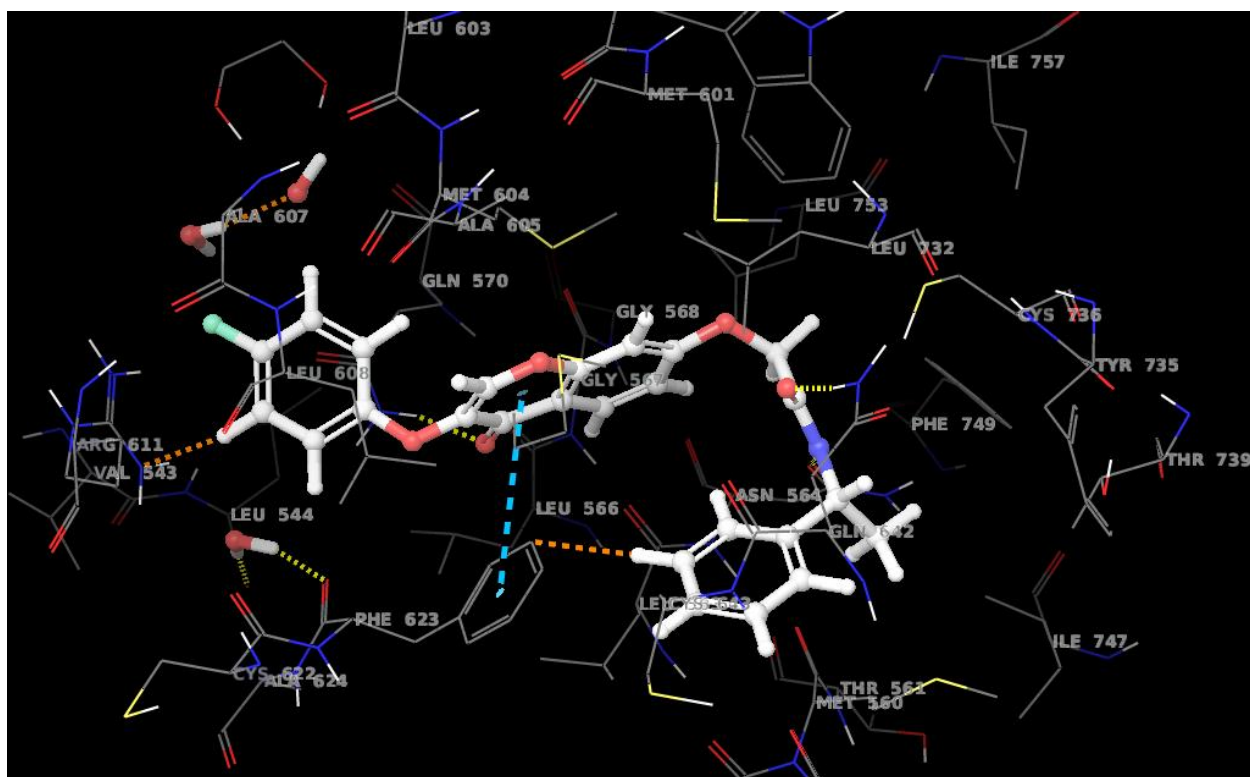
ZINC01123466



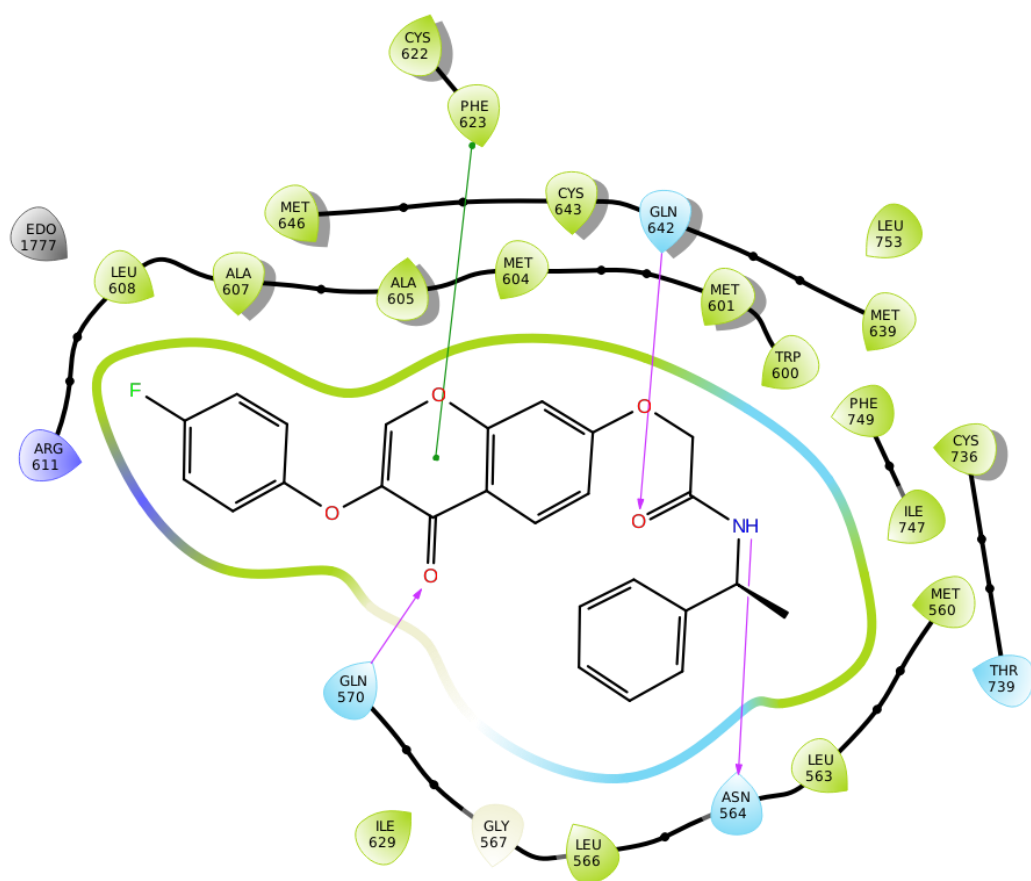


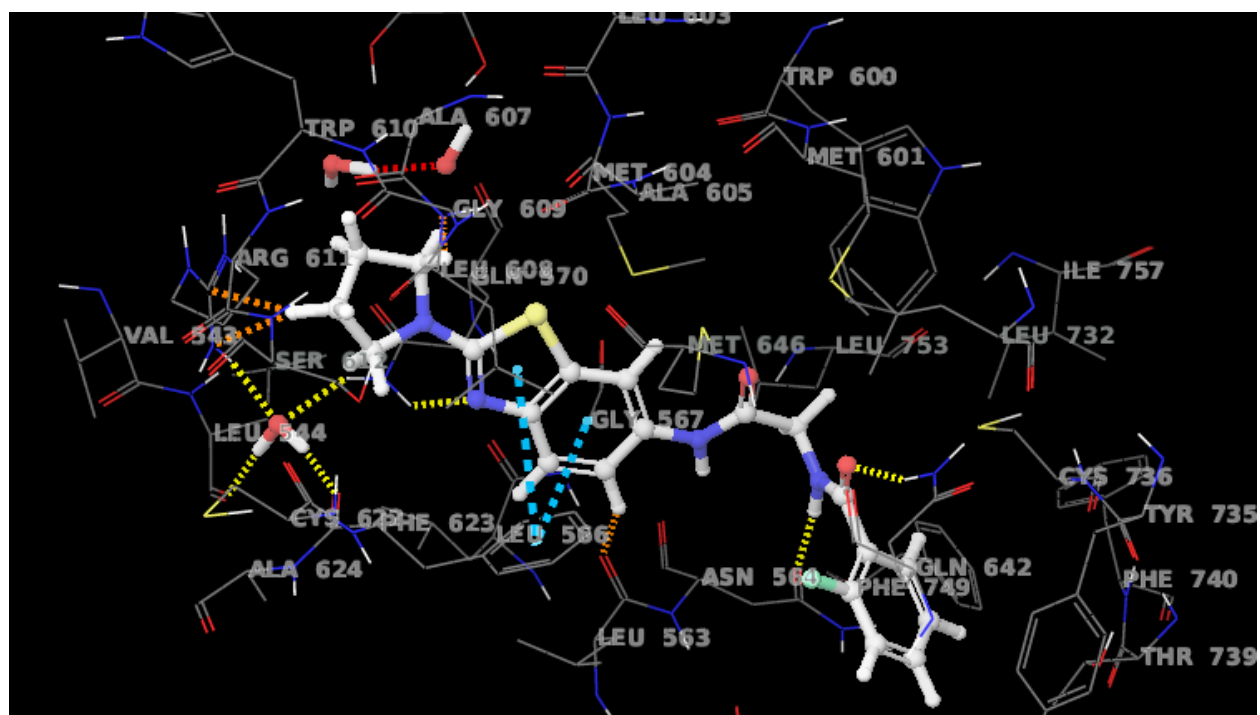
ZINC09252430



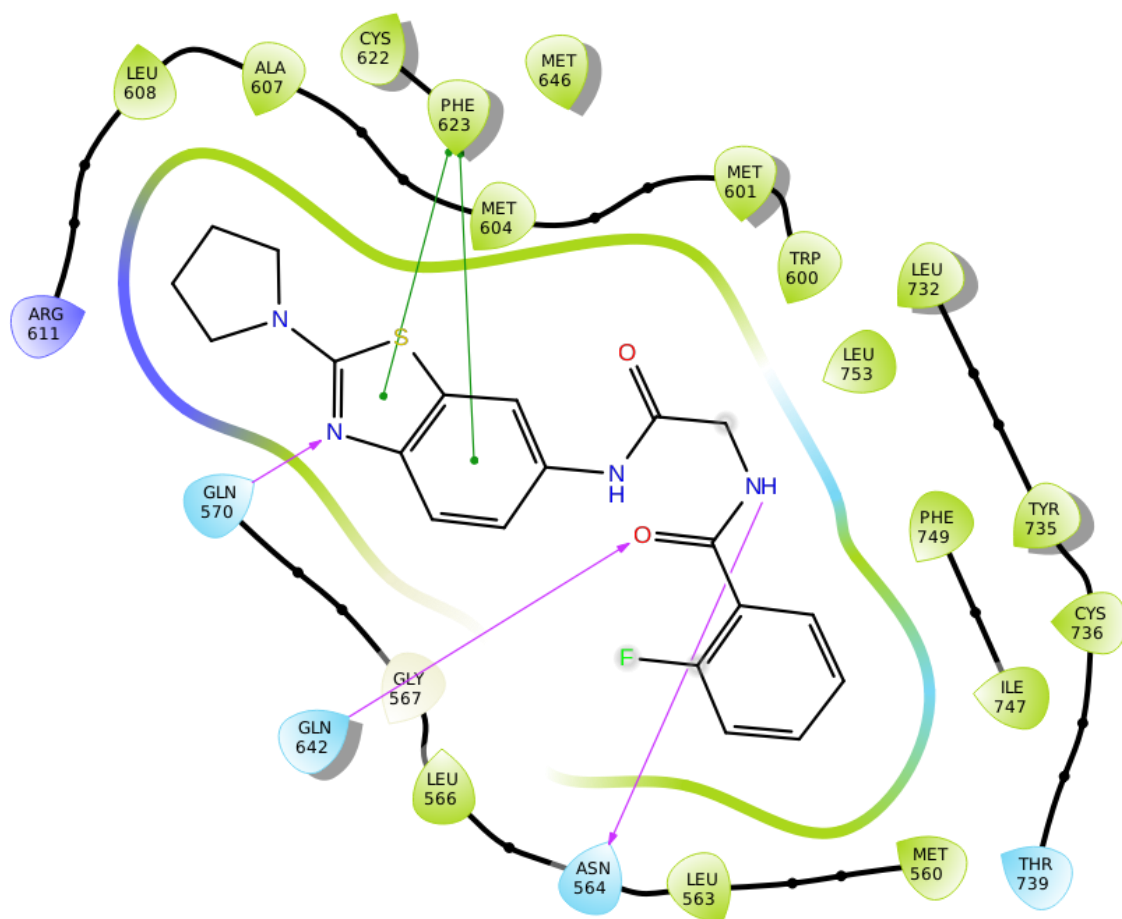


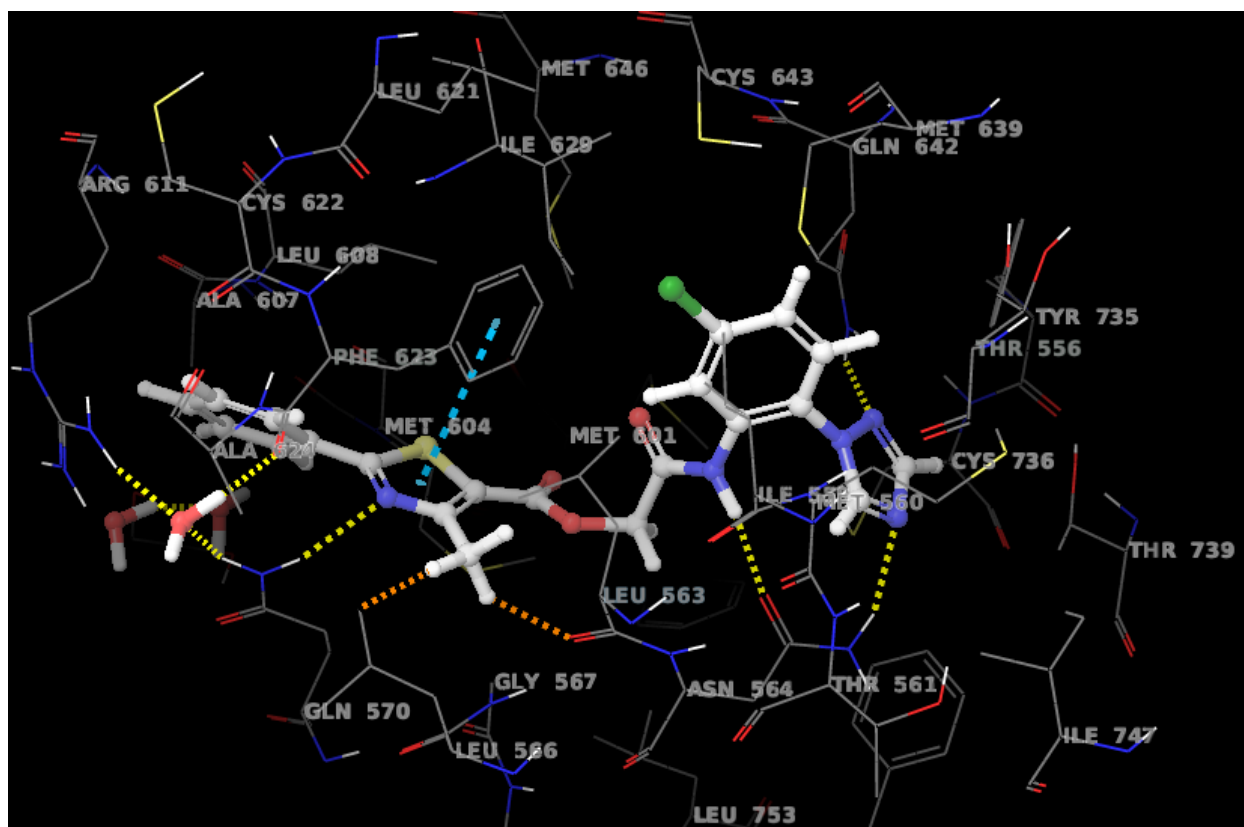
ZINC09377316



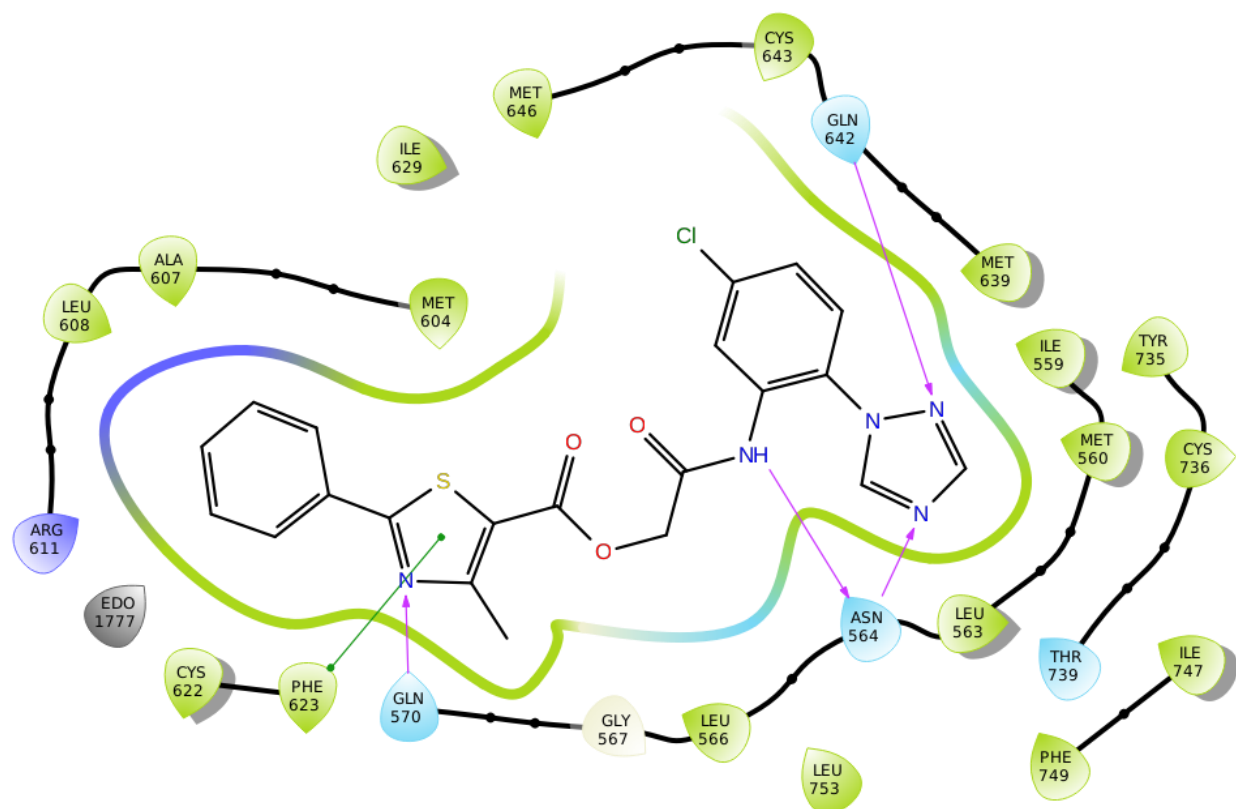


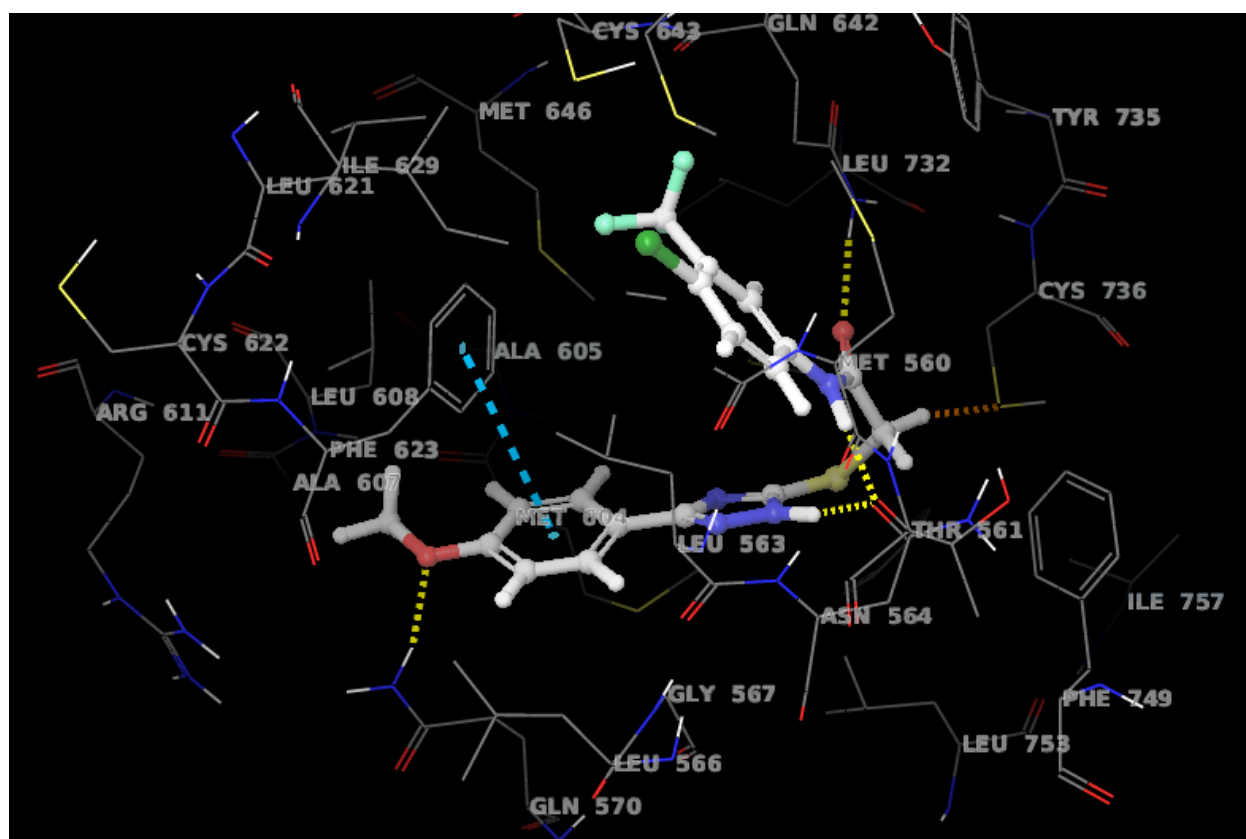
ZINC11964919



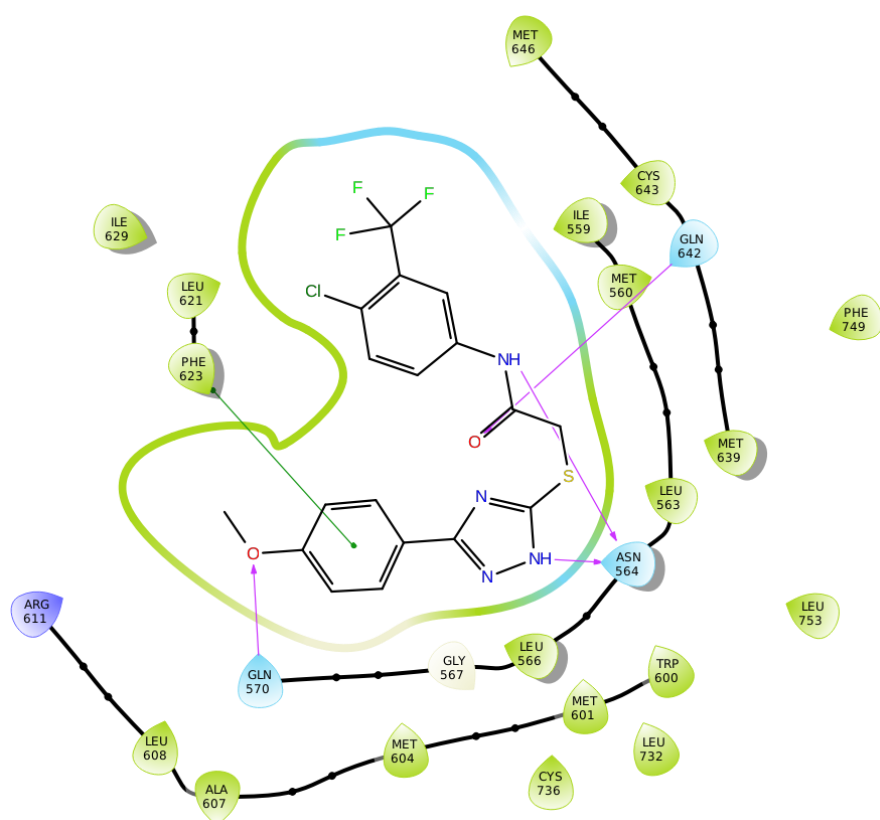


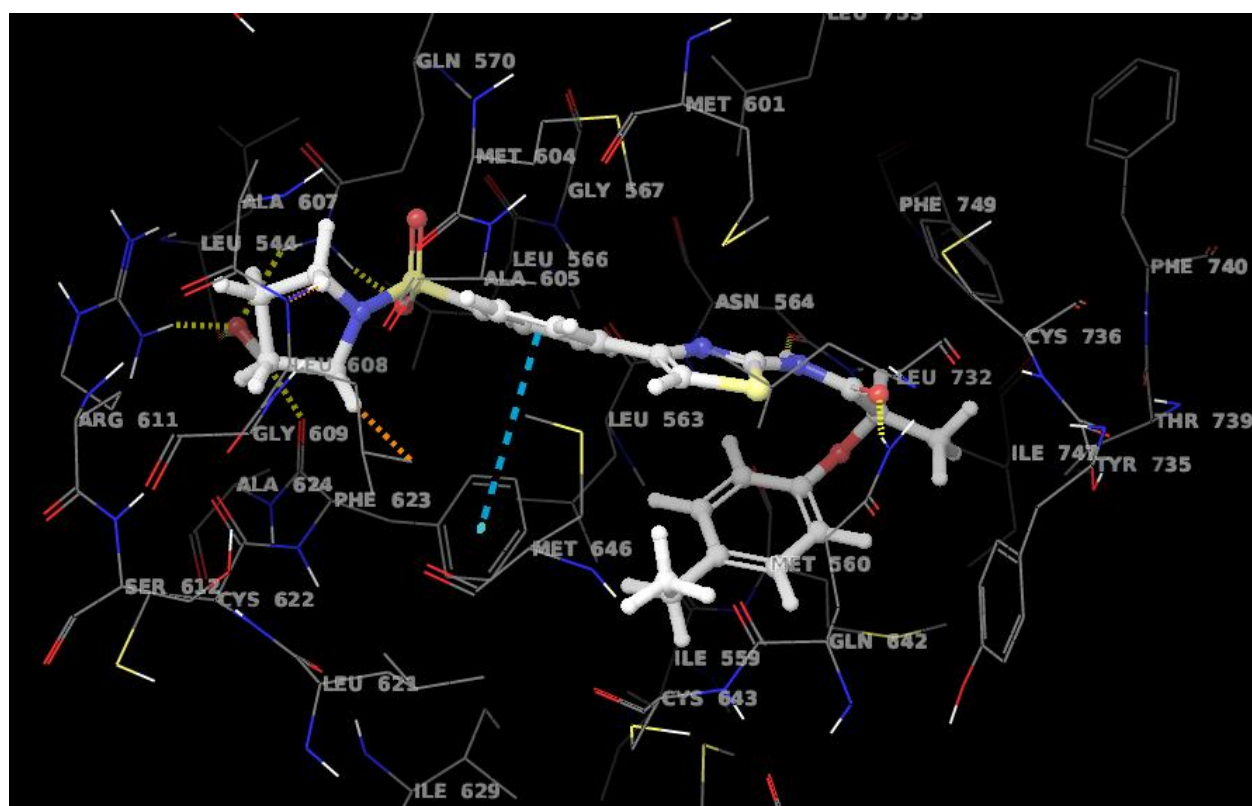
ZINC17828610



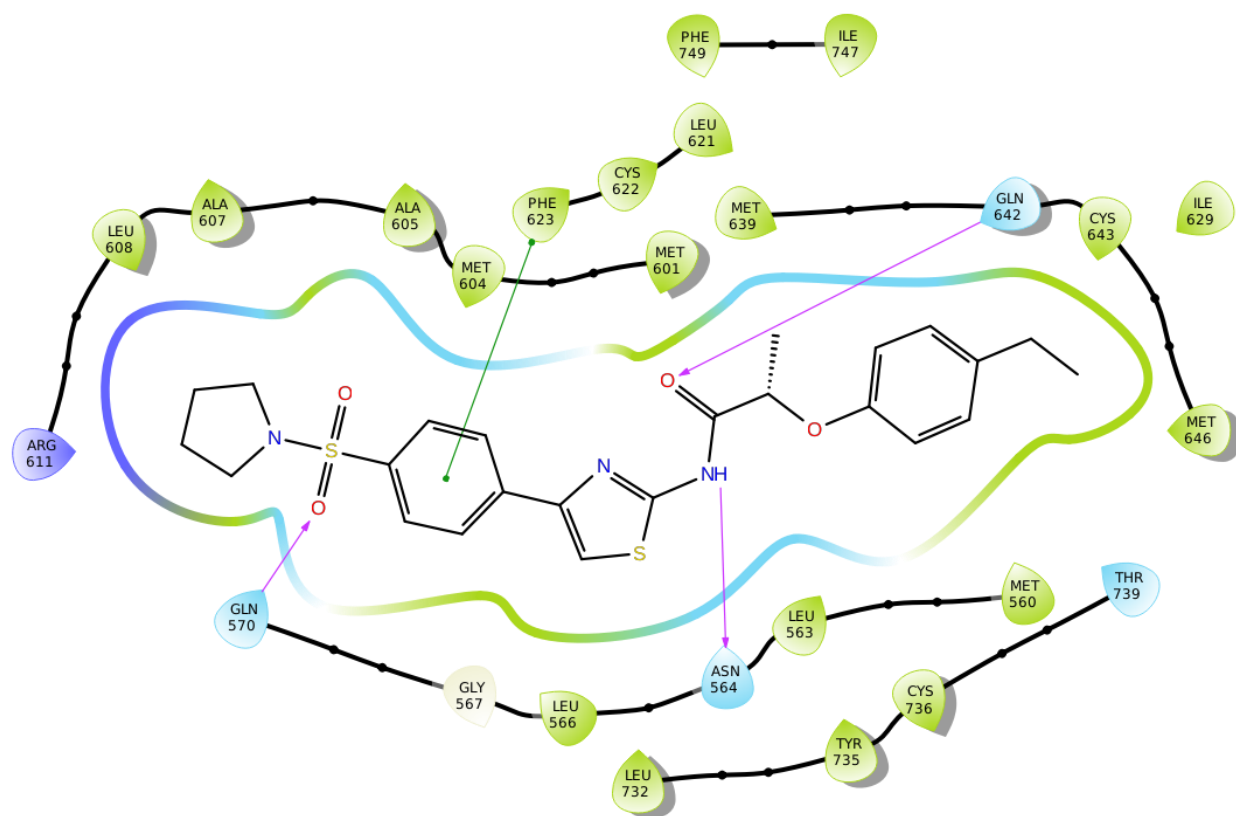


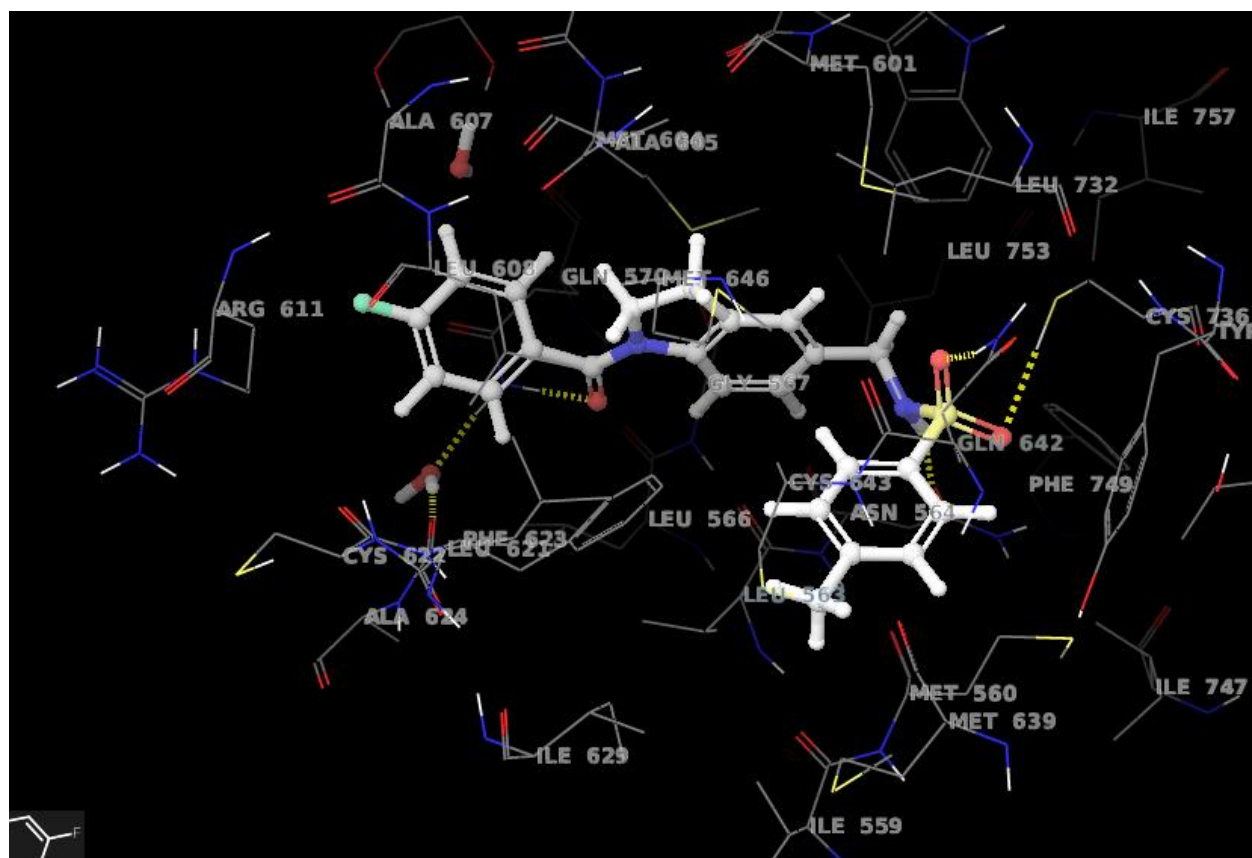
ZINC21971145



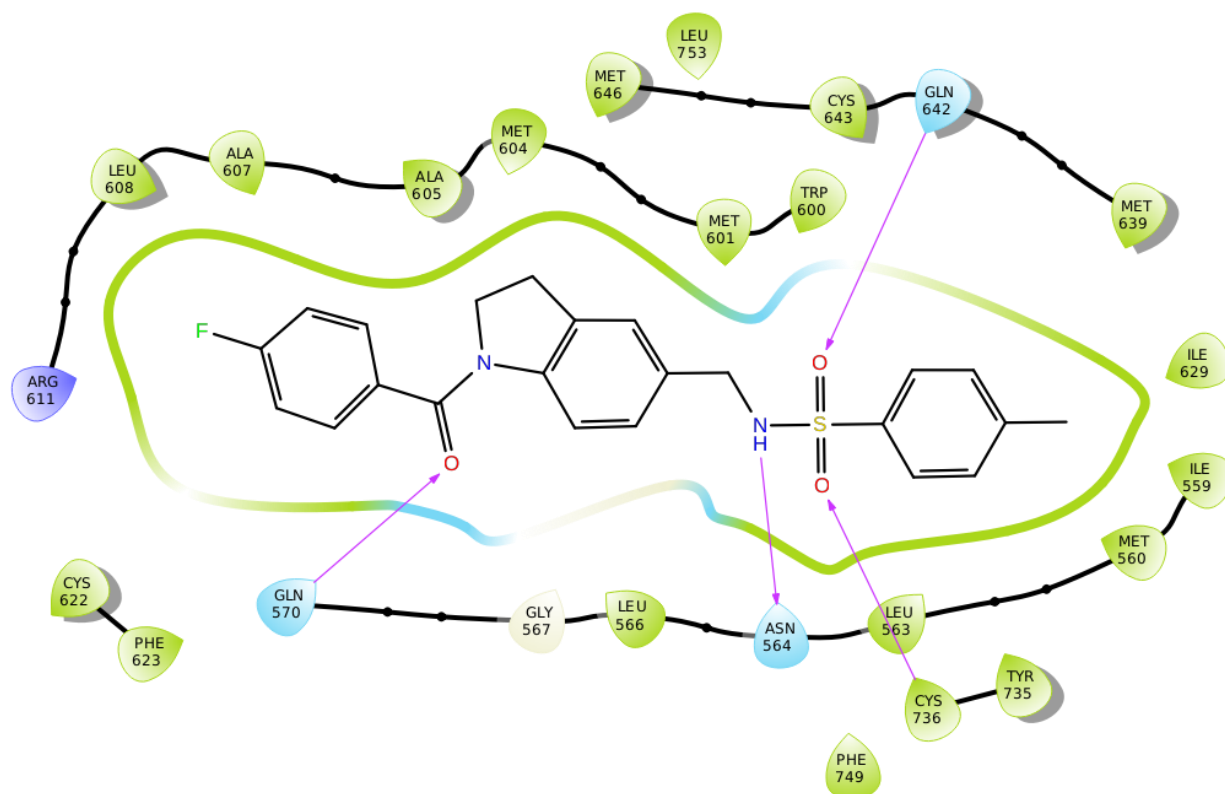


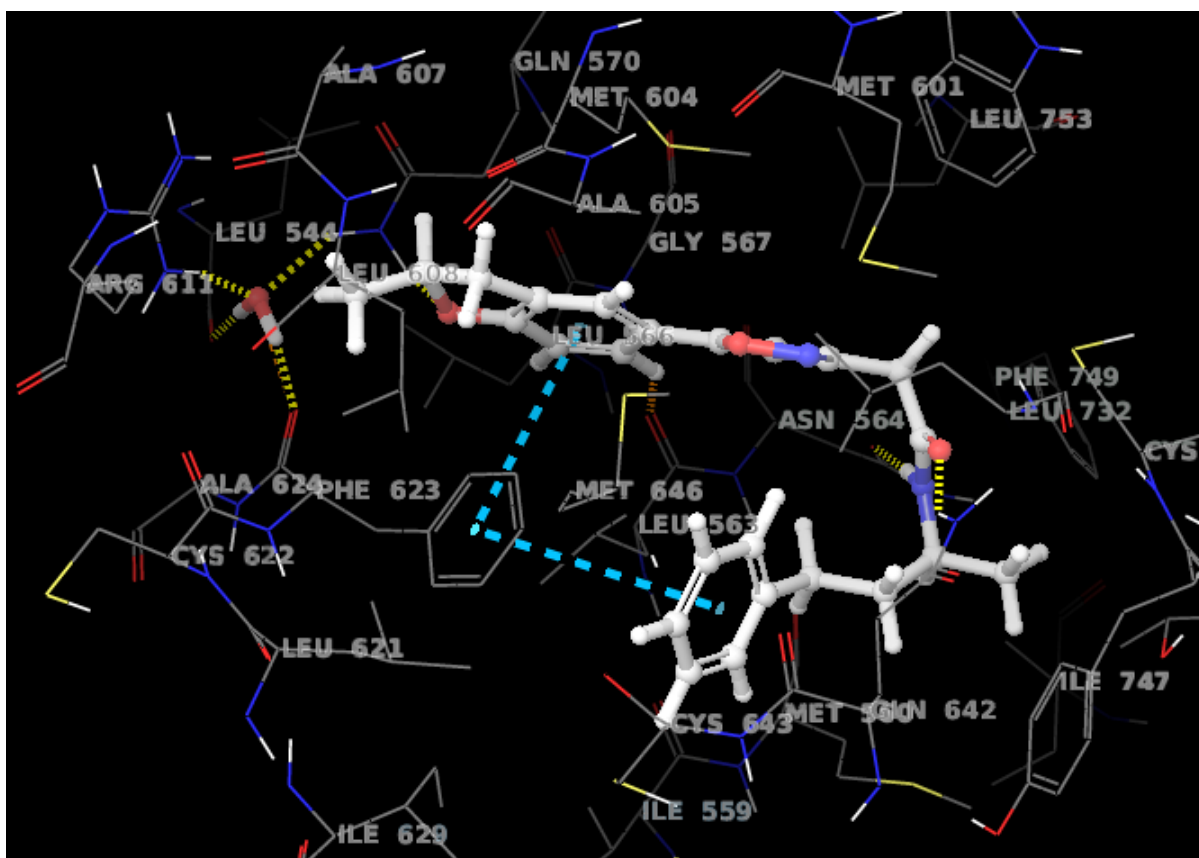
ZINC34989591



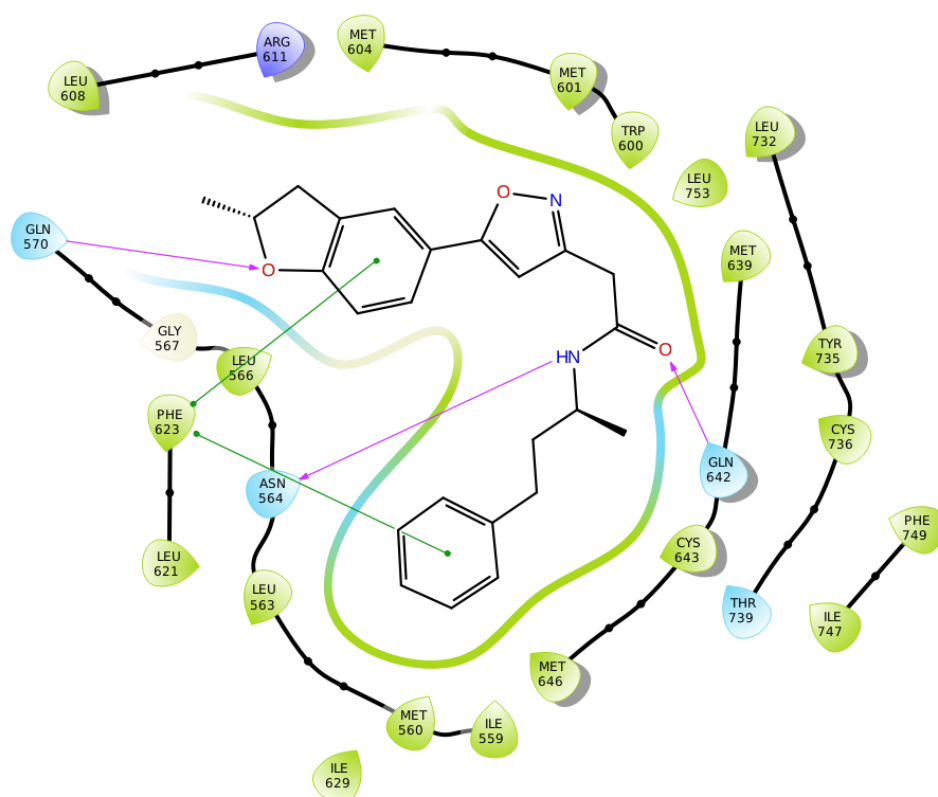


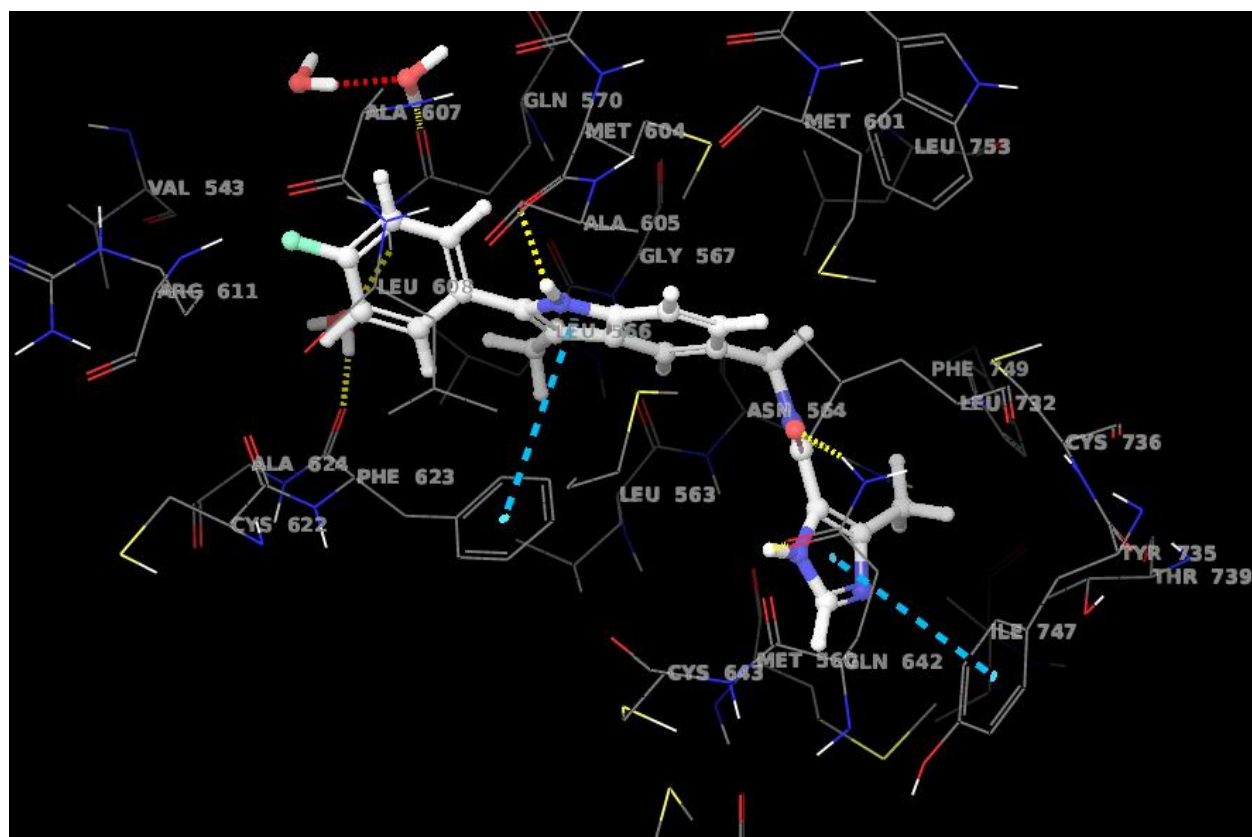
ZINC35510605



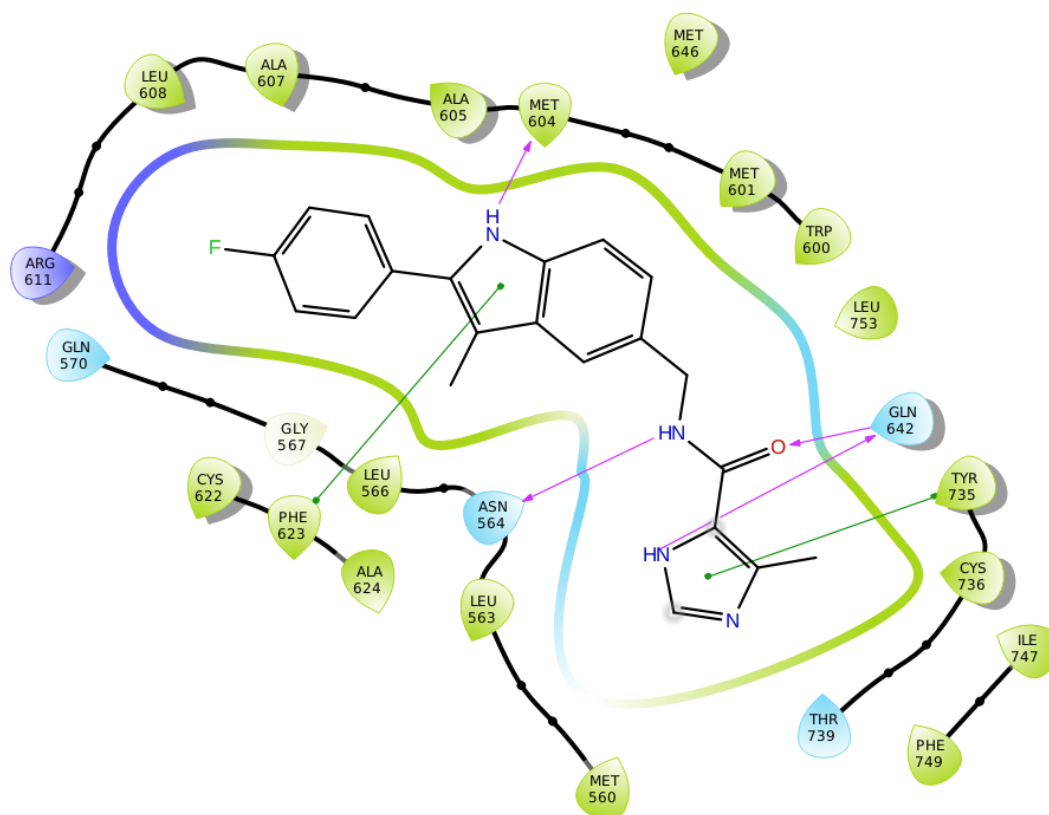


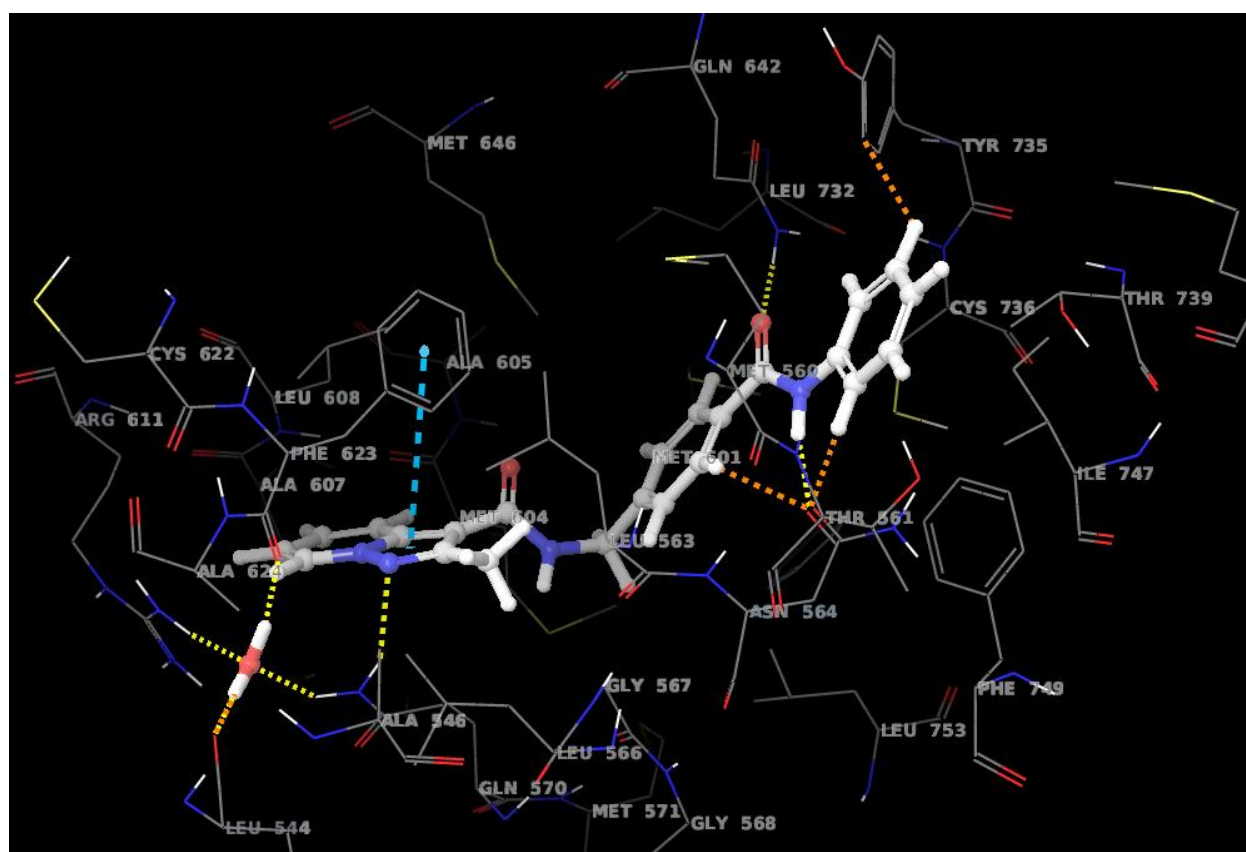
ZINC38498772



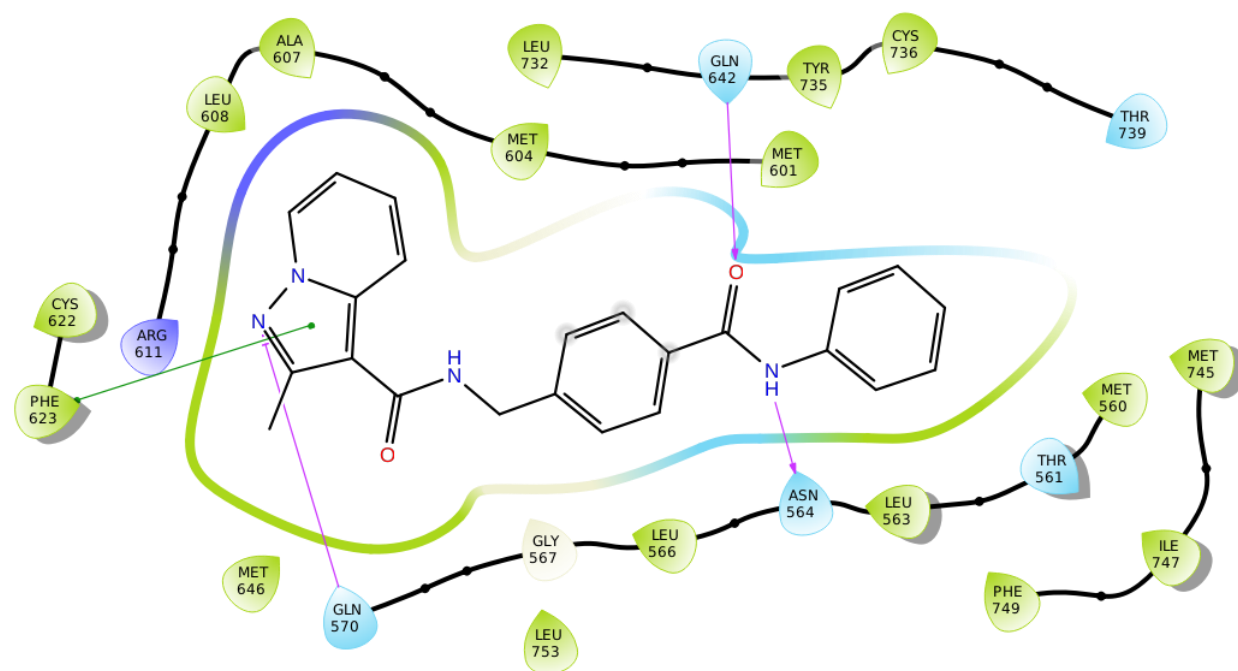


ZINC71746011





ZINC77927113



9 ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

GR: Glucocorticoid receptor

GRE: Glucocorticoid-responsive element

LBD: Ligand-binding domain

DBD: DNA-binding domain

NF-kB: Nuclear factor kB

SEGRA: Selective glucocorticoid receptor agonist

HTVS: High Throughput Virtual Screening

Glide: Grid-based Ligand Docking with Energetics

DEX: δεξαμεθαζόνη

DAC: δραστικό φαινυλ πυραζολο γλυκο-κορτικοειδές δεακυλοκορτιβαζόλη

10 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jain, A. Computer aided drug design. In Journal of Physics: Conference Series 884, (2017).
2. Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37, 1595–1607 (1988).
3. 2008. Dissociated non-steroidal glucocorticoid receptor modulators an update on new compounds Dissociated non-steroidal glucocorticoid
4. 2015. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds.
5. 2014. LLY-2707, a novel nonsteroidal glucocorticoid antagonist that reduces atypical antipsychotic-associated weight gain in rats. Sind
6. 2011. The antagonists but not partial agonists of glucocorticoid receptor ligands show substantial side effect dissociation. Hu et al
7. Hemmerling, M. et al. Discovery of indazole ethers as novel, potent, non-steroidal glucocorticoid receptor modulators. Bioorganic Med. Chem. Lett. 26, 5741–5748 (2016).
8. 2012. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Discovery of new selective glucocorticoid receptor agonist leads
9. ChEMBL database, European Bioinformatics Institute(EBI):Cambridge, U.K., 2010. <http://www.ebi.ac.uk/chembl/> (accessed 16 Feb 20104 Mar 2010).
10. Cousins, K. R. Computer review of ChemDraw ultra 12.0. Journal of the American Chemical Society 133, 8388 (2011).
11. Design, D. In Silico Drug Design. Genomics and Proteomics 165, (2008).
12. Wolber, G. & Langer, T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. J. Chem. Inf. Model. 45, 160–169 (2005).
13. Kirchmair, J., Wolber, G., Laggner, C. & Langer, T. Comparative performance assessment of the conformational model generators omega and catalyst: A large-scale survey on the retrieval of protein-bound ligand conformations. J. Chem. Inf. Model. 46, 1848–1861 (2006).
14. Wolber, G. & Langer, T. LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. J. Chem. Inf. Model. 45, 160–169 (2005).+
15. Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S. & Coleman, R. G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. Journal of Chemical Information and Modeling 52, 1757–1768 (2012).

16. Duan, J.; Dixon, S.L.; Lowrie, J.F.; Sherman, W., "Analysis and Comparison of 2D Fingerprints: Insights into Database Screening Performance Using Eight Fingerprint Methods," *J. Molec. Graph. Model.*, 2010, 29, 157-170
17. Sastry, M.; Lowrie, J. F.; Dixon, S. L.; Sherman, W., "Large-Scale Systematic Analysis of 2D Fingerprint Methods and Parameters to Improve Virtual Screening Enrichments," *J. Chem. Inf. Model.*, 2010, 50, 771–784
18. Schrödinger Release 2018-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.
19. Sastry, G.M.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W., "Protein and ligand preparation: Parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments," *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, 2013, 27(3), 221-234
20. Schrödinger Release 2018-1: Schrödinger Suite 2018-1 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.
21. Schrödinger Release 2018-1: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.
22. Friesner, R. A.; Murphy, R. B.; Repasky, M. P.; Frye, L. L.; Greenwood, J. R.; Halgren, T. A.; Sanschagrin, P. C.; Mainz, D. T., "Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes," *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 6177–6196
23. Halgren, T. A.; Murphy, R. B.; Friesner, R. A.; Beard, H. S.; Frye, L. L.; Pollard, W. T.; Banks, J. L., "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening," *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 1750–1759
24. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shaw, D. E.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Francis, P.; Shenkin, P. S., "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy," *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 1739–1749
25. Schrödinger Release 2018-1: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.
26. Good, A. C., Krystek, S. R. & Mason, J. S. High-throughput and virtual screening: Core lead discovery technologies move towards integration. *Drug Discovery Today* 5, (2000).
27. Bledsoe, R. K., Stewart, E. L. & Pearce, K. H. Structure and function of the glucocorticoid receptor ligand binding domain. *Nucl. Recept. Coregulators* 68, 49–91 (2004).
28. Μ. Μαρκέλος, Γ. Λεονταρίτης Κεφ. 6 Γνωστοί και χαρακτηρισμένοι υποδοχείς
29. H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242.

30. Halgren, T., "Identifying and characterizing binding sites and assessing druggability," *J. Chem. Inf. Model.*, 2009, 49, 377–389
31. Halgren, T., "New method for fast and accurate binding-site identification and analysis," *Chem. Biol. Drug Des.*, 2007, 69, 146–148
32. Schrödinger Release 2018-1: SiteMap, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.
33. Munck, A., Guyre, P. M. & Holbrook, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5, 25–44 (1984).
34. McEwan. Natural disordered sequences in the amino terminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors. *Nucl. Recept. Signal.* 4, (2007).
35. Quax, R. A. et al. Glucocorticoid sensitivity in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology* 9, 670–686 (2013).
36. Acun, C., Tomac, N., Ermis, B. & Onk, G. Effects of inhaled corticosteroids on growth in asthmatic children: a comparison of fluticasone propionate with budesonide. *Allergy Asthma Proc* 26, 204–206 (2005).
37. Janet Piñero, Àlex Bravo, Núria Queralt-Rosinach, Alba Gutiérrez-Sacristán, Jordi Deu-Pons, Emilio Centeno, Javier García-García, Ferran Sanz, and Laura I. Furlong. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucl. Acids Res.* (2016) doi:10.1093/nar/gkw943
38. Janet Piñero, Núria Queralt-Rosinach, Àlex Bravo, Jordi Deu-Pons, Anna Bauer-Mehren, Martin Baron, Ferran Sanz, Laura I. Furlong. DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database* (2015) doi:10.1093/database/bav028
39. Kuhn, M., Letunic, I., Jensen, L. J. & Bork, P. The SIDER database of drugs and side effects. *Nucleic Acids Res.* 44, D1075–D1079 (2016).
40. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4; 44(D1):D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175] doi: 10.1093/nar/gkv951.
41. Korolev, S. ChemSpider. *Choice* 46, 542–543 (2008).
42. ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules. Backman TW, Cao Y, Girke T, *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul ; 39(Web Server issue): W486-91
43. Ayroldi, E., Macchiarulo, A. & Riccardi, C. Targeting glucocorticoid side effects: Selective glucocorticoid receptor modulator or glucocorticoid-induced leucine zipper? A perspective. *FASEB J.* 28, 5055–5070 (2014).

44. T. Kino, G.P. Chrousos, Glucocorticoid effect on gene expression, in: T. Steckler, N.H. Kalin, J.M.H.M. Reul (Eds.), *Handbook on Stress and the Brain*, Elsevier BV, Amsterdam, 2005. pp. 295-312.
45. Sever, R. & Glass, C. K. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, (2013).
46. Smoak, K. A. & Cidlowski, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development* 125, 697–706 (2004).
47. Suino-Powell, K. et al. Doubling the size of the glucocorticoid receptor ligand binding pocket by deacylcortivazol. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1915–23 (2008).
48. Veleiro, A. S., Alvarez, L. D., Eduardo, S. L. & Burton, G. Structure of the glucocorticoid receptor, a flexible protein that can adapt to different ligands. *ChemMedChem* 5, 649–659 (2010).
49. Bledsoe, R. K. et al. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110, 93–105 (2002).
50. Θεραπευτική χρήση συνθετικών γλυκοκορτικοειδών. Θωμάς Σ. Πατεράκης, Ευανδία Διαμάντη-Κανδαράκη
51. Goes, M. C. Van Der, Jacobs, J. W. & Bijlsma, J. W. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases – positive and adverse effects. *Arthritis Research and Therapy* 16, S2 (2014).
52. Coutinho, A. E. & Chapman, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology* 335, 2–13 (2011).
53. Schäcke, H. et al. SEGRAs: a novel class of anti-inflammatory compounds. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 357–71 (2002).
54. Sundahl, N., Bridelance, J., Libert, C., De Bosscher, K. & Beck, I. M. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol. Ther.* 152, 28–41 (2015).
55. Biggadike, K. et al. Design and x-ray crystal structures of high-potency nonsteroidal glucocorticoid agonists exploiting a novel binding site on the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18114–18119 (2009).
56. Barker, M. et al. Dissociated nonsteroidal glucocorticoid receptor modulators; discovery of the agonist trigger in a tetrahydronaphthalene-benzoxazine series. *J. Med. Chem.* 49, 4216–4231 (2006).
57. Betageri, R. et al. Non-steroidal dissociated glucocorticoid agonists: Indoles as A-ring mimetics and function-regulating pharmacophores. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 21, 6842–6851 (2011).

58. De Bosscher, K., Haegeman, G. & Elewaut, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Current Opinion in Pharmacology* 10, 497–504 (2010).
59. Kaserer, T., Beck, K., Akram, M., Odermatt, A., & Schuster, D. (2015). Pharmacophore Models and Pharmacophore-Based Virtual Screening: Concepts and Applications Exemplified on Hydroxysteroid Dehydrogenases. *Molecules*, 20(12), 22799–22832. <https://doi.org/10.3390/molecules201219880>
60. Gao, Q., Yang, L., & Zhu, Y. (2010). Pharmacophore Based Drug Design Approach as a Practical Process in Drug Discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, 6(1), 37–49. <https://doi.org/10.2174/157340910790980151>
61. Berger, M., Rehwinkel, H., Schmees, N., Schäcke, H., Edman, K., Wissler, L., ... Jaroch, S. (2017). Discovery of new selective glucocorticoid receptor agonist leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(3), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.047>

10.1 END

Περιεχόμενα

1	Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών	10
1.1	Πυρηνικοί υποδοχείς - Ο υποδοχέας GR.....	10
1.2	Δομικά χαρακτηριστικά του υποδοχέα GR	12
1.3	Η δέση πρόσδεσης – LBD.....	13
1.4	Κρυσταλλικές δομές συμπλόκων του GR–LBD με μικρά μόρια-προσδέτες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.....	16
2	Τα γλυκοκορτικοειδή και η φαρμακευτική τους δράση.....	20
2.1	Side Effects ή ανεπιθύμητες ενέργειες.....	21
3	Μηχανισμός δράσης των γλυκοκορτικοειδών.....	24
4	Το προφίλ του επιλεκτικού αγωνιστή του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (SEGRA).....	27
5	σχεδιασμός στην ανακάλυψη φαρμάκου.....	29
5.1	Ορδολογικός σχεδιασμός	29
5.2	Η χρήση των φαρμακοφόρων μοντέλων στην προσέγγιση CADD	31
6	Μέθοδοι	33

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	38
7.1. Επιλογή ομάδας εκπαίδευσης του μοντέλου (training set).	38
7.2. Κατασκευή φαρμακοφόρου μοντέλου.....	41
7.3. Αξιολόγηση και επικύρωση φαρμακοφόρου μοντέλου	43
7.4. Εικονική σάρωση της βιβλιοθήκης ZINK	47
7.4.1. High-Throughput virtual screening	49
7.5. Μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking) με εφαρμογή αλγορίθμων υψηλής ακρίβειας.....	51
7.5.1. SP και IFD docking	54
7.6. Ομαδοποίηση και Επιλογή	60
8. Αποτελέσματα	63
8.1 ΜΟΡΙΑ ΠΟΥ ΕΠΙΛΕΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟΝ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟ 5G3J.....	64
8.2 Μόρια που επιλέγονται από την πρόσδεση στον κρύσταλλο 5g3j.....	73
9 Συντομογραφίες	88
10 Βιβλιογραφία	89
10.1 end.....	93

